



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Suellen dos Reis

**Estudos *in silico* para o desenvolvimento de um novo inibidor da enzima
14 α -demetilase de *Acanthamoeba* spp.**

FLORIANÓPOLIS

2022

Suellen dos Reis

**Estudos *in silico* para o desenvolvimento de um novo inibidor da enzima
14 α -demetilase de *Acanthamoeba* spp.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia. Área de Concentração: Fármaco e Medicamentos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Lílian S. C. Bernardes

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a. Lara A. Zimmermann

FLORIANÓPOLIS

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

dos Reis, Suellen

Estudos in silico para o desenvolvimento de um novo
inibidor da enzima 14?-demetilase de Acanthamoeba spp. /
Suellen dos Reis ; orientador, Lílian Sibelle Campos
Bernardes, coorientador, Lara Almida Zimmermann, 2022.
102 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Acanthamoeba spp.. 3. enzima 14?
demetilase. 4. modelagem molecular. 5. modelo de
farmacóforo. I. Sibelle Campos Bernardes, Lílian . II.
Almida Zimmermann, Lara . III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV.
Título.

Suellen dos Reis

**Estudos *in silico* para o desenvolvimento de um novo inibidor da enzima
14 α -demetilase de *Acanthamoeba* spp.**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Ricardo Ferreira Affeldt, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Vinícius Gonçalves Maltarollo, Dr.
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Prof^a. Dra. Lilian Sibelle Campos Bernardes
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Thaís Cristine Marques Sincero
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Universidade Federal de Santa Catarina

FLORIANÓPOLIS

2022

**Não tenha piedade dos mortos, Harry. Tenha
piedade dos vivos e, acima de tudo, dos que vivem
sem amor.**

Alvo Dumbledore – J.K. Rowling, Harry Potter e as
Relíquias da Morte

**Se eu falasse as línguas dos homens e as dos anjos,
mas não tivesse amor, eu seria como um bronze
que soa ou um címbalo que retine.**

**Se eu tivesse o dom da profecia, se conhecesse
todos os mistérios e toda a ciência, se tivesse toda
a fé, a ponto de remover montanhas, mas não
tivesse amor, eu nada seria.**

1ª Carta de São Paulo aos Coríntios 13:1-2

A Deus, por trilhar um caminho tão maravilhoso
para mim até então não imaginado

Aos meus pais, por me apoiarem nos meus sonhos
mais ousados

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pelo amor incondicional. Por permitir que eu pudesse viver esta conquista. Por arder o fogo do Espírito Santo em mim. Por me dar força para enfrentar os desafios mais intensos e paz para seguir.

Aos meus pais, meus queridos. Por todo o amor e amparo que vocês representam para mim. Por todos os momentos que conversamos para a tomada de uma decisão. Por acreditarem em mim e me apoiarem até este momento da minha jornada. Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

À toda a minha família, por ser essa unidade linda e barulhenta. Amo todos vocês. Em especial agradeço aos meus avós Maria Iolanda, Ari Pedro e Judite, pelo carinho que só os avós conseguem transmitir. À minha madrinha Tatiana, por vibrar a cada conquista minha e por todo o carinho. Aos meus primos, Matheus e Mariana, e às minhas amigas Taíze, Stella, Flávia, Maria de Fátima, Aline, Beatriz, Luiza e Mariana, pelas conversas, risadas e pela vida compartilhada. Com vocês o caminho fica mais leve para seguir.

À minha orientadora e amiga, Prof^a Lílian Sibelle Campos Bernardes. Até este momento já compartilhamos muitos momentos, prof. Queria agradecer pelo seu sim em embarcar nesta aventura científica comigo e por todos os ensinamentos valiosos. Espero ainda aprender muito com você. À minha coorientadora, Prof^a Lara Almida Zimmermann, por me acompanhar desde o meu trabalho de conclusão de curso. Pela prontidão em me ajudar e por todo o conhecimento compartilhado. O meu muito obrigada!

Ao Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal. Por ser mais que um local de trabalho para mim. De todas as pessoas que já passaram pelo nosso querido laboratório, as que me marcaram na minha jornada científica durante o mestrado foram o Filipe e o Lucas, além da nossa prof Lílian. A vocês o meu muito obrigada pelos momentos em que juntos discutimos ciência e os rumos dos nossos trabalhos, pelos momentos de descontração e pelos infinitos cafezinhos. E em especial ao Filipe, pela amizade, pelo apoio mútuo que tivemos durante o mestrado e desabafos. Obrigada por tudo!

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, bem como às agências de fomento CAPES e CNPq pela infraestrutura e pelo apoio financeiro que tornaram possível a execução deste trabalho.

À banca avaliadora, pelo sim de vocês em contribuírem para este trabalho. Bem como pelos ensinamentos valiosos que irei levar da defesa e das sugestões propostas.

A todos que não mencionei, mas que de alguma forma contribuíram durante a minha jornada até aqui. Os meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

Reis, Suellen dos. **Estudos *in silico* para o desenvolvimento de um novo inibidor da enzima 14 α -demetilase de *Acanthamoeba* spp.** 102p. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

O processo de desenvolvimento de fármacos permanece longo, caro e complexo. Com intuito de otimizar o processo, diversas abordagens computacionais têm sido desempenhadas, como a construção de modelos de farmacóforos. A enzima 14 α -demetilase (CYP51) demonstra ser um potencial alvo para o tratamento da doença ceratite por *Acanthamoeba*. Esta enzima tem seu papel na via de biossíntese do ergosterol, importante componente de membrana do protozoário. A *Acanthamoeba* spp. pode ser capaz de gerar opacidade e intenso processo infeccioso na córnea por meio da abrasão do epitélio. Atualmente, não há um tratamento eficaz e específico para esta doença ocular potencialmente devastadora. Com o objetivo de identificar potenciais inibidores da enzima CYP51 de *Acanthamoeba* foram desenvolvidos estudos *in silico* baseados em modelagem molecular pela construção e validação de modelos de farmacóforo e aplicação de triagem virtual de compostos. Foram construídos e validados 13 farmacóforos baseados em inibidores da enzima CYP51 de *Acanthamoeba* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. e 4 farmacóforos baseados na estrutura da enzima CYP51 de *Acanthamoeba castelanii*. Na etapa de triagem virtual, foi empregada a biblioteca SPECS partindo de mais de 1 milhão de compostos para a seleção de 79 potenciais inibidores da enzima. Estes compostos foram avaliados estruturalmente quanto as interações realizadas com aminoácidos e a posição adotada no sítio ativo com seleção de 19 compostos para posteriores estudos de planejamento e síntese e avaliação da atividade biológica.

Palavras-chave: *Acanthamoeba* spp.; enzima 14 α -demetilase; CYP51; ceratite amebiana; modelagem molecular; modelo de farmacóforo; triagem virtual; *docking* molecular.

ABSTRACT

Reis, Suellen dos. ***In silico* studies for the development of a novel 14 α -demethylase enzyme inhibitor of *Acanthamoeba* spp.** 102p. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

The drug discovery and development process remain a long, expensive, and complex. To optimize this process, several computational approaches have been performed, such as the construction of pharmacophore models. The enzyme 14 α -demethylase (CYP51) shows to be a potential target for the treatment of *Acanthamoeba* keratitis disease. This enzyme has its role in the biosynthesis pathway of ergosterol, an important membrane component of *Acanthamoeba*. The *Acanthamoeba* may be able to generate opacity and intense infectious process in the cornea by abrasion of this epithelium. Currently, there is no effective and specific treatment for this potentially devastating eye disease. To identify potential inhibitors of the CYP51 enzyme from *Acanthamoeba*, *in silico* studies based on molecular modeling were developed by building and validating pharmacophore models and applying virtual screening of compounds. Thirteen pharmacophores based on CYP51 enzyme inhibitors from *Acanthamoeba* spp., *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania* spp. and four pharmacophores based on the CYP51 enzyme structure from *Acanthamoeba castelanii* were built and validated. In the virtual screening, the SPECS library started with more than 1 million compounds for the selection of 79 potential inhibitors of the enzyme. These compounds were structurally evaluated regarding the interactions with amino acids and the pose adopted in the active site with a selection of 19 compounds for further planning and synthesis studies and evaluation of the biological activity.

Keywords: *Acanthamoeba* spp.; 14 α -demethylase enzyme; CYP51; amoebic keratitis; molecular modeling; pharmacophore model; virtual screening; molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas principais para o processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos até sua chegada ao mercado _____	20
Figura 2. Representação das <i>features</i> presentes nos modelos de farmacóforo gerados pelo software <i>Pharmit</i> _	23
Figura 3. Aminoácidos com suas respectivas cadeias laterais e características de polaridade _____	24
Figura 4. Representação estrutural das interações intermoleculares entre alvo molecular e ligantes _____	26
Figura 5. Sequência reacional da série oxidativa promovida pela enzima esterol 14- α -demetilase para sequência da via de síntese do ergosterol em fungos, protozoários e amebas _____	27
Figura 6. Apresentação de um monômero da estrutura cristalizada da enzima CYP51 de <i>Acanthamoeba</i> (AcCYP51) e uma representação da estabilização do fármaco isavuconazol mediada pela presença do grupo heme no sítio ativo _____	29
Figura 7. Estruturas dos fármacos utilizados para o tratamento da ceratite por <i>Acanthamoeba</i> _____	31
Figura 8. Estruturas químicas de derivados azólicos utilizados para o tratamento da ceratite por <i>Acanthamoeba</i> _____	32
Figura 9. Etapas consecutivas do delineamento de estudo para triagem virtual de compostos com a geração e aprimoramento de modelos de farmacóforo _____	42
Figura 10. Representação gráfica e informações sobre o modelo de farmacóforo gerado no <i>Pharmagist</i> com base nos inibidores da CYP51 para o protozoário <i>Acanthamoeba</i> spp. _____	44
Figura 11. Representação estrutural dos inibidores da enzima 14 α -demetilase para <i>Trypanosoma cruzi</i> considerados como referência para geração dos modelos de farmacóforo _____	46
Figura 12. Inibidores da enzima 14 α -demetilase para protozoário <i>Leishmania</i> spp. considerados como referência para geração do modelo de farmacóforo _____	49
Figura 13. Representação gráfica de todos os farmacóforos construídos com base nos inibidores da enzima 14 α -demetilase dos protozoários <i>Acanthamoeba</i> spp., <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania</i> spp. _____	51
Figura 14. Representação do modelo de farmacóforo gerado com base na estrutura cristalográfica da enzima CYP51 de <i>Acanthamoeba castelanii</i> _____	53
Figura 15. Representação esquemática da série de etapas da triagem virtual para identificação de potenciais inibidores da enzima CYP51 de <i>Acanthamoeba</i> spp. _____	56
Figura 16. Representação da sobreposição das estruturas do fármaco isavuconazol no sítio ativo da enzima CYP51 de <i>Acanthamoeba castelanii</i> como resultado do estudo de <i>redocking</i> _____	58
Figura 17. Representação das interações entre o fármaco isavuconazol reinserido no sítio ativo da enzima CYP51 de <i>Acanthamoeba castelanii</i> e os resíduos de aminoácidos como resultado do estudo de <i>redocking</i> _____	60
Figura 18. Representação da sobreposição das estruturas com melhores valores de pontuação no estudo de <i>docking</i> inseridos no sítio ativo da enzima CYP51 de <i>Acanthamoeba castelanii</i> _____	62
Figura 19. Representações gráficas de relação entre propriedades físico-químicas apresentadas pelos compostos na etapa de <i>docking</i> molecular _____	68

Figura A1. Estrutura dos compostos ativos (inibidores) da enzima 14 α -demetilase para protozoário <i>Acanthamoeba</i> spp. que compõem a biblioteca de treinamento _____	84
Figura A2. Estrutura dos compostos ativos (inibidores) da enzima 14 α -demetilase para protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> que compõem a biblioteca de treinamento _____	89
Figura A3. Estrutura dos compostos ativos (inibidores) da enzima 14 α -demetilase para protozoário <i>Leishmania</i> spp. que compõem a biblioteca de treinamento _____	95
Figura A4. Gráfico de Ramachandran gerado com base na estrutura cristalográfica da enzima CYP51 PDB 6UX0 de <i>Acanthamoeba castelanii</i> _____	102

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo do fator de enriquecimento EF _____	38
Equação 2. Cálculo do fator de enriquecimento (EF) de construção referente à biblioteca de composto inibidores da CYP51 do protozoário <i>Acanthamoeba</i> spp. _____	44
Equação 3. Cálculo do fator de enriquecimento (EF) de construção referente à biblioteca de composto inibidores da CYP51 para o protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> _____	47
Equação 4. Cálculo do fator de enriquecimento (EF) construção referente à biblioteca de composto inibidores da CYP51 para o protozoário <i>Leishmania</i> spp. _____	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de Programas, Softwares e Bases de Dados empregados para o desenvolvimento das abordagens de modelagem molecular _____	35
Tabela 2. Relação de distância de interação entre ligante e resíduos de aminoácido descritos pela literatura ____	41
Tabela 3. Resultados da validação para os modelos de farmacóforo baseados nos inibidores da CYP51 para o protozoário <i>Acanthamoeba</i> spp. _____	45
Tabela 4. Modelos de farmacóforo gerados pelo <i>Pharmagist</i> baseados nos inibidores da CYP51 para o protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> _____	46
Tabela 5. Resultados da validação para os modelos de farmacóforo baseados nos inibidores da CYP51 para o protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> _____	47
Tabela 6. Modelos de farmacóforo gerados pelo <i>Pharmagist</i> baseados nos inibidores da CYP51 para o protozoário <i>Leishmania</i> spp. _____	48
Tabela 7. Resultados da validação para o modelo de farmacóforo referente aos inibidores da CYP51 para o protozoário <i>Leishmania</i> spp. _____	50
Tabela 8. Modelo de farmacóforo gerado pelo software <i>Pharmit</i> pelo emprego da estrutura cristalográfica da CYP51 para o protozoário <i>Acanthamoeba castelanii</i> _____	53
Tabela 9. Resultados da validação para o modelo de farmacóforo referente a estrutura de CYP51 para o protozoário <i>Acanthamoeba</i> spp. _____	54
Tabela 10. Resultados do estudo de <i>redocking</i> contendo os melhores valores de RMSD e parâmetros obtidos nas funções de pontuação CHEMPLP, GOLDScore, CHEMSCORE e ASP _____	58
Tabela 11. Resultados das interações intermoleculares entre fragmentos do fármaco isavuconazol cocrystalizado e após o <i>redocking</i> com os respectivos aminoácidos presentes no sítio ativo e grupamento heme _____	59
Tabela 12. Resultado do estudo de <i>docking</i> com os dez compostos com melhor valor de função de pontuação em ASP _____	61
Tabela 13. Interações observadas na inspeção visual das interações entre resíduos de aminoácido e os inibidores isavuconazol, itraconazol e voriconazol da enzima CYP51 de <i>Acanthamoeba castelanii</i> _____	63
Tabela 14. Interações observadas na inspeção visual dos dez compostos com melhor valor na função de pontuação ASP e suas interações com resíduos de aminoácido presentes no sítio ativo da enzima CYP51 de <i>Acanthamoeba castelanii</i> _____	64
Tabela 15. Propriedades físico-químicas dos compostos selecionados na etapa de <i>docking</i> molecular _____	67
Tabela A1. Dados referente aos compostos ativos (inibidores) da enzima 14 α -demetilase para protozoário <i>Acanthamoeba</i> spp. e compostos considerados no modelo farmacofórico baseado nos ligantes _____	83
Tabela A2. Dados referente aos compostos ativos (inibidores) da enzima 14 α -demetilase para protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> e compostos considerados nos modelos farmacofóricos baseado nos ligantes _____	85
Tabela A3. Dados referente aos compostos ativos (inibidores) da enzima 14 α -demetilase para protozoário <i>Leishmania</i> spp. e compostos considerados nos modelos farmacofóricos baseado nos ligantes _____	94
Tabela A4. Informações pertinentes ao depósito da estrutura cristalográfica da enzima CYP51 PDB 6UX0 de <i>Acanthamoeba castelanii</i> _____	96

Tabela A5. Relação detalhada dos resultados para o modelo de farmacóforo validado referente aos inibidores da CYP51 para o protozoário <i>Acanthamoeba</i> spp. _____	97
Tabela A6. Relação detalhada dos resultados para o modelo de farmacóforo validado referente aos inibidores da CYP51 para o protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> _____	98
Tabela A7. Relação detalhada dos resultados para o modelo de farmacóforo validado referente aos inibidores da CYP51 para o protozoário <i>Leishmania</i> spp. _____	99
Tabela A8. Relação detalhada dos resultados para o modelo de farmacóforo validado referente a estrutura da enzima CYP51 para o protozoário <i>Acanthamoeba</i> spp. _____	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcCYP51	Enzima 14 α -demetilase (CYP51) de <i>Acanthamoeba</i> spp.
AR	Aromaticidade
ASP	Função de Pontuação potencial estatístico astex
CADD	Estudos auxiliados por computadores no desenvolvimento de fármacos
CombChem	Química combinatória
EF_{construção}	Fator de Enriquecimento de construção
EF_{validação}	Fator de Enriquecimento de validação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (agência regulatória nos Estados Unidos)
H	Hidrofobicidade
HBA	Aceptor de ligação de hidrogênio
HBD	Doador de ligação de hidrogênio
HTS	<i>High throughput screening</i> (ensaios robotizados de triagem em larga escala)
IN	Íon negativo
IP	Íon positivo
IUPAC	União de Química Pura e Aplicada
LBDD	<i>Ligand-based drug design</i> (desenvolvimento de fármaco baseado no ligante)
PAINS	<i>Pan-assay interference compounds</i> (compostos interferentes em ensaios de atividade fenotípicos)
PDB	<i>Protein data bank</i> (banco de dados de proteínas)
QSAR	Modelos quantitativos de estudo da relação estrutura-atividade
QSPR	Modelos quantitativos de estudo das propriedades estruturais
SBDD	<i>Structure-based drug design</i> (desenvolvimento de fármaco baseado na estrutura do alvo molecular)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	OS ESTUDOS COMPUTACIONAIS NA DESCOBERTA DE CANDIDATOS A FÁRMACOS	19
2.1.1	A CONSTRUÇÃO DE MODELOS DE FARMACÓFORO E O DOCKING MOLECULAR NO CONTEXTO DA DESCOBERTA DE CANDIDATOS A FÁRMACOS	22
2.2	ENZIMA 14A-DEMETILASE: UM POTENCIAL ALVO MOLECULAR	26
2.3	CERATITE POR <i>ACANTHAMOEBA</i> SPP.: ASPECTOS BIOLÓGICOS, EPIDEMIOLOGIA E ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS	29
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE COMPOSTOS ATIVOS	36
4.2	ELABORAÇÃO DOS MODELOS FARMACOFÓRICO	36
4.3	VALIDAÇÃO E REFINAMENTO DOS MODELOS DE FARMACÓFORO	38
4.4	TRIAGEM VIRTUAL E SELEÇÃO DE COMPOSTOS	39
4.5	ESTUDOS DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR DOS COMPOSTOS TRIADOS	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS DE FARMACÓFORO GERADOS POR ABORDAGEM LBDD: INIBIDORES DA ENZIMA CYP51 DE <i>ACANTHAMOEBA</i> SPP., <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E <i>LEISHMANIA</i> SPP.	43
5.1.1	MODELOS DE FARMACÓFORO PARA <i>ACANTHAMOEBA</i> SPP.	43
5.1.2	MODELOS DE FARMACÓFORO PARA <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	45
5.1.3	MODELOS DE FARMACÓFORO PARA <i>LEISHMANIA</i> SPP.	48
5.2	CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DE MODELOS DE FARMACÓFORO CONSTRUÍDOS PELA ABORDAGEM SBDD: ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA ENZIMA CYP51	51
5.3	TRIAGEM VIRTUAL DE INIBIDORES DA ENZIMA CYP51	55
5.4	ESTUDOS DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR DOS COMPOSTOS TRIADOS	57
6	CONCLUSÕES	69
7	PERSPECTIVAS	70
8	REFERÊNCIAS	71
9	ANEXOS	83

Introdução

A descoberta e o desenvolvimento de fármacos estão entre os campos da ciência que mais contribuem para a saúde e bem-estar da população. É por meio dos diversos medicamentos e estratégias terapêuticas disponíveis hoje, que temos a possibilidade de atingir melhora de sintomas e até mesmo cura de enfermidades, impactando diretamente na expectativa de vida da população. Por outro lado, a entrega de um novo medicamento ao mercado permanece um processo complexo, caro e de longa duração. O custo para a chegada de um medicamento ao mercado é estimado em 2,6 bilhões de dólares e o tempo necessário pode chegar a 12 anos (CHAN et al., 2019; DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016).

Neste cenário, os estudos assistidos por computadores (CADD) têm sido empregados em todas as etapas visando a otimização deste processo, assim como o direcionamento racional para seleção de novos candidatos a fármacos (CHAN et al., 2019; MACALINO et al., 2015). Além disso, as abordagens envolvem duas estratégias norteadoras, em que uma conta com a investigação da atividade biológica de compostos de origem sintética ou natural, com posterior estudo do mecanismo de ação e utilização para tratamento de uma doença. Quanto a outra, envolve um direcionamento fisiológico com enfoque em uma doença e a seleção de alvo molecular a ser explorado no planejamento de novos candidatos a fármacos (AGAMAH et al., 2020; SHING et al., 2020).

Sendo assim, a seguir é apresentada uma revisão da literatura apontando aplicações dos estudos computacionais na descoberta de candidatos a fármacos e das bases para o aprofundamento na doença e do alvo molecular proposto para o estudo. Ao longo desta dissertação foram seguidas as bases fisiológicas para a investigação de inibidores da enzima 14 α -demetilase com aplicação de estratégias de modelagem molecular como a construção de modelos de farmacóforo baseado nos ligantes descritos na literatura como inibidores e na estrutura da enzima, a execução de uma triagem virtual de novos compostos e a avaliação dos compostos com o estudo de *docking* molecular, com avaliação das interações entre os compostos triados e o alvo molecular proposto.

Revisão da Literatura

1.1 Os estudos computacionais na descoberta de candidatos a fármacos

Todos os anos, dezenas de novos medicamentos têm sido liberados para a população pelas agências de regulamentação. De uma forma positiva, estes novos medicamentos trazem uma perspectiva de ampliação do arsenal terapêutico para doenças que carecem de opções farmacológicas eficazes e específicas. A pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos devem ir de encontro com as necessidades terapêuticas da sociedade. (KIRIIRI; NJOGU; MWANGI, 2020). Isso se reflete na aprovação, em 2021 pela agência de regulamentação de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos, de 26 novos medicamentos para o tratamento de doenças raras dentre os 50 aprovados (52%) o que têm trazido um novo cenário na promoção da saúde destes pacientes (FDA, 2021). Entretanto, os esforços para a pesquisa de novos medicamentos para doenças raras devem continuar, uma vez que estas atingem uma pequena parcela da população, com 50 casos a cada 100.000 indivíduos, e muitas são incapacitantes como por exemplo a síndrome de Tourette, esclerose lateral amiotrófica (ELA), ceratite amebiana, dentre outras (FDA, 2018).

Para que um novo fármaco esteja disponível para a população, atualmente, são desenvolvidos estudos envolvendo as etapas de: (1) seleção e validação de um alvo molecular nas pesquisas de base; (2) triagem e otimização de compostos para a descoberta de *hits*; (3) estudos pré-clínicos; (4) ensaios clínicos de fase I, II e III; (5) com o fechamento dos dados de todo o processo por uma agência regulatória (Figura 1) (HUGHES et al., 2011; LOMBARDINO; LOWE, 2004). O processo para a descoberta e o desenvolvimento de um fármaco é norteado pela interdisciplinaridade dos profissionais envolvidos, bem como pelo investimento de tempo e custos financeiros para sua execução. A investigação tem início em projetos com cerca de 10 mil a 5 mil compostos e a cada etapa dezenas de compostos são eliminados do estudo, em sua grande maioria nas etapas pré-clínicas. Neste contexto, os estudos auxiliados por computadores ou os estudos *in silico* vêm sendo cada vez mais utilizados (CHAN et al., 2019; DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016; MACALINO et al., 2015; USHA et al., 2018).

Figura 1. Etapas principais para o processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos até sua chegada ao mercado.



O processo inicia com cerca de 10 a 5 mil compostos para que ao final seja entregue um fármaco, e conta com aproximadamente 12 anos para seu desenvolvimento. *Fonte:* autoria própria. HUGHES et al., 2011; LOMBARDINO; LOWE, 2004

Foi no início dos anos 1980, com o advento da utilização da química combinatória (CombChem) e dos ensaios robotizados de triagem em larga escala (HTS, do inglês *high throughput screening*) que a indústria farmacêutica expandiu sua forma de geração de fármacos, com impacto direto na criação de bibliotecas de compostos. Pela abordagem de HTS foi possível realizar a triagem de compostos com a utilização de ensaios fenotípicos em massa associada à robótica e aos potentes processadores de dados. E assim, uma ampliação do espaço químico de uma forma inédita abriu portas para a construção das bibliotecas de compostos disponíveis atualmente (JHOTI; REES; SOLARI, 2013; MACALINO et al., 2015). Por outro lado, os resultados destas abordagens, sobretudo a técnica de HTS, geraram lacunas quanto a seletividade e especificidade de atividade biológica em um alvo molecular, nas propriedades farmacocinéticas dos compostos triados e no custo do emprego desta abordagem. Sendo assim, estudos de triagem de compostos assistidos por computadores começaram a ser delineados para sua aplicação na busca de compostos protótipos visando a descoberta de novos fármacos (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019; WU et al., 2020; YANG et al., 2020).

Em paralelo à ampliação do espaço químico, ocorreu uma revolução na biologia molecular aliada às ferramentas computacionais. Estas abordagens permitiram a execução de grandes estudos como o genoma humano, além do avanço de técnicas de obtenção e cristalização de proteínas, como exemplos a ressonância magnética nuclear, raio-X e espectrometria de massas. Com a descoberta de novas proteínas foi possível elucidar o papel que estas desempenham no desencadeamento de determinadas doenças, e assim impactaram na validação de novos alvos moleculares visando um estudo racional de fármacos (MACALINO et al., 2015; VUORINEN; SCHUSTER, 2015).

A partir deste conhecimento, estratégias para a descoberta de compostos por abordagens *in silico* foram desenvolvidas pela construção de modelos computacionais para a geração de filtros permitiram conduzir a seleção de compostos depositados em amplas bibliotecas. Assim como também, a predição das propriedades físico-química destes compostos com potencial para avaliação das farmacocinéticas com estudos de administração, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. Esta seleção pode ocorrer ainda pela retirada de grupos ou compostos conhecidos como interferentes em ensaios de atividade fenotípicos (filtro PAINS). E desta forma, a triagem virtual (em inglês *virtual screening*), atualmente, apresenta vantagens experimentais frente a técnica de HTS, como o desenvolvimento de uma busca racional de candidatos à fármacos; maior capacidade de triagem de compostos *hits* e; ainda, economia de recursos laboratoriais frente a abordagem de HTS, principalmente no contexto dos princípios da química verde e do uso responsável de recursos (ANASTAS; EGHBALI, 2010; MACALINO et al., 2015; WANG et al., 2020; YAN et al., 2020; YANG et al., 2020a).

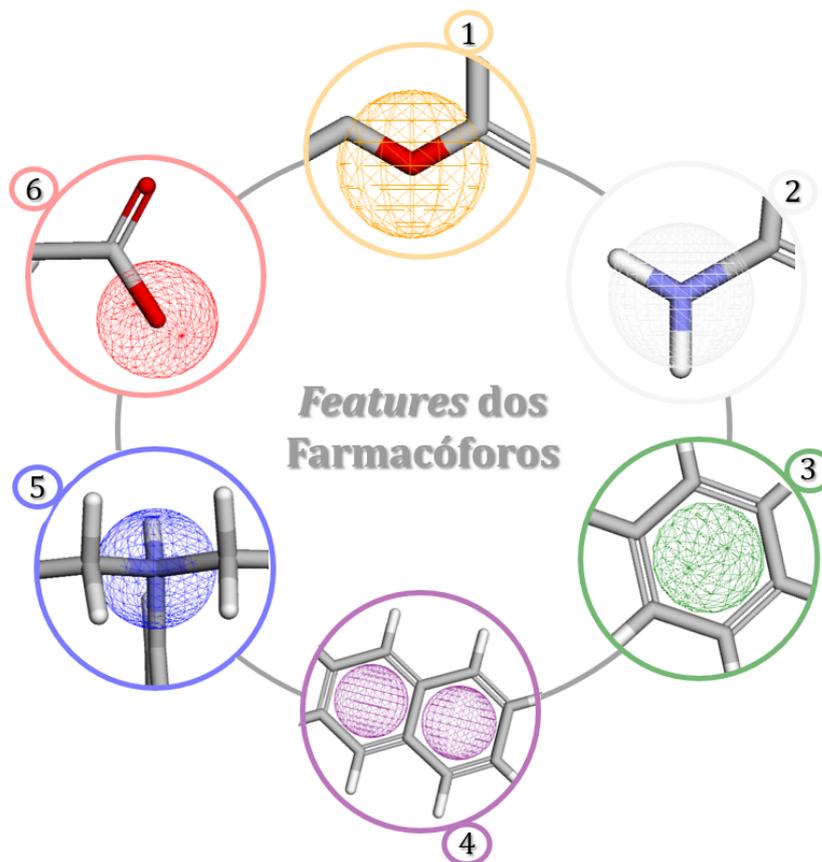
As abordagens computacionais para os estudos *in silico* podem ser delineada com base na estrutura cristalográfica do alvo molecular (em inglês *structure-based* - SBDD), a qual avalia a conformação espacial do alvo molecular e as regiões de interação estabelecidas entre o ligante e a estrutura em contribuição para a atividade; ou mesmo considerando os ligantes (em inglês *ligand-based* - LBDD) pela busca de um padrão entre os compostos ativos conhecidos (MACALINO et al., 2015; WANG et al., 2020). Utilizando das estruturas cristalográficas das proteínas, para obtenção de candidatos a fármacos mais seletivos podem ser delineados com o emprego da abordagem de *docking* molecular, tendo como resultado a obtenção das melhores configurações adotadas pelos ligantes na região do alvo molecular favorável a atividade e a interação. Ainda, a construção de modelos de farmacóforo contando com um arranjo tridimensional de propriedades físico-químicas estéricas e eletrônicas essenciais para atividade biológica de um composto baseado na estrutura do ligante (LANGER; HOFFMANN, 2006; KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2011; BUCKLE et al., 2013; VUORINEN; SCHUSTER, 2015; VAN MONTFORT; WORKMAN, 2017; LIN; LI; LIN, 2020; WANG et al., 2020). Por outro lado, os modelos computacionais baseados em ligantes partem dos parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos para identificação de novos candidatos a fármacos, baseando-se no conhecimento de compostos ativos em alvos moleculares. Essa abordagem é principalmente adotada quando não se dispõe da estrutura do alvo molecular e conta com a construção de modelos de farmacóforo baseado em ligantes e modelos quantitativos de estudo da relação estrutura-atividade e propriedades estruturais (QSAR e QSPR, respectivamente) (LIN; LI; LIN, 2020; MACALINO et al., 2015; WANG et al., 2020).

Dentre as abordagens computacionais, a construção de modelos de farmacóforo e os estudos de *docking* molecular serão tratadas a seguir com mais detalhes devido a sua importância no presente trabalho.

1.1.1 A construção de modelos de farmacóforo e o docking molecular no contexto da descoberta de candidatos a fármacos

Atualmente, o modelo de farmacóforo é uma das abordagens computacionais mais empregadas com o objetivo de seleção de compostos com potencial atividade em estudos *in silico*. Mas, o conceito de farmacóforo foi sendo delineado ao longo das décadas, com início no século 19 com Paul Ehrlich até os dias atuais, com a definição oficial reconhecida pela União de Química Pura e Aplicada (IUPAC) como sendo “um conjunto de características estéricas e eletrônicas que necessariamente asseguram interações supramoleculares ótimas com um alvo molecular específico, contribuindo para a resposta biológica” (VUORINEN; SCHUSTER, 2015). Sendo assim, os farmacóforos contam com um conjunto de características químicas (*features*) associadas a presença de grupos funcionais pertencentes ao composto bioativo dispersos em um arranjo tridimensional e que contribuem para a atividade. Os farmacóforos podem ser construídos com base nos ligantes (LBDD) e baseados na estrutura do alvo molecular (SBDD). Dentre estas características contidas nos farmacóforos estão as *features* de doador de ligação de hidrogênio (HBD), receptor de ligação de hidrogênio (HBA), aromaticidade (AR), hidrofobicidade (H), íon positivo (IP) e íon negativo (IN), podendo variar em cada programa utilizado para a construção dos modelos quanto a representação das características (GIORDANO et al., 2022; KASERER et al., 2015; LEACH et al., 2010; VUORINEN; SCHUSTER, 2015). No software *Pharmit*, o qual foi empregado para a construção dos farmacóforos no presente trabalho, as *features* estão representadas na figura 2.

Figura 2. Representação das features presentes nos modelos de farmacóforo gerados pelo software Pharmit

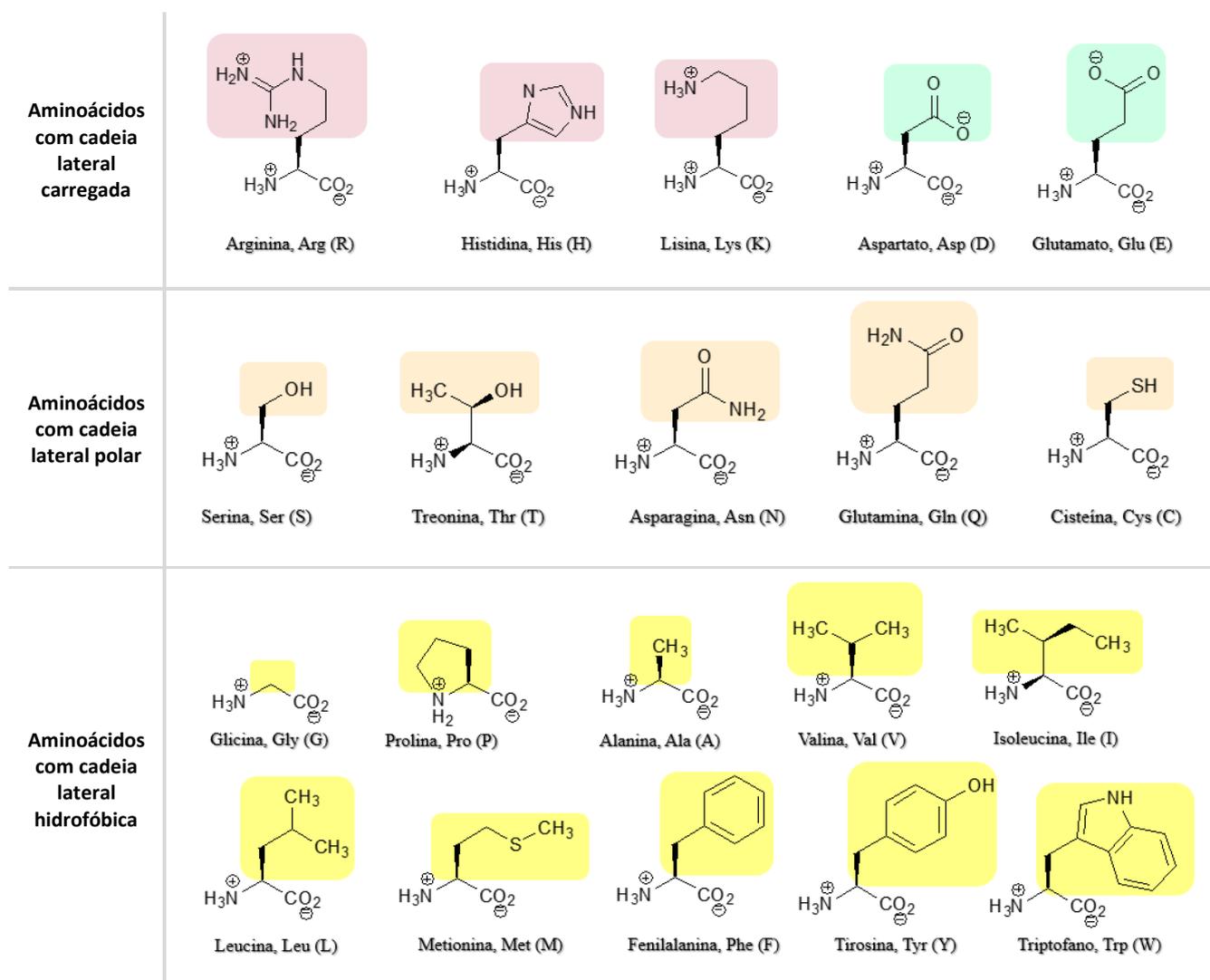


(1) aceptor de ligação de hidrogênio (HBA); (2) doador de ligação de hidrogênio (HBD); (3) hidrofobicidade (H); (4) aromaticidade (AR); (5) íon positivo (IP); (6) íon negativo (IN). *Fonte:* adaptado de GIORDANO et al., 2022

A abordagem de *docking* molecular tem como principal objetivo explorar o modo de interação do ligante no alvo molecular, baseado no conhecimento do arranjo tridimensional da estrutura. Durante a execução das simulações são geradas centenas de poses, ou seja, conformações adotadas pelo ligante para favorecer a realização de interações intermoleculares no alvo com os resíduos de aminoácidos (Figura 3). O resultado das simulações é mensurado pela função de pontuação (*score*) desenvolvida para permitir a predição de atividade biológica baseada nas interações entre os ligantes e a estrutura. Atualmente, são três as classes de funções de *score* aplicadas nos estudos de *docking* molecular: função baseada no campo de força, a qual é gerada pela somatória da energia de interação de van der Waals e eletrostáticas entre dois pares de átomos pertencentes a estrutura-ligante; a função empírica, em que são reproduzidos dados experimentais baseados na afinidade de ligação do complexo pela soma de variáveis independentes como ligação de hidrogênio, efeitos hidrofóbicos, sobreposições estéricas e demais parâmetros; e a função baseada no aprendizado (*knowledge-based*), a qual é construída

pela frequência e interação que dois átomos comparando diferentes estruturas depositadas no banco de dados (KITCHEN et al., 2004; LI; FU; ZHANG, 2019; SAIKIA; BORDOLOI, 2019). Desta forma, partindo do cálculo dos algoritmos considerados nestas funções, cada programa gera a sua versão de função de pontuação considerando critérios relevantes para a execução do *docking* molecular. Tomando como exemplo o programa GOLD, as funções de *score* são a ChemPLP e a GoldScore baseadas no campo de força; a função ChemScore, empírica; e a ASP, baseada no aprendizado (LIEBESCHUETZ; COLE; KORB, 2012).

Figura 3. Aminoácidos com suas respectivas cadeias laterais e características de polaridade



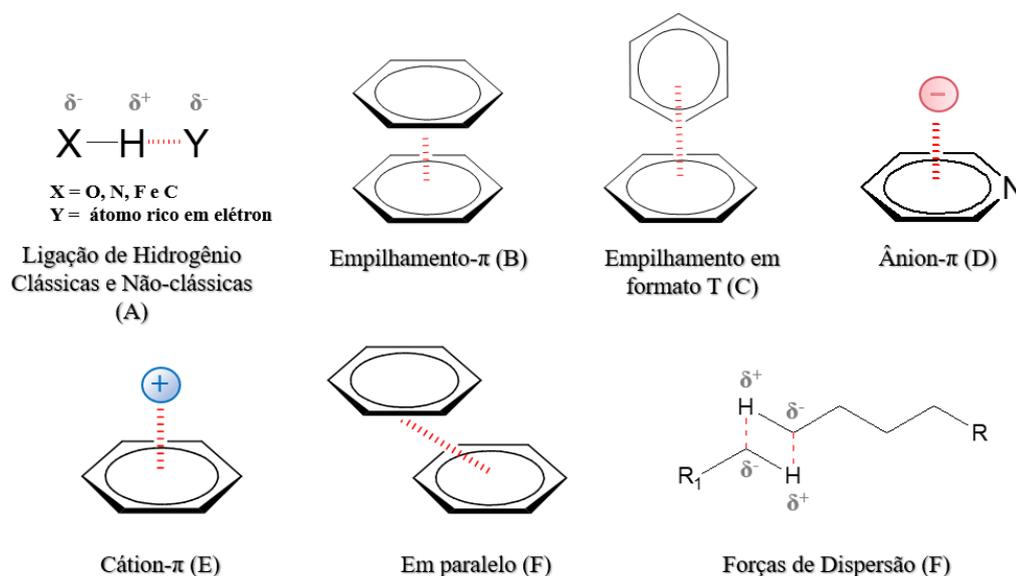
Fonte: a autora

Os processos biológicos do organismo humano como conhecemos são impactados diretamente pela realização de diversas interações eletrônicas e estéricas, em que muitas delas contam com os resíduos de aminoácidos (Figura 3). Desta forma, uma vez que as poses dos ligantes são geradas, é realizada a análise visual das interações de caráter intermolecular e

intramolecular com os resíduos de aminoácidos que são imprescindíveis no contexto de predição de atividade dos compostos. Das interações eletrônicas, as ligações de hidrogênio (Figura 4A) convencionais são de grande importância no contexto de estabilização molecular no interior do sítio ativo. Estas interações ocorrem entre espécies polares em que uma é doadora do átomo de hidrogênio com um momento de dipolo negativo e a outra possui um átomo com riqueza eletrônica suficiente para aceitar o átomo de hidrogênio, possuindo momento de dipolo positivo. Possuem fraca a média energia de interação ($10-40 \text{ KJmol}^{-1}$) com uma geometria angular preferencial de $1,6-3,2\text{\AA}$ e angulação de $90-130^\circ$ para a interação (ARRAS et al., 2022; DESIRAJU, 1996; PAIRAS; TSOUNGAS, 2016; PATRICK, 2013). Por outro lado, as interações não-clássicas de hidrogênio têm ganhado atenção pela sua presença difundida entre as macromoléculas. Correspondem as interações entre doadores e aceptores de hidrogênio fracos/fortes, como ocorrem nas interações de dihidrogênio ($\text{H}^+\cdots\text{H}$); do tipo hidrogênio com sistemas aromáticos ($\text{H}\cdots\pi$); entre carbono e hidrogênio ($\text{C-H}\cdots\pi$) onde o carbono doador de hidrogênio pode pertencer a um fragmento metílico, isopropílico, a uma cadeia longa alquílica ou em sistemas aromáticos; ainda do tipo hidrogênio e enxofre ($\text{H}\cdots\text{S}$) e em diversas outras interações (ARRAS et al., 2022). Ainda, a presença de sistemas π na estrutura dos ligantes e na cadeia lateral dos aminoácidos proporciona interações intermoleculares do tipo hidrofóbicas. São interações areno-areno (Figura 4B-F) do tipo empilhamento- π , empilhamento em formato T, ânion- π , cátion- π e em paralelo (FOKOUÉ et al., 2020).

Quanto as interações estéricas, as forças de van der Waals estão relacionadas com as espécies não-polares em que as interações ocorrem a uma curta distância atômica permitida pela flutuação da densidade eletrônica local. São interações de caráter fraco que impactam de forma positiva no somatório das interações entre o ligante e alvo molecular, sobretudo na disposição de aminoácidos de caráter hidrofóbico com a formação de uma cavidade hidrofóbica no sítio ativo de determinadas enzimas que favorecem esta interação. Estas forças de dispersão (Figura 4G) são comuns em alcanos e alcenos e ocorrem devido a flutuação local de densidade eletrônica entre grupos apolares contendo ligações entre carbono-hidrogênio ou carbono-carbono (LIPROT; POWER, 2017; PATRICK, 2013; WAGNER; SCHREINER, 2015).

Figura 4. Representação estrutural das interações intermoleculares entre alvo molecular e ligantes



Sendo assim, as mais diversas abordagens de modelagem molecular são propostas para a seleção de compostos na triagem virtual, pela construção de modelos computacionais. Ainda, a aplicação sinérgica dos estudos computacionais e a avaliação *in vitro* para confirmação das predições realizadas possibilitam um alto poder de seleção e eliminação de compostos em estágios iniciais do desenvolvimento de fármacos (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019; LIN; LI; LIN, 2020; MACALINO et al., 2015; SOUZA; PREMA, 2020; WANG et al., 2020; YAN et al., 2020). As abordagens de moleculares podem ser aplicadas ao longo do processo de desenvolvimento de fármaco com enfoque em um alvo molecular no contexto de investigação com caráter fisiológico. Neste sentido, a enzima 14 α -demetilase pode ser explorada como um potencial alvo molecular.

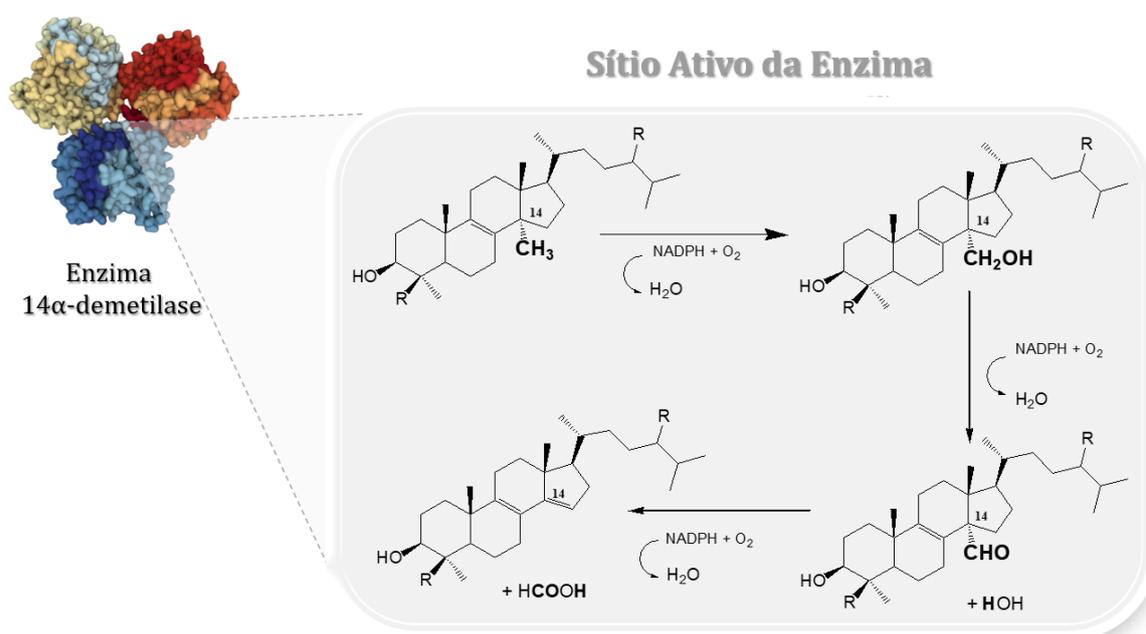
1.2 Enzima 14 α -demetilase: um potencial Alvo Molecular

Os alvos moleculares, em sua maioria, são macromoléculas como as proteínas (enzimas, receptores ou proteínas de transporte) e ácidos nucleicos (DNA e RNA). As proteínas são estruturas constituídas por unidades fundamentais, os aminoácidos, que por sua vez realizam ligações peptídicas entre os seus resíduos para compor sua estrutura primária. A presença dos aminoácidos ocorre da mesma forma na região de sítio ativo, o que permite a acomodação dos fármacos pela geração de interações intermoleculares entre átomos e grupos funcionais por parte da proteína e do composto. Essa interação pode gerar uma mudança de conformação desta proteína propiciando sinalização celular relacionada ao efeito farmacológico. As enzimas

possuem papel fundamental na maior parte das vias bioquímicas envolvidas no desenvolvimento de patologias, por isso são amplamente empregadas como alvos moleculares (BARREIRO; FRAGA, 2014; PATRICK, 2013; SANTOS et al., 2017).

Neste sentido, a enzima esterol 14 α -demetilase ou CYP51 tem despertado a atenção como alvo molecular para diversas patologias pela sua presença em espécies de patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Naegleria fowleri* e *Acanthamoeba* spp. Pertencente ao conjunto de enzimas da família do citocromo P450, a CYP51 participa da biossíntese do ergosterol em fungos, protozoários e amebas por meio de uma série de três etapas de catálise régio e estéreo específica favorecidas pela presença do grupamento heme em seu sítio ativo (Figura 5). Nesta etapa fundamental a CYP51 promove a remoção oxidativa do grupamento metílico situado no carbono 14 (Δ 14) dos seus substratos principais: lanosterol, 24,25-dihidrolanosterol, eburicol, obtusifoliol e C4-norlanosterol. A presença de oxigênio e NADPH é fundamental para a reação redox, sobretudo no estado de redução do íon ferro no grupamento heme. A reação tem início com a hidroxilação do grupo 14 α -metil, seguida da oxidação do produto 14- α -carboxiálcool a 14 α -carboxialdeído e eliminação do grupamento aldeído como ácido fórmico do Δ 14. Por fim, ocorre o rearranjo eletrônico e formação da dupla ligação entre Δ 14, 15, dando sequência a via de síntese do ergosterol (LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018; LEPESHEVA; WATERMAN, 2011; NES, 2011).

Figura 5. Sequência reacional da série oxidativa promovida pela enzima esterol 14- α -demetilase para sequência da via de síntese do ergosterol em fungos, protozoários e amebas.

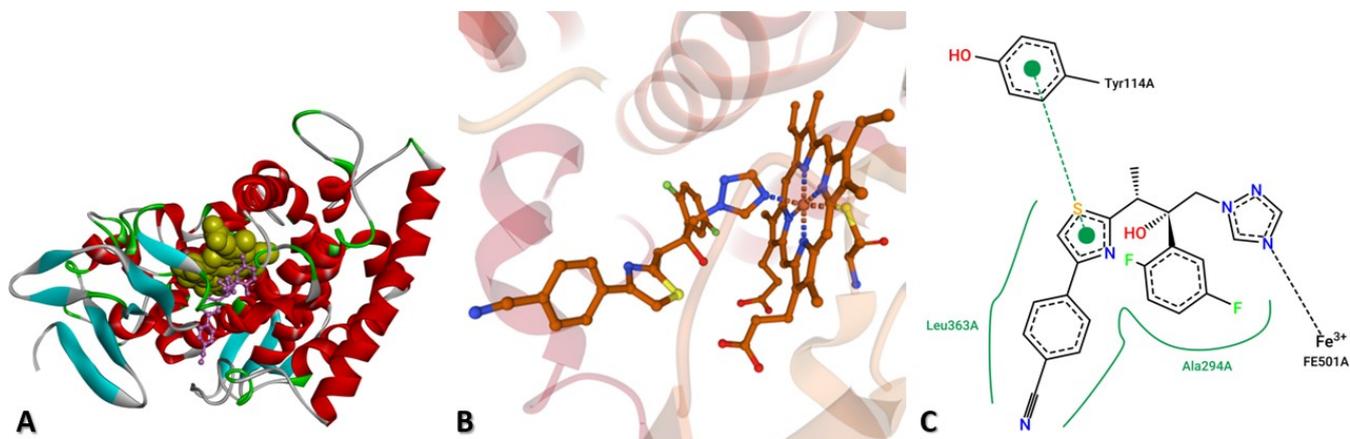


Fonte: adaptado de LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018; LEPESHEVA; WATERMAN, 2011

O ergosterol é um componente essencial da estrutura da membrana plasmática e desempenha funções de sustentação, fluidez e permeabilidade. Atua, ainda, como precursor de moléculas regulatórias que modulam processos de crescimento, divisão, diferenciação e desenvolvimento celular (LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018; LEPESHEVA; WATERMAN, 2007; NES, 2011). A enzima CYP51 apresenta diferença estrutural entre humanos e fungos, o que possibilita ação seletiva dos fármacos azólicos nas células fúngicas como inibidores enzimáticos, interrompendo a via de síntese do ergosterol. Ainda, o principal constituinte de membrana plasmática em humanos é o colesterol, tendo sua síntese primordial pela atuação da enzima β -hidroxi- β -metilglutaril-Coenzima A redutase (HMG-CoA), a qual não é afetada pelos antifúngicos. Desta forma, a CYP51 pode ser explorada como um potencial alvo na tentativa de desenvolvimento de fármacos seletivos para o tratamento de infecções, sobretudo por meio da aplicação de abordagens computacionais e da estrutura da enzima disponíveis para os diversos agentes infecciosos (LAMB et al., 2015; LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018; NELSON, D. L. & COX, 2014; NES, 2011; PATRICK, 2013; THOMSON et al., 2017).

Uma das formas de exploração do alvo molecular está no estudo do cristal da estrutura enzimática depositada em bancos de dados e, a partir disso, planejar fármacos potentes e seletivos. A enzima CYP51 de *Acanthamoeba castellanii* possui sua estrutura cocrystalizada com o fármaco isavuconazol (Figura 6A) (SHARMA et al., 2020). Para compor o sítio ativo, a enzima conta com o grupo heme formado por um íon ferro na posição central em coordenação com um anel de porfirina, constituindo um componente essencial para estabilização de compostos no sítio ativo e é favorecido com a presença do resíduo de aminoácido Cys434 (Figura 6B). Dentre as propostas de estabilização de compostos no sítio ativo está o favorecimento de uma ligação coordenada entre o íon ferro e, principalmente, heterociclos triazólicos e tetrazólicos pela disponibilidade de elétrons livres pelos heteroátomos para desempenho do papel como bases de Lewis. A ligação coordenada é estabelecida no caso do fármaco isavuconazol, entre o nitrogênio pertencente ao anel triazólico e ferro. A formação deste sistema de coordenação também está presente nas enzimas do metabolismo pertencentes ao citocromo p450 e enzimas de transporte de oxigênio, como a mioglobina (ATKINS et al., 2010; CAMPO; BERNARDES; CARVALHO, 2009; LUIRINK et al., 2020).

Figura 6. Apresentação de um monômero da estrutura cristalizada da enzima CYP51 de *Acanthamoeba* (AcCYP51) e uma representação da estabilização do fármaco isavuconazol mediada pela presença do grupo heme no sítio ativo.



(A) Estrutura cristalográfica PDB 6UX0 com o grupamento heme presente em amarelo; fármaco isavuconazol em rosa; (B) Apresentação do sítio ativo enzimático com enfoque na ligação coordenada entre o ligante isavuconazol mais à esquerda, com grupo heme e o aminoácido cisteína 434 mais à direita; (C) Estrutura bidimensional do fármaco isavuconazol realizando interações com resíduos de aminoácido do sítio de ligação.

Fonte: a autora. Criação com base em imagens retiradas do banco de dados PDB e na publicação SHARMA et al., 2020. Ilustração obtida por meio do programa Discovery Studio 2019 e pelo software PLIP (ADASME et al., 2021).

Pensando nas demais formas de estabilização de compostos no sítio de ligação da CYP51 de *Acanthamoeba* (AcCYP51), podem ser citadas as interações intermoleculares com os resíduos de aminoácidos presentes na região como a Tyr114, Phe116, Ser117, Phe121, Val126, Tyr127, Ala290, Phe293, Ala294, Leu363, Phe365, Val366, Met367 e Met471. Cabe ressaltar que o fármaco isavuconazol apresenta interações do tipo hidrofóbicas e polares com estes resíduos e sua acomodação ocorre, ainda, pelas forças de van der Waals propiciadas pelo bolsão hidrofóbico presente no sítio ativo da CYP51 (SHARMA et al., 2020).

Tendo como base as informações apresentadas, inibidores da enzima CYP51 podem ser planejados com o emprego de um conjunto de abordagens computacionais e com objetivo de ação específica contra o protozoário *Acanthamoeba* para o tratamento da ceratite amebiana.

1.3 Ceratite por *Acanthamoeba* spp.: aspectos biológicos, epidemiologia e alternativas terapêuticas

O cenário atual reflete que cerca de 2,2 bilhões de pessoas em todo o mundo possuem algum dano em sua acuidade visual. Dentre os danos oculares estão as doenças que promovem

a opacidade da córnea, responsáveis por 4,2 milhões de casos (WHO, 2019). A perda da integridade da córnea leva a um prejuízo na passagem da luz através do epitélio até a retina, tornando-se esbranquiçado e diminuindo gradativamente a acuidade visual até a perda completa do sentido (BRASIL, 2021). A doença ceratite causada por ação microbiana está entre as doenças que geram opacidade na córnea devido a ulceração e intenso processo infeccioso gerado no decorrer da patologia. Dentre os agentes infecciosos mais comuns está o protozoário do gênero *Acanthamoeba* (MORIYAMA; HOFLING-LIMA, 2008; PENS et al., 2008).

A ceratite por *Acanthamoeba* é considerada uma infecção de caráter raro, atingindo de 1 a 9 em cada 100.000 indivíduos, mas potencialmente devastadora por sua capacidade em ocasionar danos permanentes a acuidade visual ou mesmo a cegueira. Porém, ainda está atrelada ao difícil diagnóstico e tratamento (CDC, 2014; LACERDA; LIRA, 2021; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; PAGE; MATHERS, 2013). A maior incidência da ceratite por *Acanthamoeba* está em usuários de lente de contato, população em potencial risco de desenvolvimento da doença, representando 75-85% dos casos reportados (GOMES et al., 2016; KHAN, 2006; PAGE; MATHERS, 2013).

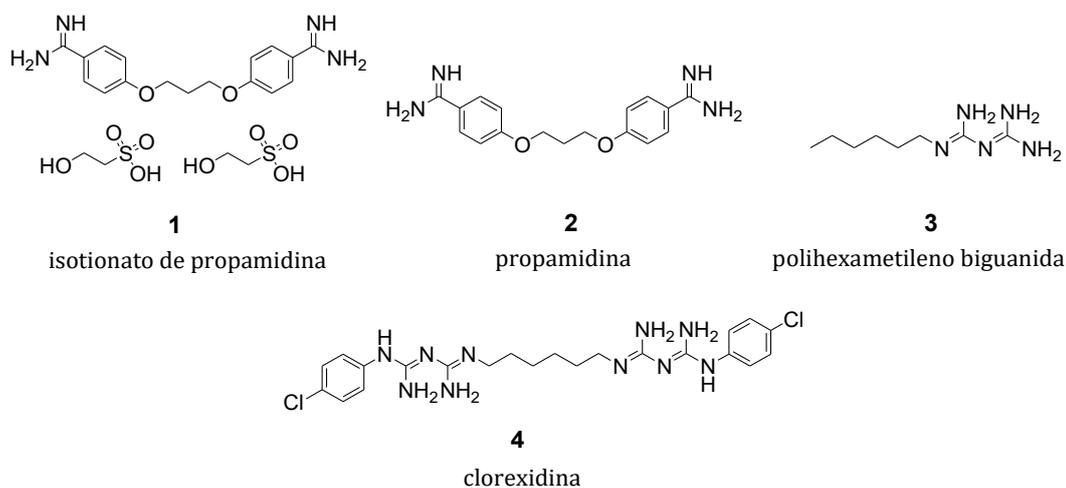
Amebas do gênero *Acanthamoeba* são organismos unicelulares de vida livre que possuem duas formas evolutivas: o trofozoíto, forma ativa, móvel e infectiva na doença; e o cisto, forma considerada latente e resistente do protozoário. As formas de vida podem estar presentes como trofozoíto ou como cisto em predominância dependendo das condições ambientais. Cabe salientar que 30% da parede do cisto é composta por celulose, o que favorece a resistência desta forma de vida e previne o acesso que substâncias nocivas para o protozoário. Desta forma, a compreensão das bases bioquímicas de formação do protozoário é fundamental visando o planejamento de novos fármacos para o tratamento de doenças desencadeadas pela *Acanthamoeba* spp. (LORENZO-MORALES et al., 2013). O protozoário *Acanthamoeba* é considerado um organismo oportunista completando seu ciclo de vida no ambiente, porém pode ocasionar doenças em contato com tecidos humanos lesionados. Exemplos dessas doenças estão a infecção fatal no sistema nervoso central (SNC) conhecida como encefalite granulomatosa amebiana (*em inglês* GAE), as infecções pulmonares e cutâneas e pele; e a ceratite (PINTO et al., 2021; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). Na ceratite causada pelo protozoário, a patogênese se desencadeia pela adesão da *Acanthamoeba* spp. na célula corneal do hospedeiro, seguida da secreção extracelular de proteases e culmina na fagocitose, possibilitando a morte celular e dano tecidual. Ao contrário de outras infecções oculares, a inflamação e degradação do tecido corneal promovida pela *Acanthamoeba* spp. fica restrita a esta camada tecidual, uma vez que casos de ceratite intraocular são raros (CLARKE;

NIEDERKORN, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2013; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

Como consequência da infecção promovida pela *Acanthamoeba* os sintomas desencadeados são de dor ocular intensa, vermelhidão, visão embaçada ou escurecida, fotofobia, sensação de corpo estranho nos olhos e lacrimejamento. Estes sintomas podem se estender por semanas ou até meses (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; KHAN, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2013). Os casos de ceratite por *Acanthamoeba* são normalmente descritos em associação a traumas no tecido corneal associado ao uso prolongado das lentes de contato, diminuição progressiva da lubrificação lacrimal na região e geração de biofilme, facilitando o mecanismo de patogênese (CARNT; STAPLETON, 2016; KHAN, 2006; LACERDA; LIRA, 2021; PAGE; MATHERS, 2013).

Até o presente momento não há tratamento para ceratite por *Acanthamoeba* que apresente eficácia contra trofozoítos e cisto. A associação farmacológica entre agentes antimicrobianos tópicos é uma alternativa adotada devido a sua atividade contra os trofozoítos, como por exemplo as diamidinas aromáticas como isotionato de propamidina (1), polihexametileno de biguanida (PHMB) (3), clorexidina (4), dibromopropamidina e hexamidina (Figura 7) (KHAN, 2006; LACERDA; LIRA, 2021; SZENTMÁRY et al., 2019). Por outro lado, a literatura aponta que o uso prolongado dos agentes antimicrobianos implica: (i) na toxicidade das células corneais e (ii) desenvolvimento de resistência do protozoário com o processo de formação do cisto, o que têm tornado o tratamento cada vez mais desafiador (KHAN, 2006; LACERDA; LIRA, 2021; LEE et al., 2007).

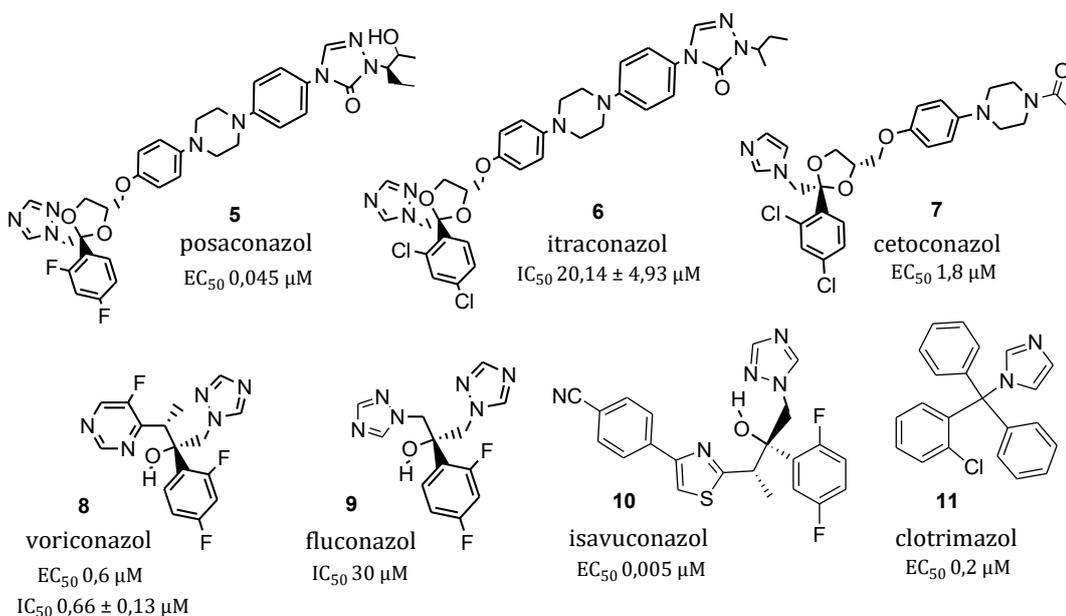
Figura 7. Estruturas dos fármacos utilizados para o tratamento da ceratite por *Acanthamoeba*.



Fonte: a autora

De acordo com este cenário, o reposicionamento de fármacos pertencentes a classe dos antifúngicos azólicos tem sido estudado ao longo dos anos como proposta para o tratamento de doenças provocadas pelo protozoário do gênero *Acanthamoeba*. Tendo como exemplo o posaconazol (5), itraconazol (6), cetoconazol (7), voriconazol (8), fluconazol (9), isavuconazol (10) e clotrimazol (11) (Figura 8) têm demonstrado eficácia no tratamento da doença, assim como em associação com biguanidinas e diamidinas (Figura 8). O fármaco voriconazol evidenciou resultados de eficácia contra ambas as formas de vida da *Acanthamoeba* spp. e diminuição da proliferação celular. Neste sentido, o isavuconazol e posaconazol demonstram resultados de eficácia positivos com atividade contra trofozoítos em baixas concentrações. O isavuconazol, ainda, demonstrou prevenção contra a formação de cistos. Além disso, o voriconazol apresentou atividade inibitória e efetiva frente aos trofozoítos. Tendo isso em vista, o uso de fármacos antifúngicos azólicos demonstram uma alternativa de tratamento para a ceratite amebiana e, por outro lado, estudos para a descoberta de novos compostos para tratamento pode ser estimulada a partir destes fármacos (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2019; LAMB et al., 2015; LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018; MARTÍN-NAVARRO et al., 2013; SHARMA et al., 2020; SHING et al., 2020; THOMSON et al., 2017; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

Figura 8. Estruturas químicas de derivados azólicos utilizados para o tratamento da ceratite por *Acanthamoeba*.



IC₅₀: concentração inibitória mínima para inibição de 50% das formas de vida do protozoário do gênero *Acanthamoeba*; EC₅₀: concentração efetiva mínima para inibição de 50% das formas de vida do protozoário do gênero *Acanthamoeba*. N/C: não consta. Fonte: a autora. Valores de atividade contidos nas bibliografias

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2019; LAMB et al., 2015; LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018; MARTÍN-NAVARRO et al., 2013; SHING et al., 2020; THOMSON et al., 2017

É conhecido que os antifúngicos azólicos possuem mecanismo de ação na enzima 14 α -demetilase, inibindo a síntese do ergosterol (LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018). Desta forma, o presente estudo permitiu a busca por compostos ativos contra o parasito *Acanthamoeba* com o objetivo de proporcionar alternativas de tratamento para a doença ceratite por *Acanthamoeba*, explorando a enzima CYP51 como alvo molecular. Cabe destacar ainda que nosso grupo de pesquisa vem realizando ao longo de anos estudos relacionados a doenças parasitárias e o presente trabalho vem para acrescentar conhecimento a esta trajetória (DA ROSA et al., 2017; ZIMMERMANN et al., 2018).

Objetivos

1.4 Objetivo Geral

Identificar potenciais inibidores da enzima 14 α -demetilase (CYP51) de *Acanthamoeba* spp. utilizando estudos *in silico*.

1.5 Objetivos Específicos

- Construir biblioteca de compostos com inibidores da enzima 14- α -demetilase selecionados na literatura para os protozoários *Acanthamoeba* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp.;
- Criar e validar modelos farmacofóricos 3D com base em inibidores da enzima 14 α -demetilase pelo emprego da biblioteca de compostos;
- Elaborar e validar modelos farmacofóricos 3D baseados na estrutura cristalográfica da enzima 14 α -demetilase de *Acanthamoeba castelanii* disponível no banco de dados de estruturas *Protein Data Bank* (PDB);
- Realizar triagem virtual para identificação de compostos que tenham potencial atividade inibitória sobre a enzima 14 α -demetilase;
- Executar a abordagem de *docking molecular* para avaliação das interações dos compostos selecionados na triagem virtual com aminoácidos no sítio ativo da enzima 14 α -demetilase pelo emprego da estrutura cristalográfica;
- Calcular as propriedades físico-químicas de peso molecular, logaritmo de partição (logP), logaritmo de solubilidade (logS), número de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, área de superfície polar e número de ligações rotacionáveis dos compostos selecionados.

Materiais e Métodos

Os estudos computacionais relacionados a modelagem molecular foram desempenhados utilizando Hardware e especificações de software em processador Intel Pentium Core i7 com memória RAM de 8 GB e Windows 10. Os programas, softwares e as bases de dados utilizados para o desempenho das abordagens de modelagem molecular estão dispostos na tabela abaixo.

Tabela 1. Relação de Programas, Softwares e Bases de Dados empregados para o desenvolvimento das abordagens de modelagem molecular

Programas	Acesso em
Discover Studio 2019	https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download
Osiris DataWarrior	https://openmolecules.org/datawarrior/
GOLD	https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/
MOPAC 2016	http://OpenMOPAC.net
Softwares	Acesso em
CORINA	https://mn-am.biz/products/corina/
PharmaGist	https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/php.php
Pharmit	https://pharmit.csb.pitt.edu/
DUD-E	http://dude.docking.org/
FAF-Drugs4	https://fafdrugs4.rpbs.univ-paris-diderot.fr/index.html
PDB sum	http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html
Bases de Dados	Acesso em
SciFinder*	https://scifinder-n.cas.org/
Web of Science*	https://www.webofscience.ez46.periodicos.capes.gov.br/wos/woscc/basic-search
PubMed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
ScienceDirect	https://www.sciencedirect.com/
ChEMBL	https://www.ebi.ac.uk/chembl/
BINDING database	https://www.bindingdb.org/rwd/bind/index.jsp
Protein Data Bank	https://www.rcsb.org/
SPECS	https://www.specs.net/index.php

*Bases de Dados com acesso através do Portal Periódicos CAPES pela Universidade Federal de Santa Catarina. Acesso em: <http://www-periodicos-capes-gov-br.ez46.periodicos.capes.gov.br/>

Modelagem Molecular

1.6 Construção da biblioteca de compostos ativos

Uma biblioteca de compostos ativos foi construída com base na busca de compostos inibidores da enzima 14- α -demetilase descritos na literatura. Tal levantamento bibliográfico considerou artigos depositados nas bases de dados *SciFinder*, *Web of Science*, *PubMed* e *ScienceDirect*, bem como nas quimiotecas *ChEMBL* (DAVIES et al., 2015; GAULTON et al., 2017) e *BINDING Database* (GILSON et al., 2016). Não houve delimitação temporal para a seleção dos artigos, apesar dos selecionados terem sido publicados entre os anos de 2007-2020. As palavras-chave utilizadas envolveram a enzima “14-alfa-demethylase” ou “CYP51”, bem como os protozoários “*Acanthamoeba*”, “*Trypanosoma cruzi*” e “*Leishmania*”. Como critérios de seleção dos compostos foram considerados aqueles que possuíam presença de estudos *in vitro* na enzima 14- α -demetilase *Acanthamoeba* spp. ou 14- α -demetilase de *Trypanosoma cruzi* ou 14- α -demetilase *Leishmania* spp., assim como também valores de atividade biológica frente as formas de vida dos protozoários mensurados. Desta forma, foram considerados valores intervalo de K_D 1,7 nM a 0,75 μ M; IC_{50} 0,1 μ M a 30 μ M; EC_{50} 1,6 nM a 4,4 nM; e 0,032 μ M a 0,715 μ M. Como critério de exclusão do estudo foram considerados os compostos com valores de atividade com amplitude, a exemplo de um valor de atividade maior (>), menor (<), maior ou igual (\geq) e menor ou igual (\leq) a um valor.

Uma vez selecionados os compostos foram categorizados de acordo a inibição da enzima CYP51 para cada protozoário, resultando nos grupos subsequentes: (A) inibidores da enzima 14- α -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp.; (B) inibidores da enzima 14- α -demetilase ativos de *Trypanosoma cruzi*; (C) inibidores da enzima 14- α -demetilase ativos para *Leishmania* spp. Os grupos estruturais foram desenhados separadamente em formato bidimensional (2D) no programa *ChemBio Draw® Ultra*, com obtenção respectiva do código SMILES. Em seguida, os compostos passaram por uma série de etapas de preparação tendo início na conversão em formato 3D por meio da ferramenta da CORINA (CORINA, 2019) e geração do formato “*sybyl mol2” no programa *DS Visualizer – Discover Studio 2019*. Com a obtenção do formato tridimensional, os compostos foram empregados nas etapas subsequentes.

1.7 Elaboração dos modelos farmacofórico

Os modelos de farmacóforo foram criados por meio de duas abordagens: com base nos inibidores da enzima CYP51 para os protozoários *Acanthamoeba* spp., *Trypanosoma cruzi* e

Leishmania spp. (LBDD), e considerando a estrutura cristalográfica da enzima CYP51 de *Acanthamoeba castellanii* (SBDD).

Os modelos de farmacóforos baseados nos inibidores foram elaborados considerando a biblioteca de compostos ativos previamente criada, totalizando cento e sete compostos, e com o emprego do software *PharmaGist* (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008) - plataforma online e de livre acesso. Visando facilitar a compreensão dos resultados, o envio dos inibidores foi realizado conforme os seguintes grupos: (A) inibidores da 14- α -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp.; (B) inibidores da 14- α -demetilase ativos de *Trypanosoma cruzi*; (C) inibidores da 14- α -demetilase ativos para *Leishmania* spp.

O *Pharmagist* realiza a construção dos modelos farmacofóricos com base na sobreposição da estrutura dos compostos inseridos e, ainda, considera compostos referência para a elaboração do modelo. As configurações adotadas para o experimento consideraram o fármaco voriconazol (a2) como molécula mais ativa dentre os inibidores de *Acanthamoeba* spp., o fármaco posaconazol (a8) dentre os inibidores de *Trypanosoma cruzi*, e o composto VNI (a39) dentre os inibidores de *Leishmania* spp. (Figura 10) (DOYLE et al., 2010; HARGROVE et al., 2013; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2019; LAMB et al., 2015; LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018).

Os critérios estabelecidos para seleção de modelos de farmacóforos gerados pelo programa foram considerados de forma a representar a maior diversidade estrutural e aproximação com a realidade de ligação enzimática. Sendo assim, os critérios adotados seguiram: o número total de candidatos de farmacóforo gerados, o valor de *score* decorrente da sobreposição espacial de moléculas, a quantidade de moléculas sobrepostas por grupo e suas *features* (características químicas) geradas para cada estrutura modelo (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008; VUORINEN; SCHUSTER, 2015). Assim, os farmacóforos selecionados contemplaram: (1) modelo de farmacóforo com melhor valor de *score* dentre farmacóforos modelos gerados; (2) farmacóforo com o maior número de moléculas sobrepostas; e (3) farmacóforo com o maior valor de *score* considerando os inibidores voriconazol, posaconazol ou VNI.

A construção dos modelos de farmacóforo baseados na estrutura foram desempenhados a partir da estrutura cristalográfica depositada no banco de dados *Protein Data Bank* e do software *Pharmit*. Foram utilizadas como palavras-chave os termos “CYP51 *Acanthamoeba*” e “14-alpha-demethylase” durante o período de março a outubro de 2020 para seleção da estrutura no PDB. Para o desenvolvimento da abordagem, foi selecionada a estrutura da enzima CYP51 de *Acanthamoeba castellanii* complexada com o fármaco isavuconazol [PDB ID: 6UX0]

(SHARMA et al., 2020) e informações a respeito da obtenção da estrutura proteica estão contidos na Tabela A4, Anexo. Um gráfico de Ramachandran foi gerado pelo servidor online PROCHECK (LASKOWSKI, 1996) por meio do PDBsum como forma de avaliar a qualidade do cristal proteico pela posição dos seus resíduos de aminoácido. Os modelos de farmacóforo foram gerados de forma automática pelo software *Pharmit* e posteriormente validados.

1.8 Validação e Refinamento dos Modelos de Farmacóforo

Para avaliação da qualidade dos farmacóforos gerados, os modelos entraram em contato com a biblioteca de compostos ativos, a qual possui inibidores da enzima CYP51, e com compostos inativos teóricos construídos para a etapa de validação. Para execução desta etapa foi empregado o software *Pharmit*.

Os compostos inativos teóricos, ou também conhecidos como *decoys*, foram gerados pelo emprego da base de dados DUD-E da Universidade da Califórnia (MYSINGER et al., 2012) resultando na obtenção de confôrmeros inativos a partir das moléculas ativas pertencentes a base de compostos previamente selecionados. Desta forma, a etapa de validação reuniu cerca de 7.400 compostos ativos e *decoys* para a enzima CYP51, considerando os microrganismos *Acanthamoeba* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp., para a construção de bibliotecas públicas no *Pharmit*.

O próximo passo se baseia no contato dos modelos de farmacóforo com a biblioteca de compostos e avaliação da capacidade do farmacóforo em encontrar o maior número de moléculas ativas (*hits*) para o alvo e descartar as inativas. Para a avaliação deste reconhecimento, primeiramente foi calculado o fator de enriquecimento relacionado a construção do modelo farmacofórico ($EF_{\text{construção}}$) considerando os inibidores ativos da enzima CYP51 e os *decoys* construídos em sua totalidade (Equação 1). Em seguida, a cada contato dos modelos com a biblioteca de compostos foi gerado um outro fator de enriquecimento, pelo programa, que está relacionado a validação do modelo ($EF_{\text{validação}}$). Dessa forma, foi possível estabelecer um paralelo entre os valores de fator de enriquecimento gerados, e assim obter um parâmetro de qualidade para os modelo de farmacóforo (VUORINEN; SCHUSTER, 2015).

$$\text{Fator de Enriquecimento (EF)} = \frac{(VP)/(TPN)}{(TP)/(TDB)}$$

Equação 1. Cálculo do fator de enriquecimento EF. VP: número total de compostos ativos encontrados; TPN: número total de ativos e inativos encontrados; TP: número total de ativos no banco de dados de ativos. TDB: número total de compostos nos bancos de dados.

Ainda, para o refinamento, os modelos de farmacóforo tiveram suas características (*features*) excluídas e/ou adicionadas, seus tamanhos aumentados e/ou diminuídos, e comparados com as *features* existentes nos compostos mais ativos de cada série com intuito de proporcionar qualidade aos modelos formados.

1.9 Triagem Virtual e Seleção de Compostos

Para a triagem virtual de compostos, o banco de dados *SPECS* foi selecionado e obtido por meio de *download* no site de vendas www.specs.net, contendo 1.083.888 de estruturas 3-D (versão de 05/2021) com as mais diversas naturezas, podendo citar compostos de origem natural, sintética e fragmentos. Este banco de dados foi inserido no software *Pharmit* e uma triagem de moléculas transcorreu por meio da aplicação separadamente dos modelos de farmacóforo baseado nos inibidores da enzima CYP51 e na estrutura da enzima, com obtenção dos valores de RMSD para cada análise. O parâmetro de RMSD, ou desvio quadrático médio do raio, permite uma relação entre as características apresentadas por grupos funcionais pertencentes ao composto selecionado e as características do farmacóforo resultante da sobreposição entre eles, pela avaliação de suas semelhanças. A ocorrência de sobreposição entre os átomos é sugerida com RMSD inferior a 2Å (RMSD < 2Å) (VUORINEN; SCHUSTER, 2015). Por meio desta avaliação, compostos com potencial atividade inibitória da enzima 14 α -demetilase foram filtrados.

A etapa de triagem virtual contou ainda com uma série de critérios de refinamento dos compostos, iniciando com o emprego do filtro PAINS por meio do software FAF-Drugs4 (LAGORCE et al., 2015) e eliminação de compostos duplicados selecionados anteriormente. Em sequência foram avaliadas as propriedades *drug-likeness* dos compostos com ênfase no alvo molecular, tendo como referência as propriedades físico-químicas dos inibidores da enzima CYP51 de *Acanthamoeba* spp., calculadas pelo programa Osiris DataWarrior (SANDER et al., 2015; YANG et al., 2020a). Os inibidores apresentaram peso molecular com intervalo entre 306 a 706 Da; log *P* entre 1,5 e 5,5; log *S* entre -8,0 e -2,5; número de aceptores de ligação de hidrogênio entre 2 e 12; número de doadores de ligação de hidrogênio entre zero e 6; área de superfície polar (TSA) entre 220 e 520; e número de ligações rotacionáveis entre 5 e 12. Sendo assim, as propriedades físico-químicas e seus respectivos intervalos foram empregados nesta última etapa da triagem virtual.

Como resultado, foram selecionados compostos com potencial ação inibitória para a enzima CYP51 de *Acanthamoeba* e, os mesmos seguiram para a etapa de *docking* molecular e inspeção visual das interações e conformações destes no sítio de ligação.

1.10 Estudos de *Docking* Molecular dos Compostos Triados

Os estudos de *docking* molecular foram conduzidos no programa GOLD (versão 2020.2.0) (JONES et al., 1997). A estrutura da enzima 14- α -demetilase selecionada está complexada com o fármaco isavuconazol [PDB ID: 6UX0] e foi obtida por difração de raio-X com resolução de 2,93Å (SHARMA et al., 2020). A preparação da estrutura proteica foi conduzida pela verificação da presença dos resíduos de aminoácidos essenciais para interação no sítio ativo e conservação do grupamento heme, retirada das moléculas de água e adição dos hidrogênios na estrutura. O estudo de *docking* rígido foi realizado pela fixação de todas as ligações rotacionáveis.

Com o propósito de validação do método, um estudo de *redocking* foi conduzido. Para isso o fármaco isavuconazol foi desenhado em formato tridimensional (.mol2) e teve sua geometria otimizada pelo método semiempírico PM7 (STEWART, 2013) no programa MOPAC 2016. No programa GOLD foram inseridos a estrutura da enzima CYP51 e o fármaco isavuconazol otimizados. Foram considerados para o *redocking* todas as funções de *score* disponíveis no programa, sendo elas CHEMPLP, GOLDScore, CHEMScore e ASP. A delimitação de espaço no sítio ativo capaz de comportar as diferentes conformações dos ligantes foi definida em tamanhos de GRID de 6, 9 e 12Å, assim como o número de corridas para a geração de 10, 50, 100 e 500 poses dos ligantes. Assim, foi avaliado o valor de RMSD entre o isavuconazol desenhado previamente e o mesmo cocrystalizado na proteína.

Após os estudos, o protocolo com os melhores resultados foi empregado para a execução *docking* molecular incluindo os compostos triados na região do sítio ativo da cadeia [A] da enzima. Ao final das simulações, a pose de melhor valor de *score* para cada composto foi selecionada para avaliação visual quanto as interações realizadas. O programa Discovery Studio 2019 (versão 2019.1.0.18287) foi empregado para a inspeção visual dos resultados por meio da avaliação das interações entre os compostos de melhor valor de *score* e os aminoácidos do sítio de ligação e o grupamento heme da CYP51. Foram consideradas as interações apontadas pelo programa, bem como foram estudadas possíveis interações com os resíduos de aminoácido reportados na literatura importantes para interação com o inibidor ativo isavuconazol: Tyr114, Phe116, Ser117, Phe121, Val126, Tyr127, Ala290, Phe293, Ala294, Leu363, Phe365, Val366,

Met367 e Met471. A avaliação das interações se deu pela determinação da distância entre os átomos do ligante e dos aminoácidos. Para cada interação estabelecida, foram considerados parâmetros de distância descritos na literatura (Tabela 1) para interações de hidrogênio, interação cátion- π , interação alquil-arila e interação do tipo π estabelecidas em sistemas aromáticos (empilhamento π , forma em T, deslocamento em paralelo e polaridade invertida) (ARRAS et al., 2022; FOKOUE et al., 2020; PATRICK, 2013). Ainda, foram consideradas interações com os resíduos de aminoácido que não possuem distância padrão descrita. A possibilidade de ligação coordenada com o íon ferro no grupo heme foi avaliada considerando a presença um heteroátomo com distância $\leq 2,64\text{\AA}$ do íon ferro para a formação da ligação (SHARMA et al., 2020).

Tabela 2. Relação de distância de interação entre ligante e resíduos de aminoácido descritos pela literatura.

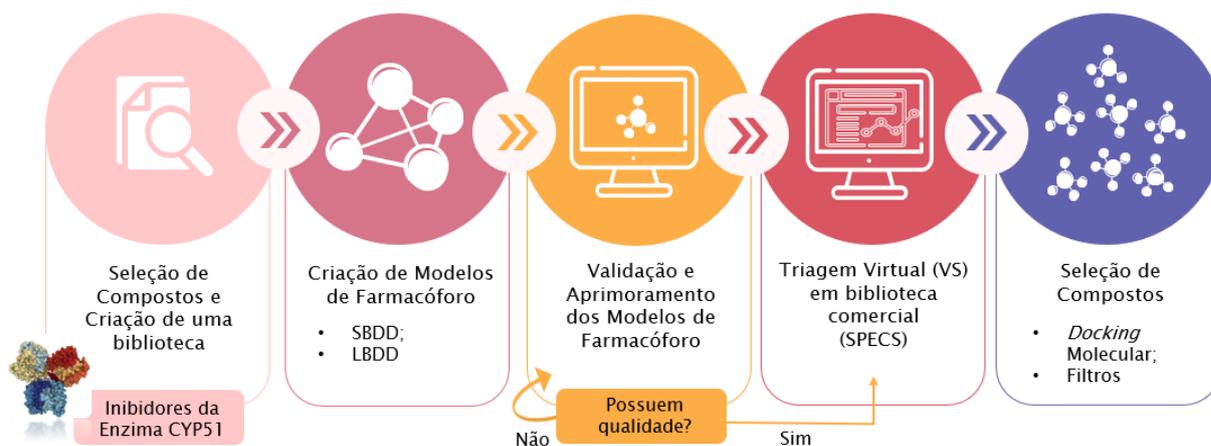
Tipo de Interação	Distância (Å)
Ligação de Hidrogênio	1,7 – 2,4
Interação cátion- π	2 - 4
Interação Alquil-Arila	3,4 – 4,4
Interações do tipo π em sistemas aromáticos	3 - 4

Fonte: FOKOUE et al., 2020; PATRICK, 2013

Resultados e Discussão

As abordagens disponíveis para triagem virtual de compostos podem ser empregadas nas etapas iniciais do processo de descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco. Assim, os estudos computacionais contribuem para a identificação de compostos *hits*, bem como para as etapas subsequentes de aprimoramento das estruturas selecionadas (MACALINO et al., 2015; WANG et al., 2020). Com o objetivo de identificação de compostos *hits* com potencial atividade inibitória da enzima 14 α -demetilase para o protozoário *Acanthamoeba* spp. foram construídos modelos de farmacóforo baseados em estratégias de SBDD e LBDD para auxiliar a seleção de compostos pela abordagem de triagem virtual e *docking* molecular (Figura 9).

Figura 9. Etapas consecutivas do delineamento de estudo para triagem virtual de compostos com a geração e aprimoramento de modelos de farmacóforo.



Fonte: autoria própria. Esquema adaptado de KASERER e colaboradores, 2015.

Os atuais estudos são uma continuação do trabalho desempenhado para conclusão de curso em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Catarina no ano de 2019 (REIS; ZIMMERMANN; BERNARDES, 2019). Durante os estudos foram construídos nove modelos de farmacóforo baseado nos inibidores da enzima 14 α -demetilase dos protozoários *Acanthamoeba* spp. e *Trypanosoma cruzi* com a perspectiva de aplicação dos farmacóforos para triagem virtual e predição das propriedades físico-químicas dos compostos selecionados. A partir disto, no presente estudo foram criados e aprimorados modelos de farmacóforo baseados nos inibidores da CYP51 para *Acanthamoeba* spp. e *Trypanosoma cruzi*; criados modelos de farmacóforo baseado nos inibidores de CYP51 para *Leishmania* spp.; utilizada a estrutura

cristalográfica de CYP51 de *Acanthamoeba castellanii* para geração de modelos baseados na abordagem SBDD e emprego destes modelos na triagem virtual para investigação compostos *hits*.

1.11 Construção e validação dos modelos de farmacóforo gerados por abordagem LBDD: inibidores da enzima CYP51 de *Acanthamoeba* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp.

Os inibidores da enzima CYP51 para o protozoário *Acanthamoeba* spp. foram selecionados para a construção de modelos de farmacóforo baseado em ligantes. No início do presente estudo a estrutura da enzima CYP51 não havia sido depositada no banco de dados de proteínas (PDB) em sua forma cristalizada. Então, com o objetivo de explorar a região de ligação pertencente a enzima 14 α -demetilase, modelos de farmacóforo baseado nos inibidores da enzima de *Acanthamoeba* spp. foram construídos e, comparações entre estes modelos e os farmacóforos construídos com base nos inibidores de CYP51 dos protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. foram estabelecidas. A escolha destes protozoários ocorreu com base na similaridade apresentada entre os resíduos de aminoácido da enzima CYP51 entre amebas e tripanosomatídeos de 33% (LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018; LEPESHEVA; WATERMAN, 2007). A busca de inibidores da CYP51 em artigos científicos e de bancos de dados de compostos resultou na construção de uma biblioteca de compostos de construção que reuniu 102 moléculas: 8 compostos para a protozoário *Acanthamoeba* spp., 78 compostos para *Trypanosoma cruzi* e 19 compostos para *Leishmania* spp. Estes compostos estão representados em anexo a este trabalho nas Figuras A1, A2 e A3, com a nomenclatura a1 – a105. Dentre os compostos selecionados, cabe ressaltar, que os inibidores da enzima CYP51 com os códigos a8, a38 e a98 tratam-se da molécula do posaconazol; e compostos a61 e a87 tratam-se do VFV; e os compostos a39 e a90 trata-se do VNI. Os modelos de farmacóforo foram gerados separadamente no software *Pharmagist*. E, sendo assim, a biblioteca de compostos reunida foi aplicada para a construção dos modelos de farmacóforo baseados nos ligantes.

1.11.1 Modelos de farmacóforo para *Acanthamoeba* spp.

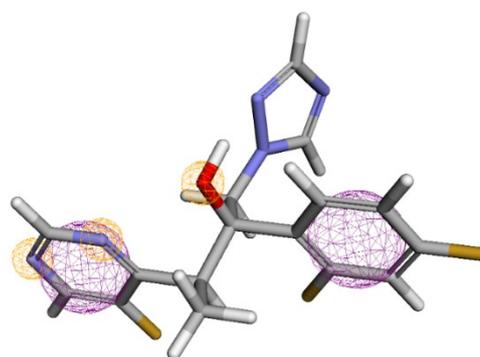
A construção dos modelos de farmacóforo baseados nos ligantes contou com a sobreposição dos inibidores da 14- α -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp., gerando 10 modelos de farmacóforos. Dentre estes farmacóforos, foi selecionado um modelo que contemplasse o fármaco voriconazol (a2) como referência para a sobreposição das demais

estruturas e contasse com o maior valor de *score* (pontuação) gerado pelo *Pharmagist*. O fármaco voriconazol foi considerado como destaque dentre os inibidores da CYP51 de *Acanthamoeba* por seu desempenho em inibir as formas de vida de cisto e trofozoíto do protozoário (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2019; LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

Desta forma, o farmacóforo escolhido, o modelo 1AC, possui valor de *score* de 25.720 Jmol e cinco características (*features*): duas propriedades de aromaticidade e três aceptores de ligação de hidrogênio (Figura 10). Além disso, o modelo considerou três inibidores azólicos (Tabela A1, compostos a1; a2; e a5, Anexo) dentre os demais que compõem a biblioteca de construção.

Figura 10. Representação gráfica e informações sobre o modelo de farmacóforo gerado no *Pharmagist* com base nos inibidores da CYP51 para o protozoário *Acanthamoeba* spp.

Farmacóforo baseado nos inibidores da CYP51 de <i>Acanthamoeba</i> spp.	
Modelo	1AC
Nº de moléculas sobrepostas	3
<i>Score</i>	25,72 Jmol
<i>Features</i>	5
Aromático	2
Aceptor de ligação de hidrogênio	3



Esferas em amarelo do farmacóforo são características de aceptores de hidrogênio; esferas em roxo são características de aromaticidade. *Fonte:* autoria própria. Ilustração obtida por meio do software *Pharmit*

A partir disso, o farmacóforo selecionado passou pela etapa de validação para seu aprimoramento. O fator de enriquecimento teórico foi gerado nesta etapa de construção considerando os inibidores de *Acanthamoeba* spp. e resultou em $EF_{\text{construção}}$ de 69,75 (Equação 2).

$$EF \text{ de construção para } Acanthamoeba = \frac{(8)/(8)}{(8)/(558)} = 69,75$$

Equação 2. Cálculo do fator de enriquecimento (EF) de construção referente à biblioteca de composto inibidores da CYP51 do protozoário *Acanthamoeba* spp.

Em seguida, o modelo de farmacóforo 1AC foi testado utilizando o software *Pharmit* com aplicação dos os inibidores conhecidos da CYP51 de *Acanthamoeba* da biblioteca de construção. Como resultado da validação, o valor de fator de enriquecimento de validação

($EF_{\text{validação}}$) do farmacóforo foi de 22,7 (Tabela 2). Pela diferença apresentada entre os valores de fator de enriquecimento teórico e teste, o farmacóforo 1AC precisou ser aprimorado por meio de estratégias de modificação das características do modelo original, compreendendo em: diminuição e aumento do raio ao entorno de cada *feature*, adição e exclusão de *features*, substituição de características hidrofóbicas posicionadas nas mesmas coordenadas, inserção de características extras presentes no inibidor mais ativo para a série e avaliação quanto a significância dos resultados (VUORINEN e SCHUSTER, 2015).

Tabela 3. Resultados da validação para os modelos de farmacóforo baseados nos inibidores da CYP51 para o protozoário *Acanthamoeba* spp.

Modelo de Farmacóforo validado baseado nos inibidores de CYP51 de <i>Acanthamoeba</i> spp.				
Modelo	Modelo 1AC	Modelo 2AC	Modelo 3AC	Modelo 4AC
<i>Score</i>	25,72 Jmol	25,72 Jmol	25,72 Jmol	25,72 Jmol
Aceptores	3	4	3	3
Aromaticidade	1	1	1	1
Hidrofobicidade	0	0	1	1
$EF_{\text{validação}}$	22,7	50,0	50,0	50,0
Nº de compostos filtrados	89	5	6	3

Para validação dos modelos, *features* de acceptor de ligação de hidrogênio e hidrofobicidade do fármaco voriconazol e uma *feature* de hidrofobicidade do fármaco itraconazol foram adicionadas. Com a implementação das estratégias propostas, o modelo 1AC deu origem aos farmacóforos 2AC, 3AC e 4AC e, estes entraram em contato com a biblioteca de compostos para a validação. Desta forma, o principal resultado da validação dos modelos foi evidenciado pela melhora significativa dos valores de fator de enriquecimento, ou seja, pela aproximação dos valores de $EF_{\text{construção}}$ e do $EF_{\text{validação}}$ para os inibidores de *Acanthamoeba* spp. Ainda, foi obtido uma diminuição do número total de compostos reconhecidos por cada farmacóforo. Por outro lado, os modelos contaram com maior reconhecimento de compostos ativos frente aos inativos, evidenciando alto grau de qualidade dos modelos, que podem ser evidenciados com mais detalhes na Tabela A5 – Anexo. Ao final da validação desta série foram obtidos três farmacóforos (modelo 2AC, modelo 3AC e modelo 4AC) criados a partir do modelo inicial.

1.11.2 Modelos de farmacóforo para *Trypanosoma cruzi*

Para a geração do modelo de farmacóforo baseado nos inibidores da 14- α -demetilase ativos para *Trypanosoma cruzi* foi considerado como molécula referência o posaconazol (a38),

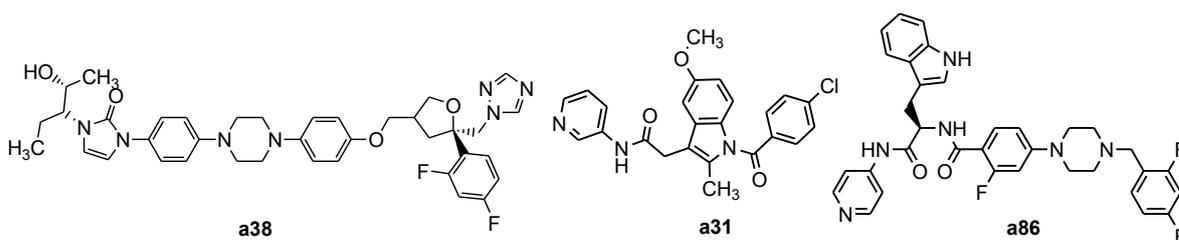
pela sua maior seletividade e interação com o alvo molecular, e o programa *Pharmagist* para a geração dos modelos, presente na Figura A2 - Anexo (DOYLE *et al.*, 2010; HARGROVE *et al.*, 2013).

Três modelos de farmacóforos foram selecionados do total de modelos gerados pelo programa. Os modelos correspondem ao farmacóforo com maior número de moléculas sobrepostas (modelo 1TC), um modelo com maior valor de *score* gerado pelo programa (modelo 2TC) e um modelo que considerando o fármaco posaconazol dentre os compostos sobrepostos (modelo 3TC) (Tabela 3). Apesar do posaconazol ter sido indicado como molécula referência para a sobreposição dos compostos, o programa *Pharmagist* considerou os compostos a31 e a86 como moléculas referenciais para a geração dos modelos 1TC e 2TC (Figura 11).

Tabela 4. Modelos de farmacóforo gerados pelo *Pharmagist* baseados nos inibidores da CYP51 para o protozoário *Trypanosoma cruzi*.

Modelos de Farmacóforo de <i>Trypanosoma cruzi</i>			
Modelo	1TC	2TC	3TC
Nº de moléculas sobrepostas	13	7	8
<i>Score</i>	40,00 Jmol	67,75 Jmol	30,84 Jmol
Molécula de Referência	a31	a86	posaconazol (a38)
<i>Features</i>	5	12	5
Aromático	2	4	2
Hidrofobicidade	0	1	1
Doador de ligação de hidrogênio	1	3	0
Aceptor de ligação de hidrogênio	1	3	2
Positivo	1	1	0

Figura 11. Representação estrutural dos inibidores da enzima 14 α -demetilase para *Trypanosoma cruzi* considerados como referência para geração dos modelos de farmacóforo.



Fonte: autoria própria. Desenho das estruturas no programa ChemBio Draw® Ultra

É possível confirmar a presença de características químicas (*features*) de aromaticidade e de aceptores de ligação de hidrogênio nos modelos de farmacóforo a partir em inibidores da CYP51 de *Trypanosoma cruzi*, com diferença quanto a quantidade das mesmas. Com relação as *features* de hidrofobicidade, de doador de ligação de hidrogênio e grupos ionizáveis positivos foi observado variação quanto a sua presença entre os modelos. Estas diferenças foram melhor avaliadas e confirmadas na etapa de validação.

Com estes resultados, os farmacóforos passaram pela etapa de validação. O Fator de Enriquecimento teórico ou de construção (EF_{construção}) foi calculado levando em consideração os inibidores de CYP51 para a espécie de *Trypanosoma cruzi* e resultou em 76,51 (Equação 3).

$$\text{EF de construção para } \textit{Trypanosoma cruzi} = \frac{(78)/(78)}{(78)/(7968)} = 76,51$$

Equação 3. Cálculo do fator de enriquecimento (EF) de construção referente à biblioteca de composto inibidores da CYP51 para o protozoário *Trypanosoma cruzi*

Tabela 5. Resultados da validação para os modelos de farmacóforo baseados nos inibidores da CYP51 para o protozoário *Trypanosoma cruzi*.

Modelo de Farmacóforo validado baseado nos inibidores de CYP51 de <i>Trypanosoma cruzi</i>				
Modelo	1TC1	1TC2	2TC	3TC
<i>Score</i>	40,00 Jmol	40,00 Jmol	67,75Jmol	30,84 Jmol
Doadores	1	2	1	0
Aceptores	2	1	2	3
Aromaticidade	2	2	2	2
EF _{validação}	60,8	76,0	76,0	76,0
Nº de compostos filtrados	7	8	33	1
Característica dos compostos	Ativos e <i>decoys</i>	Ativos	Ativos e <i>decoys</i>	Ativo

Com a etapa de validação, os farmacóforos mostraram melhora nos resultados acerca dos valores de fator de enriquecimento validação (EF_{validação}). Os valores de EF obtidos ao decorrer desta etapa demonstrou valores próximos ao EF_{teórico} de 76,51 calculado anteriormente, implicando assim em uma ampliação na qualidade dos farmacóforos pela maior probabilidade de reconhecimento dos compostos ativos frente aos inativos. Além disso, houve uma redução na quantidade de *features* e no número apresentado por cada uma delas. Ao final da validação, foram obtidos 4 modelos de farmacóforo que seguirão para as demais etapas de estudo *in silico*

(Tabela 4). Mais informações a respeito destes modelos podem ser encontradas na Tabela A6 – Anexo.

1.11.3 Modelos de farmacóforo para *Leishmania* spp.

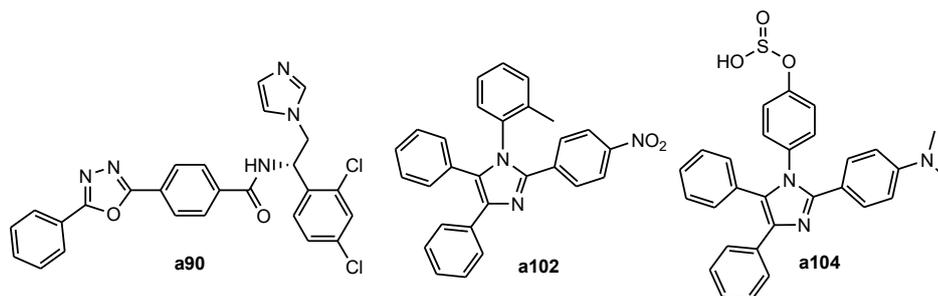
Os modelos de farmacóforo baseados nos inibidores da 14- α -demetilase ativos para *Leishmania* spp. foram construídos pela sobreposição de 19 inibidores da biblioteca de construção (Figura A3). O composto VNI (a90) foi sinalizado como molécula referência para as sobreposições e dentre os farmacóforos gerados pelo programa *Pharmagist*, foram selecionados quatro modelos de farmacóforos (Tabela 5): um modelo com maior número de moléculas sobrepostas (1LS), modelo com maior valor de *score* (2LS), um modelo contando com maior função de *score* e considerando o composto VNI (3LS) e um modelo com maior número de compostos contando com o composto VNI para sobreposição (4LS).

A molécula VNI é descrita na literatura como um potente inibidor experimental de CYP51 em protozoários dos gêneros *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. Por esse motivo foi selecionada como referência para sobreposição dos compostos que apresentaram inibição da enzima CYP51 em *Leishmania* spp. Sua efetividade está em sua ação para leishmaniose visceral e na ação *in vivo* na doença de Chagas (FRIGGERI et al., 2018). Sendo assim, foram selecionados modelos que contavam com o composto VNI para sua construção.

Tabela 6. Modelos de farmacóforo gerados pelo *Pharmagist* baseados nos inibidores da CYP51 para o protozoário *Leishmania* spp.

Farmacóforo de <i>Leishmania</i> spp.				
Modelo	1LS	2LS	3LS	4LS
Nº de moléculas sobrepostas	12	6	4	7
Score	38,14 Jmol	52,50 Jmol	66,14 Jmol	37,94 Jmol
Molécula de Referência	a102	a104	a90	a90
<i>Features</i>	5	7	12	5
Aromático	3	5	5	3
Doador de ligação de hidrogênio	0	0	1	0
Aceptor de ligação de hidrogênio	1	1	5	2
Positivo	1	1	1	0

Figura 12. Inibidores da enzima 14 α -demetilase para protozoário *Leishmania* spp. considerados como referência para geração do modelo de farmacóforo.



Fonte: autoria própria. Desenho das estruturas no programa ChemBio Draw® Ultra

Todos os farmacóforos gerados apresentam características químicas (*feature*) de aromaticidade e de acceptor de ligação de hidrogênio, ao comparar os modelos de farmacóforo gerados baseados em inibidores da CYP51 de *Leishmania* spp. (Tabela 5). Apesar da sinalização do composto VNI como referência para a sobreposição, os compostos a102 e a104 também foram considerados como referenciais pelo programa para a geração dos modelos 1LS e 2LS (Figura 12). Os farmacóforos 1LS e 2LS apresentaram *features* de aromaticidade, acceptor de ligação de hidrogênio e grupo ionizável positivo, variando na quantidade de moléculas sobrepostas e no valor de *score* gerado pelo programa. Comparando os farmacóforos 3LS e 4LS, podem ser evidenciadas diferenças significativas quanto as *features* e o número de moléculas sobrepostas. O modelo 4LS apresenta sete moléculas e uma característica de acceptor de ligação de hidrogênio e de aromaticidade; as quais são encontradas no modelo 3LS, além das *features* de doador de ligação de hidrogênio e grupo ionizável positivo e quatro moléculas para formação do farmacóforo.

Para a etapa de validação, o $EF_{\text{construção}}$ para esta série de inibidores de CYP51 resultou em 63,90, conforme equação 4.

$$EF \text{ de construção para } Leishmania \text{ spp.} = \frac{(19)/(19)}{(19)/(1217)} = 63,90$$

Equação 4. Cálculo do fator de enriquecimento (EF) construção referente à biblioteca de composto inibidores da CYP51 para o protozoário *Leishmania* spp.

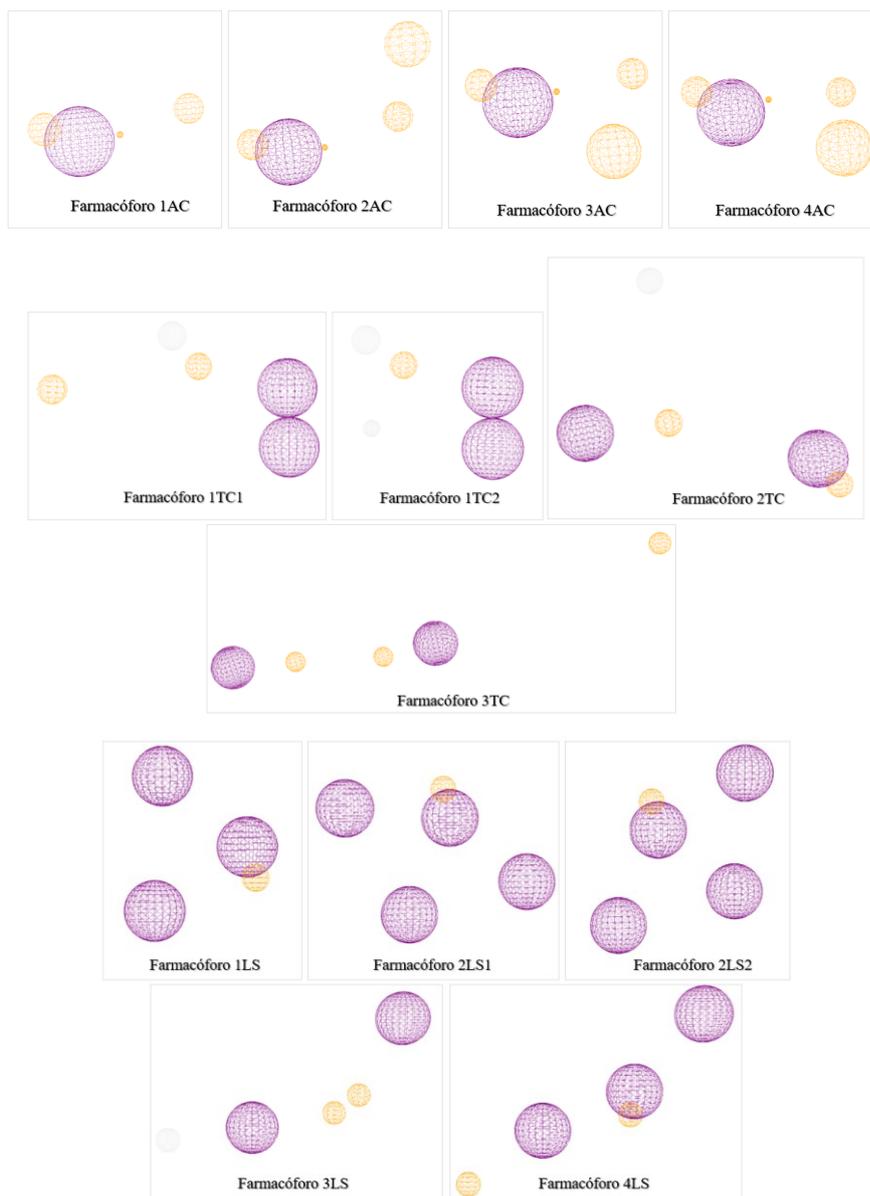
Tabela 7. Resultados da validação para o modelo de farmacóforo referente aos inibidores da CYP51 para o protozoário *Leishmania* spp.

Modelo de Farmacóforo Validado para CYP51 de <i>Leishmania</i> spp.					
Modelo	1LS	2LS1	2LS2	3LS	4LS
<i>Score</i>	38,14Jmol	52,50 Jmol	52,50 Jmol	66,14 Jmol	37,94 Jmol
Doadores	0	0	0	1	0
Aceptores	1	1	1	2	2
Aromaticidade	3	4	4	2	3
EF	23,3	64,0	64,0	64,0	64,0
Nº de compostos filtrados	526	353	353	27	139
Característica dos compostos	Ativos e <i>decoys</i>	Todos ativos	Todos ativos	Ativos	Ativos

Com a realização da etapa de validação os modelos de farmacóforo puderam ser aprimorados por meio da avaliação do fator de enriquecimento e do número de compostos filtrados. Com exceção do modelo 1LS, o $EF_{\text{validação}}$ demonstrou valores próximos ao $EF_{\text{construção}}$ de 63,9 calculado anteriormente. Essa qualidade nos farmacóforos está relacionada ao reconhecimento maior de compostos ativos frente aos inativos. Houve diminuição no número de *features* nos modelos após a validação. O número de estruturas filtradas pelos farmacóforos também apresentou redução, porém mais compostos ativos foram reconhecidos pelos modelos e, assim, contribuindo para qualidade dos modelos. Ao final desta etapa foram gerados cinco farmacóforos demonstrados na Tabela 6 e com mais detalhes na Tabela A7 – Anexo.

Ao todo, foram construídos treze modelos de farmacóforo baseados nos inibidores da enzima 14 α -demetilase dos protozoários *Acanthamoeba* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. Como *features* presentes de forma ampla entre os modelos construídos estão as características de acceptor e doador de ligação de hidrogênio e a característica de aromaticidade, como é possível evidenciar na figura 13, permitindo então a exploração do sítio de ligação da enzima. Assim, compostos que possuam grupo funcionais com estas características podem interagir de forma completar com resíduos de aminoácidos presentes no sítio de ligação da enzima, permitindo assim sua estabilização na enzima.

Figura 13. Representação gráfica de todos os farmacóforos construídos com base nos inibidores da enzima 14 α -demetilase dos protozoários *Acanthamoeba* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp



Os farmacóforos 1AC, 2AC, 3AC e 4AC são modelos baseados nos inibidores de CYP51 de *Acanthamoeba* spp.; 1TC1, 1TC2, 2TC e 3TC, modelos baseados nos inibidores de CYP51 de *T. cruzi*; 1LS, 2LS1, 2LS2, 3LS e 4LS modelos baseados nos inibidores de CYP51 de *Leishmania* spp. As esferas em amarelo do farmacóforo são características de aceptores de hidrogênio; esferas em branco são doadores de hidrogênio; e esferas em roxo são de aromaticidade. *Fonte:* autoria própria. Ilustração obtida por meio do software *Pharmit*

1.12 Construção e Validação de modelos de farmacóforo construídos pela abordagem SBDD: estrutura cristalográfica da enzima CYP51

A estrutura molecular da enzima CYP51 pertencente ao parasito *Acanthamoeba castellanii* foi selecionada no banco de dados de estruturas do PDB para o desenvolvimento das

abordagens computacionais baseadas na estrutura com enfoque na busca por inibidores da enzima pertencente ao parasito do gênero *Acanthamoeba* (BERMAN et al., 2002; SHARMA et al., 2020). Essa estrutura é a única, até o momento, pertencente ao parasito do gênero *Acanthamoeba* depositada neste banco de dados. A estrutura da enzima foi cristalizada com a presença do fármaco isavuconazol no sítio ativo e, assim, essa região pode ser explorada pela investigação das interações do isavuconazol com os aminoácidos presentes na região. As demais informações sobre o cristal podem ser encontradas na Tabela A4 em Anexo.

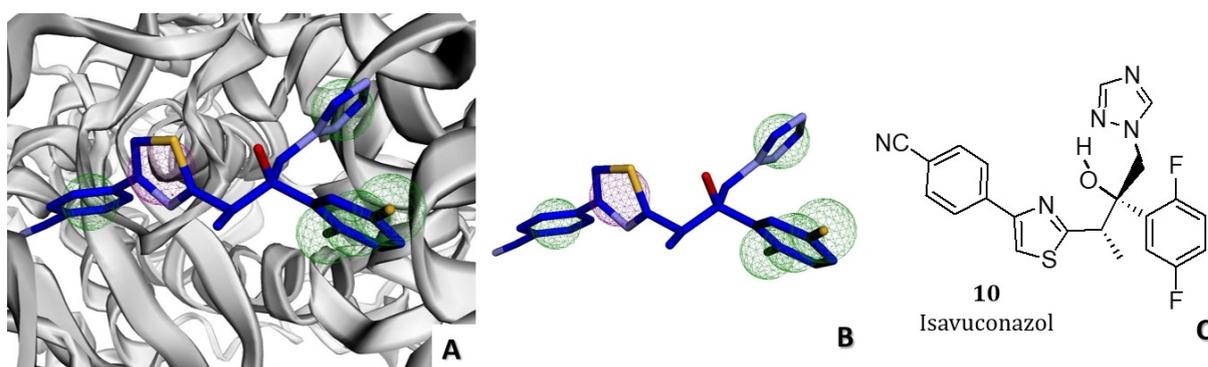
Atualmente, a maior parte das estruturas geradas são realizadas por difração de raio-X ou ressonância magnética nuclear (RMN). Avaliar o desenvolvimento destas abordagens para a construção da cristalografia pode ser um critério de seleção de estruturas para a modelagem molecular, como foi o caso do cristal da enzima CYP51 obtido pelo método de difração de raio-X. Da mesma forma, a resolução da estrutura depositada no banco de dados impacta diretamente no emprego desta em estudos baseados na estrutura de alvos moleculares, os quais requerem alto grau de resolução dos mapas de densidade eletrônica com valores de resolução cristalográfica inferiores a 3,0 Å considerando as posições coordenadas dos átomos (GORE; JAGTAP, 2018; VUORINEN; SCHUSTER, 2015). Desta forma a estrutura da enzima CYP51 selecionada para o estudo conta com grau de resolução estrutural de 2,93 Å.

Na geração do modelo de farmacóforo baseado na estrutura, a enzima complexada com o ligante isavuconazol [PDB ID: 6UX0] foi inserida no *Pharmit* e o modelo de farmacóforo foi gerado de forma automática pelo programa. O farmacóforo possui seis características (*features*): uma propriedade de aromaticidade e cinco propriedades de hidrofobicidade (Tabela 7). É possível observar que as características que compõem o farmacóforo estão relacionadas com grupos funcionais presentes no fármaco isavuconazol (Figura 14) e que são propriedades estéricas e eletrônicas pertinentes para a realização de interações de compostos com os aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima CYP51. Por meio da construção dos modelos de farmacóforo baseados na estrutura da enzima CYP51 de *Acanthamoeba castelanii* foi possível explorar o sítio ativo desta enzima, bem como o emprego das demais estudos de modelagem neste alvo.

Tabela 8. Modelo de farmacóforo gerado pelo software *Pharmit* pelo emprego da estrutura cristalográfica da CYP51 para o protozoário *Acanthamoeba castelanii*.

Farmacóforo baseado na estrutura da CYP51 de <i>Acanthamoeba</i> spp.	
Modelo	Resultado
Ligante	Isavuconazol
<i>Features</i>	6
Aromático	1
Hidrofóbico	5

Figura 14. Representação do modelo de farmacóforo gerado com base na estrutura cristalográfica da enzima CYP51 de *Acanthamoeba castelanii*.



(A) Representação do modelo de farmacóforo em contato com o fármaco isavuconazol (em azul) na presença do complexo enzimático da CYP51 de *Acanthamoeba castelanii* (em cinza). O modelo de farmacóforo é composto pela *feature* de aromaticidade representada pela esfera roxa e pelas *features* de hidrofobicidade representada pelas esferas verdes; (B) Representação do modelo de farmacóforo em contato com o fármaco isavuconazol em configuração tridimensional (3D); (C) Fármaco isavuconazol representação bidimensional (2D). *Fonte:* autoria própria. Criação com base em imagens retiradas do software *Pharmit*.

O modelo de farmacóforo (modelo A_AC) foi validado e suas *features* foram reavaliadas e configuradas para a obtenção de um modelo capaz de triar compostos com potencial atividade no alvo em estudo. O $EF_{\text{construção}}$ utilizado para esta validação corresponde fator de enriquecimento anteriormente calculado, de 69,75. (Equação 2),

Com o objetivo de obtenção de outros farmacóforos a partir do modelo inicial (modelo A_AC) gerado pelo software, foram consideradas estratégias de modificação das características do modelo original para melhora do fator de enriquecimento, as quais foram empregadas anteriormente na validação dos farmacóforos baseados nos ligantes (Tabela 9). Tais estratégias compreenderam em: diminuição e aumento do raio ao entorno de cada *feature*, adição e exclusão de *features*, substituição de características hidrofóbicas posicionadas nas mesmas

coordenadas, inserção de características extras presentes no inibidor mais ativo para a série e avaliação quanto a significância dos resultados. A seguir constam os resultados obtidos desta validação.

Tabela 9. Resultados da validação para o modelo de farmacóforo referente a estrutura de CYP51 para o protozoário *Acanthamoeba* spp.

Modelo de Farmacóforo baseado na estrutura Validado para CYP51 de <i>Acanthamoeba</i> spp.				
Modelo	A_AC	B_AC	C_AC	D_AC
Doadores	0	0	1	0
Aceptores	0	0	0	1
Aromaticidade	1	2	1	1
Hidrofobicidade	5	4	3	4
EF _{validação}	67,4	67,4	67,4	33,7
Nº de compostos filtrados	2	2	3	4
Característica dos compostos	todos ativos	todos ativos	todos ativos	Ativos e inativos

Pela realização desta etapa de validação, os modelos de farmacóforo baseados na estrutura cristalográfica da enzima CYP51 de *Acanthamoeba castellanii*, foram melhorados a partir do original gerado pelo programa. Os modelos B_AC e C_AC obtiveram valores de EF_{validação} que se equiparam ao EF_{construção} de 69,75. Isso demonstra uma melhora em termos de qualidade dos modelos, critério imprescindível para as etapas seguintes. Apesar do modelo D_AC demonstrar um valor de EF_{validação} inferior, o farmacóforo apresenta um alto reconhecimento de compostos ativos e conta com *features* que podem auxiliar no reconhecimento de novos compostos ativos para inibição da enzima CYP51 (Tabela A8 – Anexo).

Ao final da etapa de construção dos modelos de farmacóforo, foram construídos treze farmacóforos baseados nos ligantes e quatro farmacóforos baseados na estrutura da enzima 14 α -demetilase. Para os primeiros modelos, as características de HBA, HBD e de aromaticidade estiveram mais presentes, por outro lado os modelos baseados na estrutura evidenciaram as características de hidrofobicidade e aromaticidade. A presença destas *features* apontam a exploração deste sítio de ligação da enzima 14 α -demetilase com a presença de aminoácidos com características hidrofóbicas e polares, permitindo a realização de interações intermoleculares. Porém, a busca por características que contribuiriam para a seleção de

potenciais inibidores da CYP51 de *Acanthamoeba* spp. e quais são os resíduos de aminoácido que favoreceram as interações com os compostos selecionados em posições mais estáveis foram perguntas que motivaram as próximas etapas deste estudo.

1.13 Triagem virtual de inibidores da enzima CYP51

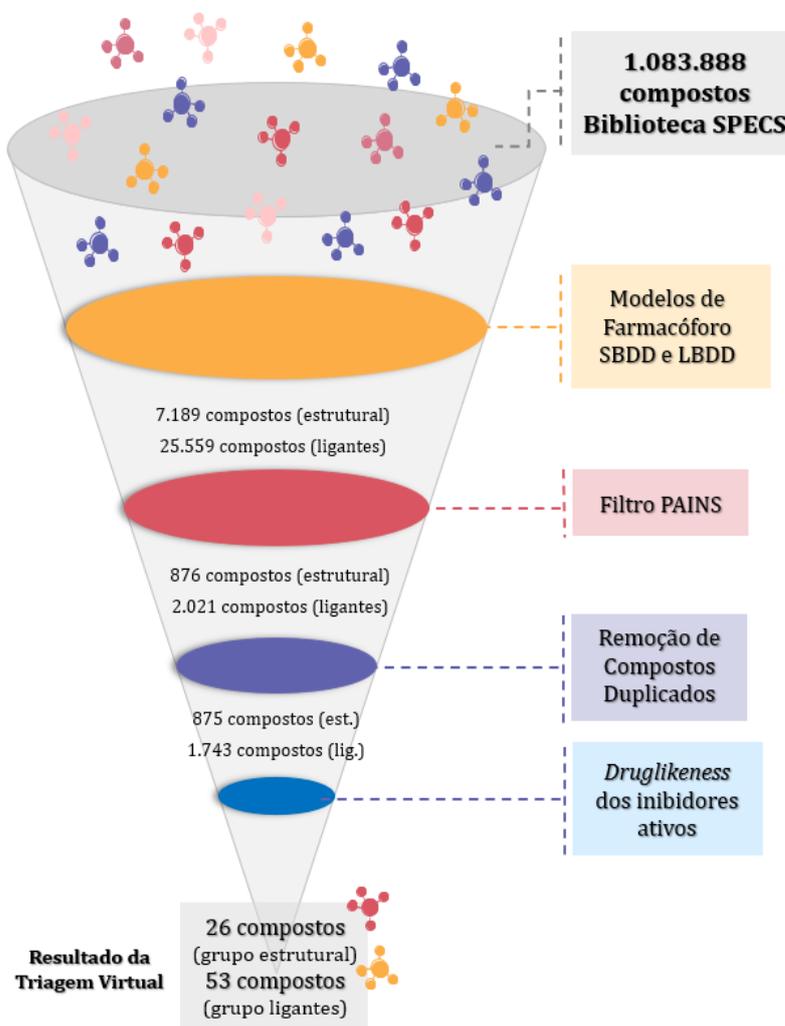
O estudo de triagem virtual (em inglês *virtual screening*) permite a busca e seleção de novos compostos com potencial atividade no alvo molecular com base em simulações computacionais (BUCKLE et al., 2013; LANGER; HOFFMANN, 2006; VUORINEN; SCHUSTER, 2015; YAN et al., 2020; YANG et al., 2020). Neste sentido, a triagem foi desenvolvida no presente trabalho como ferramenta na investigação de compostos com potencial atividade inibitória da enzima CYP51 de *Acanthamoeba* spp. A etapa foi conduzida com o emprego do banco de compostos *SPECS* (www.specs.net) contendo 1.083.888 estruturas 3-D e utilização do software *Pharmit*. Os modelos de farmacóforo baseados na enzima e nos ligantes para o protozoário *Acanthamoeba* spp. foram empregados nesta seleção, com perspectiva do desenvolvimento de posteriores estudos com os demais modelos de farmacóforo. Desta forma, os farmacóforos entraram em contato com a biblioteca de compostos *SPECS* separadamente para a seleção de potenciais inibidores da enzima CYP51. O resultado desta primeira seleção resultou em: 7.189 compostos selecionados com a aplicação dos farmacóforos baseados na estrutura (grupo estrutural) e 25.559 compostos filtrados pelos farmacóforos baseados nos ligantes (grupo ligantes) (Figura 16).

Devido ao grande número de compostos selecionados e a proposta central do estudo, uma próxima etapa de triagem foi executada como filtro *PAINS*. O emprego do filtro *PAINS* tem como objetivo a de eliminação compostos com maior probabilidade de interferirem em ensaios colorimétricos (NERON et al., 2009), contribuindo no direcionamento dos compostos para os ensaios de atividade biológica. Esta etapa foi desempenhada no programa *FAF-Drugs4* (LAGORCE et al., 2015) e contou também com a avaliação de fragmentos com possível toxicidade, sendo considerados estudos iniciais dos parâmetros *ADMET* (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019; WU et al., 2020). Essa triagem resultou na obtenção de 876 compostos relacionados ao grupo estrutural e 2.021 para o grupo ligantes. A partir destas estruturas, um tratamento dos compostos foi realizado, com a eliminação de compostos duplicados resultando em 875 compostos para o grupo estrutura e 1.743 para o grupo ligantes inclusos no estudo.

No desenvolvimento de novos fármacos é preciso retomar o objetivo central do estudo, sobretudo com enfoque no público para o qual o medicamento está sendo desenvolvido.

Considerando o desenvolvimento da ceratite por *Acanthamoeba* a proposta do desenvolvimento de uma formulação oftálmica parece ser a mais indicada tendo em vista a ação local do fármaco com possibilidade de diminuição dos efeitos adversos e melhora no parâmetro de especificidade de ação do fármaco. Estudos quanto às propriedades *druglikeness* dos compostos para formulação oftálmica permanecem escassas na literatura. Sendo assim, a última etapa de triagem considerou as propriedades *druglikeness* dos inibidores ativos da CYP51 para *Acanthamoeba* spp., calculadas pelo programa Osiris DataWarrior (SANDER et al., 2015; YANG et al., 2020a). Com isto foram selecionados 79 compostos com potencial ação inibitória para a enzima CYP51 de *Acanthamoeba*, sendo 26 compostos para o grupo estrutural e 53 no grupo ligantes (Figura 15). Estes compostos seguiram para a etapa de *docking* molecular e inspeção visual das interações e conformações destes no sítio de ligação.

Figura 15. Representação esquemática da série de etapas da triagem virtual para identificação de potenciais inibidores da enzima CYP51 de *Acanthamoeba* spp.



Fonte: autoria própria.

1.14 Estudos de *Docking* Molecular dos Compostos Triados

Os estudos de *docking* molecular foram executados para avaliação do comportamento dos ligantes selecionados na triagem virtual ao interagirem com os resíduos de aminoácido presentes no sítio ativo da enzima CYP51. Bem como foi avaliada a melhor posição em que os compostos se acomodavam na enzima para sua estabilização. Assim, os estudos de *docking* foram conduzidos no programa GOLD (versão 2020.2.0) (JONES et al., 1997), com a seleção da estrutura da enzima 14- α -demetilase a qual possui o fármaco isavuconazol complexado a estrutura [PDB ID: 6UX0] (Tabela A4, Anexo). A estrutura proteica foi inspecionada, principalmente quanto aos resíduos de aminoácido presentes no sítio ativo e a conservação do grupamento heme e seu cofator, o íon ferro para a condução das simulações. Como complementariedade de inspeção da estrutura cristalográfica, um gráfico de Ramachandran (Figura A1, Anexo) foi gerado para avaliação indireta da estereoquímica e geometria dos resíduos de aminoácido pela obtenção de um gráfico baseado em seus ângulos Phi e Psi (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963). Resultados positivos foram obtidos quanto a qualidade da estrutura, com alocação dos resíduos de aminoácido em regiões favoráveis em 98% dos casos e 0,8% em regiões não favoráveis.

Um estudo de *redocking* foi conduzido em um primeiro momento para validação do método de *docking* no contexto da estrutura da enzima 14- α -demetilase e dos compostos triados, garantindo a confiabilidade dos resultados gerados. Por meio deste estudo, os parâmetros a serem adotados ao decorrer das simulações de *docking* foram estabelecidos. O *redocking* conta com a retirada do ligante complexado com a estrutura do alvo, desenho do ligante separadamente, e, por fim, reinserção deste na estrutura proteica comparando com sua pose original adotada. O ligante redesenhado foi o fármaco isavuconazol e essa comparação da distância entre os átomos do ligante cocristalizado e o ligante redesenhado se deu pelo valor de RMSD. Após uma série de modificações nos parâmetros de função de *score*, número de poses e valor de espaço no sítio ativo, foram obtidas as melhores sobreposições do fármaco isavuconazol no interior do sítio ativo da enzima (Figura 16). Os valores de RMSD obtidos para as funções de *score* CHEMPLP, GOLDScore, CHEMScore e ASP estão dentro do valor de inferioridade a 2Å recomendado pela literatura (VUORINEN; SCHUSTER, 2015).

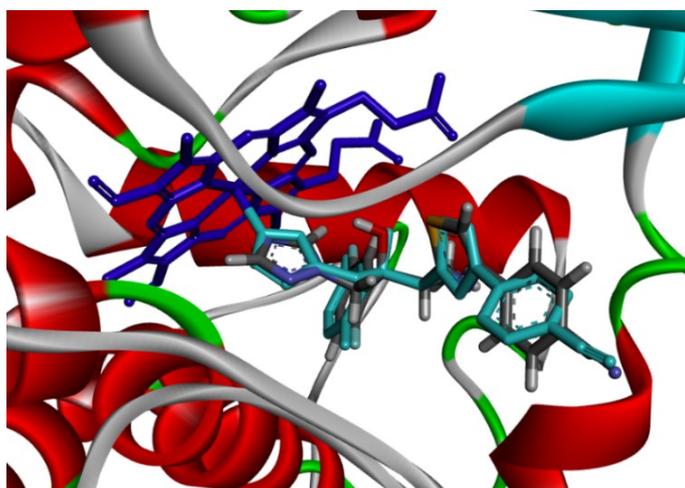
Os parâmetros associados ao melhor resultados de RMSD no *redocking* foram obtidos pelo emprego da função de *score* ASP com um valor de RMSD de 0,53Å obtido pela simulação de 100 poses adotadas pelo ligante (*GA runs*) e espaço (*grid*) de 9Å no sítio ativo (Tabela 10), com sobreposição do fármaco isavuconazol evidenciado na figura 10. A função de *score* ASP

pertence ao grupo de funções de pontuação construídas por meio da avaliação da distância intratômica de contato mais favorável entre ligantes e proteínas. Pelo emprego da função ASP há um resgate das estruturas proteicas depositadas em banco de dados que serviram como base para a construção desta função, por isso também conhecida como funções de pontuação *knowledge-based* (KITCHEN et al., 2004; MOOIJ; VERDONK, 2005; SCHULZ-GASCH; STAHL, 2004).

Tabela 10. Resultados do estudo de *redocking* contendo os melhores valores de RMSD e parâmetros obtidos nas funções de pontuação CHEMPLP, GOLDScore, CHEMScore e ASP.

	Parâmetros do estudo de <i>redocking</i>			
	Funções de pontuação (<i>score</i>)			
	CHEMPLP	GOLDScore	CHEMScore	ASP
Pontuação	95,65	73,76	28,99	69,42
RMSD	0,84	0,69	0,56	0,53
Média do RMSD	0,86	0,73	0,63	0,65
Poses	500	500	500	100
<i>Grid</i>	9Å	12Å	9Å	9Å

Figura 16. Representação da sobreposição das estruturas do fármaco isavuconazol no sítio ativo da enzima CYP51 de *Acanthamoeba castellanii* como resultado do estudo de *redocking*.



Sítio ativo da enzima CYP51 com representação de cadeias α -hélice e folhas- β . O grupamento heme presente em azul; fármaco isavuconazol cocrystalizado com a proteína em azul claro; e o fármaco isavuconazol em sua pose a partir do *redocking* em cores elementares originais. *Fonte:* autoria própria. Ilustração obtida por meio do programa Discovery Studio 2019

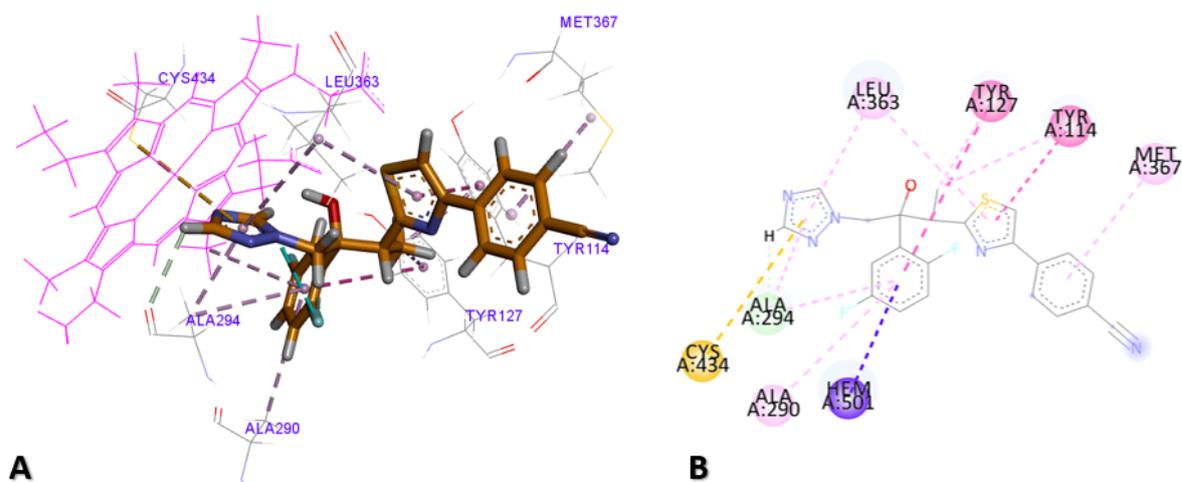
Em seguida, uma análise de inspeção visual foi realizada com o objetivo de avaliar as interações realizadas entre aminoácidos do sítio ativo e o isavuconazol ao final do *redocking*

(Tabela 11) (FISCHER et al., 2021). Desta forma, foi evidenciado que o fármaco isavuconazol em sua pose de cocrystalização na enzima CYP51 e em sua pose após o *redocking* apresentou interações de ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido Ala294 e interações intramoleculares com características de ligação de hidrogênio e de interação com halogênio; bem como interações hidrofóbicas com uma porção do anel porfirínico do heme e com os resíduos Tyr114, Tyr127, Ala290, Ala294 e Leu363. Interações do tipo π -enxofre foram estabelecidas com o resíduo de aminoácido Met367 na cocrystalização e com o resíduo de Cys434 no *redocking*. A partir desta análise, foi possível observar que os aminoácidos Phe116, Ser117, Phe121, Val126, Phe293, Phe65, Val366, Met471 estão presentes no sítio ativo, porém não estabeleceram interações com o isavuconazol. Uma hipótese para que isso ocorra é a adoção da pose mais favorável do isavuconazol no sítio ativo, a qual gera a aproximação do fármaco com certos resíduos e o afastamento em relação a outros, mas sem comprometer sua estabilidade no sítio ativo. Outra característica observada, foi a distância entre o heterociclo triazólico e o íon ferro do grupo heme para estabelecimento de ligação coordenada e contribuição para a estabilidade do composto no sítio ativo. Foi observado um aumento da distância de 2,095 Å na cristalização para 2,241 Å no *redocking*. Por outro lado, a ocorrência da ligação coordenada se torna favorável uma vez que a faixa de angulação adotada na validação foi de 92-88° pelo anel triazólico em relação ao heme e o limite de distância de $\leq 2,64$ Å foi obedecido por esta conformação. Sendo assim, as interações estabelecidas pelo isavuconazol têm o mesmo perfil de resíduos de aminoácido do fármaco cocrystalizado, corroborando para a validação dos parâmetros de *redocking*. (Figura 17).

Tabela 11. Resultados das interações intermoleculares entre fragmentos do fármaco isavuconazol cocrystalizado e após o *redocking* com os respectivos aminoácidos presentes no sítio ativo e grupamento heme.

Aminoácido	Isavuconazol cocrystalizado (Å)	Isavuconazol Redocking (Å)
Tyr 114	3,5 e 4,3 (Hf)	4,2 e 3,6 (Hf)
Tyr127	4,7 (Hf)	5,7 e 4,5 (Hf)
Ala 290	5,3 (Hf)	5,4 (Hf)
Ala294	3,4 (HBD); 4,3 (Hf)	3,0 (HBD); 3,7 e 4,7 (Hf)
Thr298	3,7 (HBD)	—
Leu363	3,7 (Hf)	5,0 e 4,6 (Hf)
Met367	5,3 (π -sulf.)	5,3 (Hf)
Cys434	—	5,5 (π -sulf.)
Heme	5,0 (Hf)	4,9 (Hf)
Distância N-Fe	2,1	2,2

Figura 17. Representação das interações entre o fármaco isavuconazol reinserido no sítio ativo da enzima CYP51 de *Acanthamoeba castellanii* e os resíduos de aminoácidos como resultado do estudo de *redocking*.



(A) Representação em formato 3D das interações; (B) Representação em formato 2D. *Fonte:* autoria própria. Ilustração obtida por meio do programa Discovery Studio 2019

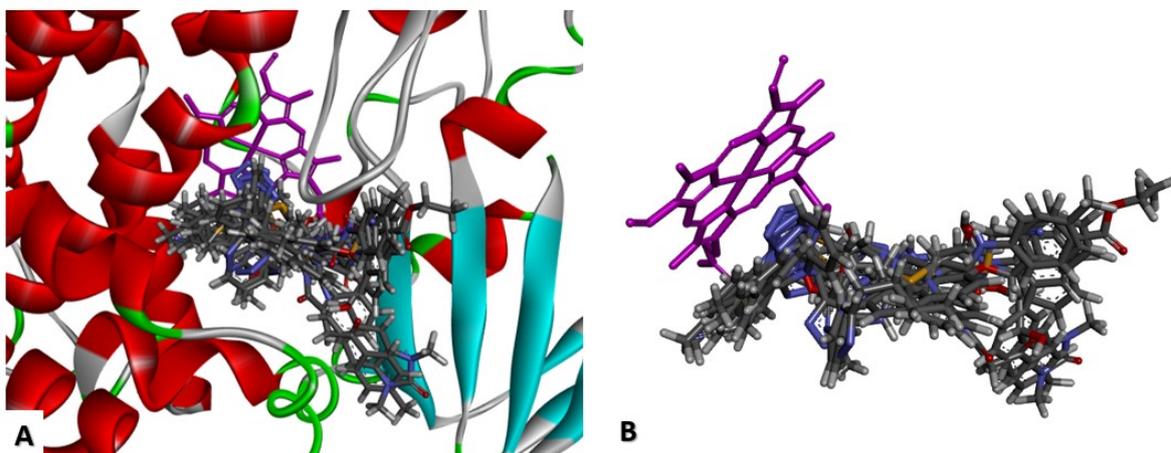
Com a validação do método e o estabelecimento de parâmetros para o *docking*, os 79 compostos selecionados pela etapa de triagem virtual foram posicionados no sítio ativo da enzima AcCYP51 com a obtenção de valores de pontuação (*score*) na função ASP conforme transcorreu a simulação das 100 poses. Ao longo da simulação o valor de RMDS foi gerado decorrente da comparação dos compostos triados e do isavuconazol. Entretanto seu valor não foi considerado como critério de seleção nas etapas seguintes, tendo em vista que o objetivo principal da busca de novos inibidores da CYP51 neste trabalho está fundamentado em moléculas inovadoras e não similares aos fármacos azólicos. Como resultado do *docking*, o composto com melhor valor de *score* na função de pontuação ASP foi o composto 37, apresentando valor de *score* de 77,20 (Tabela 12). Já o composto 32 finaliza a série dos dez compostos com melhores poses no sítio ativo da CYP51, com valor de 64,21. Para fins comparativos, esta abordagem de modelagem molecular também foi aplicada aos fármacos itraconazol e voriconazol, conhecidos inibidores da CYP51 de *Acanthamoeba*, e resultou nos valores de *score* de 88,21 e 64,27 respectivamente, bem como o valor de *score* obtido no *redocking* para o itraconazol de 69,42. Estabelecendo uma comparação entre os resultados obtidos, o valor de pontuação para a itraconazol foi superior ao composto 37, por outro lado a proximidade dos valores norteia a seleção de compostos com potencial atividade frente a enzima. O mesmo ocorreu para o voriconazol e itraconazol, em que seu valor de pontuação se aproximou aos compostos com as dez melhores poses.

Em uma avaliação mais detalhada do posicionamento do conjunto dos compostos triados com as melhores poses no sítio ativo da enzima CYP51 foi evidenciado uma proximidade dos ligantes com os aminoácidos da folha- β Tyr114, Leu 363, Leu364, Phe 365, Val366, Met367e Arg368; assim como dos resíduos de aminoácido da α -hélice Pro113, Phe116, Ser117, Ala 290, Leu291, Phe293, Ala294 e Tyr298. Estes aminoácidos podem trazer alguma relação de interação específica com os ligantes que melhor se posicionaram no estudo de *docking* (Figura 18a). Da mesma forma, foi evidenciado que determinados compostos tiveram suas melhores poses próximas ao grupo heme, o que possibilitaria o estabelecimento de ligação coordenada entre um grupamento destes ligantes com o íon ferro do grupo heme dependendo da distância entre os mesmos (Figura 18b).

Tabela 12. Resultado do estudo de *docking* com os dez compostos com melhor valor de função de pontuação em ASP.

Parâmetros do estudo de <i>docking</i>			
Composto	Pontuação ASP	GRID	POSES
Composto 37	77,20	9	100
Composto 88	75,87	9	100
Composto 36	75,80	9	100
Composto 34	69,18	9	100
Composto 90	68,11	9	100
Composto 55	66,79	9	100
Composto 84	66,22	9	100
Composto 86	65,80	9	100
Composto 49	65,60	9	100
Composto 32	64,21	9	100
Itraconazol	88,21	9	100
Voriconazol	64,27	9	100
Isavuconazol (redocking)	69,42	9	100

Figura 18. Representação da sobreposição das estruturas com melhores valores de pontuação no estudo de *docking* inseridos no sítio ativo da enzima CYP51 de *Acanthamoeba castellanii*.



(A) Os compostos na região do sítio ativo; o grupamento heme presente em rosa; ligantes em suas poses a partir do *docking* em cores elementares originais. (B) Visão mais aproximada da sobreposição dos compostos próximos ao grupo heme na enzima. *Fonte:* autoria própria. Ilustração obtida por meio do programa Discovery Studio 2019

A abordagem de *docking* molecular é amplamente difundida como técnica computacional baseada na estrutura para seleção de compostos contidos em grandes bibliotecas. Como fruto do emprego deste estudo estão os valores de pontuação em detrimento das diferentes conformações adotadas pelo ligante. Porém, a avaliação unicamente do *score* pode gerar uma limitação da técnica do ponto de vista da ocorrência de erros cálculo na predição da energia livre de ligação durante as simulações que podem impactar na diferença de ranqueamento dos compostos. Ainda, a seleção de compostos pode ter maior impacto em se tratando de *docking* rígido, considerado a variação preexistente das simulações computacionais em relação aos parâmetros observados no organismo. Desta forma, a inspeção visual das interações estrutura-ligante se torna fundamental após o ancoramento dos ligantes (FISCHER et al., 2021).

Como ponto de partida da inspeção visual após a simulação do *docking*, os três inibidores mais ativos - isavuconazol, voriconazol e itraconazol – foram avaliados quanto à sua disposição no sítio ativo da enzima CYP51 de *Acanthamoeba castellanii*. Este estudo evidenciou que os inibidores possuem interações em comum com os resíduos Tyr114, Ala290, Ala294 e Leu363 aminoácidos que estão presentes no sítio ativo da CYP51 e que podem contribuir para a atividade. Os resíduos Val126, Tyr127, Phe365, Val366 e Met367 realizam interações de caráter hidrofóbico com os inibidores e a presença destes resíduos é descrita no sítio ativo

(Tabela 13). Além destes, interações também foram estabelecidas com os resíduos Ile141, Leu291, Tyr298, Leu364 e Tyr468. A busca por estas interações se tornou necessário ao passo que compostos eram selecionados na triagem virtual, considerando o padrão de inibição da enzima CYP51 e a confiabilidade depositada nestes compostos para compor uma das etapas de seleção. Da mesma forma, avaliar a disposição destes inibidores no sítio ativo da enzima permitiu um direcionamento quanto a inspeção visual dos compostos triados.

Tabela 13. Interações observadas na inspeção visual das interações entre resíduos de aminoácido e os inibidores isavuconazol, itraconazol e voriconazol da enzima CYP51 de *Acanthamoeba castelanii*.

Inspeção visual		
Fármacos	Resíduos Hidrofóbicos	HEME (distância da ligação coordenada)
Isavuconazol	Tyr114; Ala290; Ala294; Leu363; Met367; Tyr127; Tyr298	2,24
Itraconazol	Tyr114; Ala290; Ala294; Leu363; Phe365; Val126; Tyr468; Ile141; Leu291; Leu364	2,27
Voriconazol	Tyr114; Ala290; Ala294; Leu363; Tyr127; Val126; Val366	2,39

Sendo assim, a inspeção visual da melhor pose gerada para cada um dos compostos triados foi realizada. As interações realizadas com os resíduos de aminoácido foram comparadas com aquelas descritas pela literatura como presentes no sítio ativo, bem como as que estabelecem interação com o inibidor isavuconazol. Além disso, os aminoácidos Tyr114; Ala290; Ala294; Leu363 foram levados em consideração pelas interações estabelecidas com os principais inibidores da CYP51 de *Acanthamoeba* spp. A seguir constam as descrições das interações para cada um dos compostos (Tabela 14).

Tabela 14. Interações observadas na inspeção visual dos dez compostos com melhor valor na função de pontuação ASP e suas interações com resíduos de aminoácido presentes no sítio ativo da enzima CYP51 de *Acanthamoeba castellanii*.

Interações intermoleculares dos compostos com melhores poses de <i>docking</i>				
Composto	Ligação de Hidrogênio	Resíduos Hidrofóbicos	Outras interações	HEME* (n° de interações)
Composto 37	Ser117	Met367; Phe116; Ala290; Ala294; Leu291; Phe222	Sem interações	3
Composto 88	Sem interações	Tyr114; Leu363; Ala294; Leu364	Sem interações	5
Composto 36	Tyr114	Phe121; Phe222; Ala294; Val126; Ala290; Val221; Met367	Met367	5
Composto 34	Tyr114	Phe116; Leu364; Val473; Ala294; Leu363	Sem interações	4
Composto 90	Tyr127; Tyr468	Tyr114; Leu363; Leu364; Tyr127; Tyr468; Ala294	Sem interações	7
Composto 55	Phe365	Tyr114; Ala290; Val126; Ile141; Leu291; Leu363; Ala294	Sem interações	5
Composto 84	Tyr114	Phe116; Ala294; Leu363; Met367	Sem interações	3
Composto 86	Leu363; Leu364	Tyr114; Phe365; Phe116; Ala290; Val126; Ala294; Val221; Met367	Sem interações	6
Composto 49	Sem interações	Tyr114; Ala290; Leu363; Val126; Ile141; Ala294	Sem interações	5
Composto 32	Sem interações	Ala294; Met367; Leu363	Sem interações	4

*As interações com o heme consideradas são de caráter eletrônico com fragmentos moleculares

A avaliação das interações destes compostos no sítio ativo da enzima CYP51 demonstrou uma forte presença de interações estéricas do tipo de Van der Waals ao longo de toda a cadeia dos compostos. Visto que uma grande parte dos resíduos de aminoácido descritos presentes no sítio ativo são de caráter hidrofóbico, a reunião espacial destes resíduos permite a formação de um bolsão com propriedades hidrofóbicas na enzima AcCYP51. Embora seja uma interação fraca, a contribuição total resultante da somatória das forças de dispersão entre fragmentos não-polares contribuiu para o ajuste do encaixe entre os compostos com a enzima. Os demais aminoácidos hidrofóbicos presentes Tyr114; Phe116; Phe121; Val126; Tyr127;

Val221; Phe222; Ala290; Ala294; Leu291; Ile141; Leu363; Leu364; Phe365; Met367; Tyr468; Val473 propiciaram as interações eletrostáticas do tipo π -alquil, empilhamento π , π - π em formato de T, alquílicas com fragmentos presentes nos compostos.

Das interações polares, as ligações de hidrogênio convencionais do tipo acceptor e doador de hidrogênio estiveram presente em grande parte dos compostos por meio da interação com os resíduos de Tyr114; Tyr127; Phe365; Leu364 em suas porções polares. Além disso, as distâncias de interação de ligação de hidrogênio estiveram 1,6-3,2Å, o que sustenta a possibilidade destas interações no ambiente da enzima (ARRAS et al., 2022; DESIRAJU, 1996; PAIRAS; TSOUNGAS, 2016). Interações de ligação de hidrogênio não-clássica do tipo carbono e hidrogênio também foram observadas, as quais ocorreram nos compostos 32, 34, 37, 55, 86 e 90. Esta interação possui caráter polar devido ao momento dipolo do carbono doador de hidrogênio, sofrendo influência dos grupos vizinhos a este carbono, e a presença de um átomo eletronegativo nas proximidades. Nos compostos que apresentaram esta ligação de hidrogênio não-clássica, o carbono doador de hidrogênio apresentou grupos de hidroxila, amina ou éter influenciando a eletronegatividade deste carbono; e como acceptor deste hidrogênio podem ser citados os anéis tetrazólico e triazólico e grupos funcionais éter, hidroxila, carboxila, aldeído, amida e sulfonamida (ARRAS et al., 2022; DESIRAJU, 1996; PAIRAS; TSOUNGAS, 2016). Apesar do caráter fraco, as ligações não-clássica também contribuíram para a somatória das interações entre os compostos com o sítio ativo da enzima, permitindo sua acomodação. Por fim, interações do tipo π -enxofre (ALBANESE et al., 2022) ocorreram entre o grupo tioéter do resíduo Met367 e fragmentos moleculares de caráter aromático, como anel benzênico e heterociclo contendo nitrogênio, compondo as interações intermoleculares; bem como as interações intramoleculares entre fragmentos do mesmo composto, como aconteceu com grupo tioéter e um anel benzênico do composto 34.

Uma característica particular das enzimas do citocromo P450 é a presença do grupo heme em seu sítio ativo. As interações com o grupo heme demonstram ser um dos principais fatores para a estabilização do composto no sítio ativo da enzima CYP51 e propiciar a inibição da atividade catalítica da enzima. Essa interação com o grupo heme ocorre principalmente por meio de ligação coordenada entre um átomo doador de elétrons e o íon ferro. Para tornar favorável esta ligação o átomo precisa estar a uma distância de $\leq 2,64\text{Å}$ do íon ferro e em um ângulo de ligação próximo de 90° , ou seja, em posição perpendicular em relação ao grupo heme (ATKINS et al., 2010; LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018a; SHARMA et al., 2020). A formação da ligação coordenada dos dez compostos com melhor valor de pontuação foi pesquisada, porém estes compostos somente apresentaram interações intermoleculares com

o anel porfirínico. A hipótese é que as características e a distância dos grupos funcionais mais próximos do grupo heme não apresentaram condições favoráveis para a formação de ligação coordenada com o íon ferro no sítio ativo da enzima. Das interações intermoleculares realizadas entre fragmentos moleculares pertencentes aos compostos com as melhores poses no *docking* molecular e o anel porfirínico possuem caráter hidrofóbico como as alquílicas, empilhamento π , π -alquílicas, e também interações polares de ligação de hidrogênio não-clássica entre carbono-hidrogênio e outras interações como a π -enxofre.

Devido ao grau de importância que a ligação coordenada com o íon ferro possui quando se trata da investigação de inibidores de enzimas pertencentes ao citocromo P450, devido ao seu impacto na atividade enzimática pela reação de oxidação (AKRAM et al., 2017; CAMPO; BERNARDES; CARVALHO, 2009; LUIRINK et al., 2020; THOMSON et al., 2017), os compostos com os demais valores de pontuação no *docking* foram avaliados. Com a avaliação dos fragmentos moleculares mais próximos do grupo heme foi evidenciado a presença dos anéis triazol, tetrazol e o anel benzênico em posições paralelas ao heme. A presença de heterociclo com nitrogênio favorece a formação de ligação coordenada com o ferro, como é o caso do inibidor isavuconazol, entretanto a disposição do átomo eletronegativo precisa estar perpendicular, ou seja, próximo ao ângulo de 90°. Pensando nisto, foi identificado uma interação com o resíduo de aminoácido cisteína 434 (Cys434) do tipo π -enxofre. Compostos com esta interação possuem heterociclos do tipo triazólico, tetrazólico e anel sulfadiazólico em uma distância $\leq 2,64\text{Å}$ do íon ferro e, o mais importante, uma angulação de ligação próximo de 90°. Sendo assim, é possível propor a formação de ligação coordenada com o ferro e estabilização dos compostos 12, 26, 42, 43, 58 e 74 no sítio ativo da enzima. Apesar de não apresentarem os melhores valores de *score* na função de pontuação ASP, estes compostos se tornaram promissores devido a formação de interações com os aminoácidos presentes no sítio ativo e possuem características similares aos compostos melhores posicionados, sendo assim selecionados para as etapas posteriores do estudo.

Contando com a possibilidade de formação de ligação coordenada com o ferro, os compostos 33, 51 e 78 também foram selecionados pensando na variedade estrutural de grupos com proximidade ao grupo heme, com a presença de grupamento hidroxila, amina e triazolpirimidina, respectivamente. Sendo assim, ao todo, dezenove compostos foram selecionados para a avaliação da atividade biológica frente ao parasito do gênero *Acanthamoeba* e avaliação da inibição enzimática da CYP51 pertencente ao mesmo parasito, com posterior possibilidade de planejamento e síntese dos compostos e seus derivados.

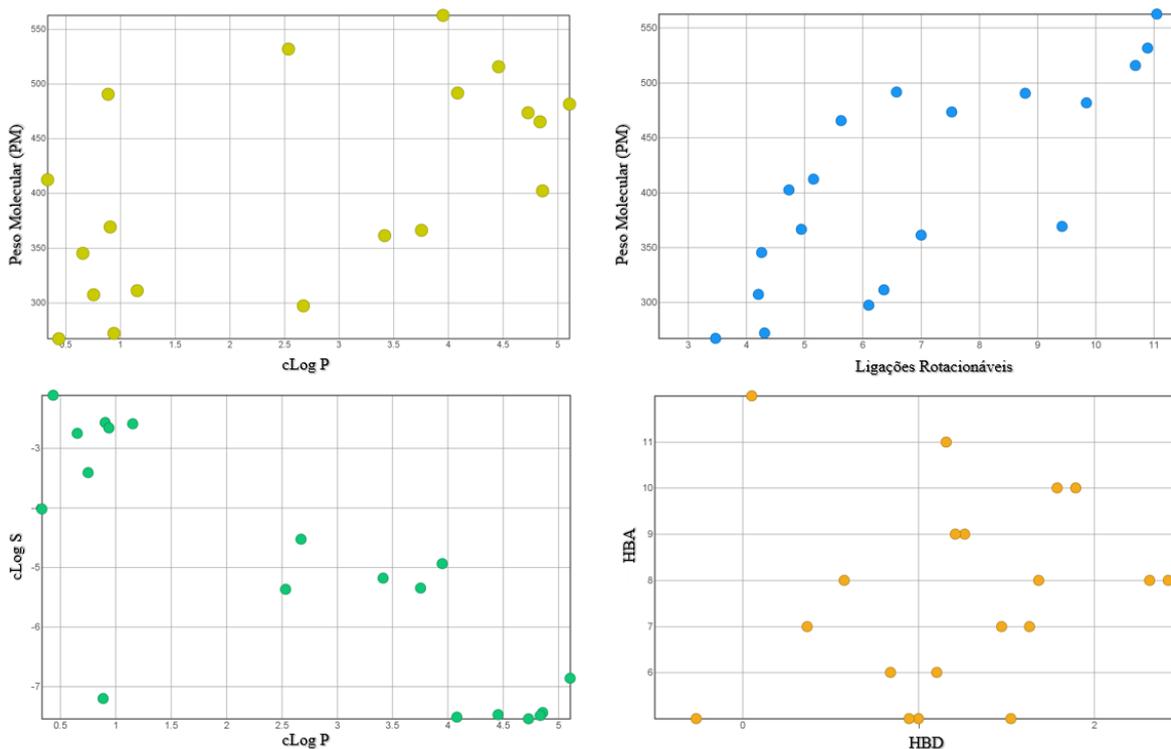
Além disso, a predição das propriedades físico-químicas dos compostos pode ser avaliada para incorporação dos compostos com potencial atividade em formas farmacêuticas (VARMA et al., 2010; YANG et al., 2020). Com isso, essas propriedades foram calculadas e apresentaram peso molecular com intervalo entre 167 e 563 g/mol; log *P* calculado entre 0,3 e 5,1; log *S* relacionando com a solubilidade entre -7,5 e -2,5; número de aceptores de ligação de hidrogênio entre 5 e 12; número de doadores de ligação de hidrogênio entre zero e 2; área de superfície polar (TSA) entre 232 e 423; e número de ligações rotacionáveis entre 3 e 11, como podem ser avaliadas na tabela 15.

Tabela 15. Propriedades físico-químicas dos compostos selecionados na etapa de *docking* molecular

	Propriedades Físico-Químicas							
	PM (g/mol)	logP	logS	HBA	HBD	TPA	Druglikness	Ligações Rotacionáveis
Composto 37	562,58	3,95	-4,93	12	0	423,00	-0,18	11
Composto 88	491,57	4,08	-7,51	8	1	369,40	-0,30	7
Composto 36	531,63	2,53	-5,37	10	2	400,23	0,49	11
Composto 34	481,62	5,10	-6,86	6	1	378,87	0,20	10
Composto 90	515,63	4,45	-7,47	8	2	403,23	-0,29	11
Composto 55	369,42	0,90	-2,57	8	2	295,63	0,38	9
Composto 84	490,57	0,88	-7,19	10	2	369,60	-1,66	9
Composto 86	473,62	4,72	-7,54	5	2	360,14	0,71	8
Composto 49	345,36	0,65	-2,75	9	1	268,33	0,52	4
Composto 32	361,47	3,41	-5,17	5	1	283,09	0,56	7
Composto 12	311,36	1,15	-2,59	7	0	232,62	0,96	6
Composto 26	297,36	2,67	-4,53	6	1	240,36	0,08	6
Composto 42	412,43	0,33	-4,02	11	1	299,30	3,43	5
Composto 43	267,31	0,43	-2,11	7	1	196,82	0,002	3
Composto 58	272,31	0,94	-2,66	8	2	194,93	4,32	4
Composto 74	402,52	4,85	-7,43	5	0	310,90	0,09	5
Composto 78	465,55	4,83	-7,48	7	2	362,39	6,01	6
Composto 51	307,38	0,75	-3,41	9	1	232,41	0,86	4
Composto 33	366,44	3,75	-5,34	5	1	275,02	-0,06	5

PM: peso molecular; HBA:ceptor de ligação de hidrogênio; HBD: doador de ligação de hidrogênio; TPA: área de superfície polar

Figura 19. Representações gráficas de relação entre propriedades físico-químicas apresentadas pelos compostos na etapa de *docking* molecular



Ao estabelecer um comparativo entre as propriedades físico-químicas dos compostos selecionados (Figura 19), é possível observar que a relação entre peso molecular (PM) e cLogP pode ser dividida em dois grupos: os compostos com peso molecular <300 a 400 g/mol possuem cLogP próximo de 1, ou seja, com características hidrofílicas; e o outro grupo seria de compostos com peso molecular >400 g/mol possuem cLogP > 3,5 com indicativo de compostos mais lipofílicos. Quanto a relação entre peso molecular e ligações rotacionáveis obedeceu a uma relação de crescimento positivo, ao qual quanto maior o peso molecular, mais ligações rotacionáveis são propostas. Para a relação entre cLogP e cLogS, os compostos com maior solubilidade em água (cLogS > -3) apresentaram características de hidrofílicidade (cLogP ≤ 1). Por outro lado, os compostos com menor solubilidade (cLogS < -7) demonstraram características de lipofílicidade (cLogP > 4). E, por fim, a relação entre HBA e HBD não foi estabelecida, com a formação de um gráfico disperso.

Estes dados de propriedades físico-químicas dos compostos selecionados podem ser melhor exploradas em estudos posteriores de atividade biológica e para o planejamento e síntese de compostos com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas aprimoradas.

Conclusões

Ao longo do presente estudo, abordagens de modelagem molecular foram aplicadas de forma conjunta para identificação de potenciais inibidores da enzima 14 α -demetilase (CYP51) de *Acanthamoeba*, empregando os conceitos de *ligand based* e *structure based*. Ao todo, foram construídos quatro modelos de farmacóforo baseados nos inibidores de CYP51 de *Acanthamoeba* spp.; quatro farmacóforos baseados nos inibidores da enzima para *Trypanosoma cruzi*; e cinco modelos de farmacóforo baseados nos inibidores para *Leishmania* spp. E, modelos de farmacóforo baseados na estrutura da enzima 14 α -demetilase de *Acanthamoeba castelanii* foram construídos, em um total de quatro modelos.

Os oito farmacóforos baseados na estrutura e nos inibidores da 14 α -demetilase de *Acanthamoeba* spp. foram empregados como critério de seleção de compostos na triagem virtual, partindo de mais de 1 milhão de compostos provenientes da biblioteca comercial SPECS. Assim, com o emprego dos demais filtros, setenta e nove compostos foram selecionados por esta abordagem computacional.

Os compostos triados passaram pela etapa de *docking* molecular para a obtenção da melhor pose de acomodação dos compostos no sítio de ligação da enzima CYP51 de *Acanthamoeba castelanii*, bem como para avaliação das interações com resíduos de aminoácidos. O **composto 37** obteve a melhor pontuação (*score* de 77,2011), demonstrando um potencial de inibição quando comparado com os fármacos inibidores da CYP51 itraconazol (88,2147) e voriconazol (64,2719). Em todo o processo de triagem de compostos por meio de abordagem computacionais, foram selecionados dezenove compostos que demonstram potencial atividade, sendo estes os **compostos 32, 34, 36, 37, 49, 55, 84, 86, 88 e 90**, com melhores pontuações de *score*; E os **compostos 12, 26, 33, 42, 43, 51, 58, 74 e 78** pela variabilidade estrutural e potencial formação da ligação coordenada com o ferro.

Perspectivas

Com a seleção de compostos com potencial atividade na enzima 14 α -demetilase de *Acanthamoeba*, o próximo passo consiste na realização de ensaios biológicos frente à enzima. Como proposta para este ensaio está a busca por alterações na produção de intermediários da via de síntese do ergosterol no parasito. Como forma de complementariedade nos estudos de atividade biológica destes compostos, ensaios frente as formas de vida de trofozoíto e cisto do protozoário *Acanthamoeba* poderão ser desempenhados. E, em seguida, o planejamento e síntese de compostos promissores com a pesquisa de rotas sintéticas e de seus derivados buscando variabilidade estrutural. Estes estudos poderão ser delineados e aprimorados ao longo do doutorado, tendo em vista a minha motivação em continuar a busca por inibidores da enzima 14 α -demetilase de *Acanthamoeba*.

Por fim, o presente estudo permite a continuidade da busca por inibidores da enzima 14 α -demetilase na busca por alternativas terapêuticas no contexto de doenças negligenciadas, como é o caso da doença de Chagas causada e a leishmaniose. Tendo isso em vista, posteriores estudos poderão ser delineados com o emprego dos modelos de farmacóforo construídos baseados nos inibidores para estes protozoários.

Referências

ADASME, Melissa F.; LINNEMANN, Katja L.; BOLZ, Sarah Naomi; KAISER, Florian; SALENTIN, Sebastian; HAUPT, V. Joachim; SCHROEDER, Michael. PLIP 2021 : expanding the scope of the protein – ligand interaction profiler to DNA and RNA. *[S. l.]*, v. 49, n. May, p. 530–534, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab294>.

AGAMAH, Francis E.; MAZANDU, Gaston K.; HASSAN, Radia; BOPE, Christian D.; THOMFORD, Nicholas E.; GHANSAH, Anita; CHIMUSA, Emile R. Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. **Briefings in Bioinformatics**, *[S. l.]*, v. 21, n. 5, p. 1663–1675, 2020. DOI: 10.1093/bib/bbz103. Disponível em: <https://academic.oup.com/bib/article/21/5/1663/5613879>.

AKRAM, Muhammad; WARATCHAREEYAKUL, Watcharee; HAUPENTHAL, Joerg; HARTMANN, Rolf W.; SCHUSTER, Daniela. Pharmacophore Modeling and in Silico/in Vitro Screening for Human Cytochrome P450 11B1 and Cytochrome P450 11B2 Inhibitors. **Frontiers in Chemistry**, *[S. l.]*, v. 5, n. DEC, p. 1–14, 2017. DOI: 10.3389/fchem.2017.00104. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2017.00104/full>.

ALBANESE, Katherine I.; LEAVER-FAY, Andrew; TREACY, Joseph W.; PARK, Rodney; HOUK, K. N.; KUHLMAN, Brian; WATERS, Marcey L. Comparative Analysis of Sulfonium– π , Ammonium– π , and Sulfur– π Interactions and Relevance to SAM-Dependent Methyltransferases. **Journal of the American Chemical Society**, *[S. l.]*, v. 144, n. 6, p. 2535–2545, 2022. DOI: 10.1021/jacs.1c09902. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.1c09902>.

ANASTAS, Paul; EGHBALI, Nicolas. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chem. Soc. Rev.**, *[S. l.]*, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010. DOI: 10.1039/B918763B. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B918763B>.

ANDRIANI, Grasiella et al. Antitrypanosomal Lead Discovery: Identification of a Ligand-Efficient Inhibitor of Trypanosoma cruzi CYP51 and Parasite Growth. **Journal of Medicinal Chemistry**, *[S. l.]*, v. 56, n. 6, p. 2556–2567, 2013. DOI: 10.1021/jm400012e. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm400012e>.

ARRAS, Janet; UGARTE TREJO, Omar; BHUVANESH, Nattamai; STOLLENZ, Michael. Non-conventional hydrogen bonding and dispersion forces that support embedding mesitylgold into a tailored bis(amidine) framework. **Chemical Communications**, *[S. l.]*, v. 58, n. 9, p. 1418–1421, 2022. DOI: 10.1039/D1CC06065A. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/D1CC06065A>.

ATKINS, P. W.; OVERTON, T. L.; ROURKE, J. P.; WELLER, M. T.; ARMSTRONG, F. A. **Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry**. Quinta Edi ed. [s.l: s.n.].

BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Terceira E ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

BERMAN, Helen M. et al. The Protein Data Bank. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, [S. l.], v. 58, n. 6, p. 899–907, 2002. DOI: 10.1107/S0907444902003451. Disponível em: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444902003451>.

BRASIL. **Córnea**. 2021. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/doacao-de-orgaos/cornea>. Acesso em: 8 mar. 2021.

BUCKLE, Derek R.; ERHARDT, Paul W.; GANELLIN, C. Robin; KOBAYASHI, Toshi; PERUN, Thomas J.; PROUDFOOT, John; SENN-BILFINGER, Joerg. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry Part II (IUPAC Recommendations 2013). *In: Annual Reports in Medicinal Chemistry*. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2013. v. 48p. 387–418. DOI: 10.1016/B978-0-12-417150-3.00024-7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124171503000247>.

BUNNEY, P. E.; ZINK, A. N.; HOLM, A. A.; BILLINGTON, C. J.; KOTZ, C. M. Orexin activation counteracts decreases in nonexercise activity thermogenesis (NEAT) caused by high-fat diet. **Physiology & Behavior**, [S. l.], v. 176, n. 23, p. 139–148, 2017. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416312148>.

CALVET, Claudia M. et al. 4-Aminopyridyl-Based CYP51 Inhibitors as Anti- Trypanosoma cruzi Drug Leads with Improved Pharmacokinetic Profile and in Vivo Potency. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 57, n. 16, p. 6989–7005, 2014. DOI: 10.1021/jm500448u. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm500448u>.

CAMPO, Vanessa; BERNARDES, Lilian; CARVALHO, Ivone. Stereoselectivity in Drug Metabolism: Molecular Mechanisms and Analytical Methods. **Current Drug Metabolism**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 188–205, 2009. DOI: 10.2174/138920009787522188. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2002&volume=10&issue=2&spage=188>.

CARNT, Nicole; STAPLETON, Fiona. Strategies for the prevention of contact lens-related Acanthamoeba keratitis: a review. **Ophthalmic and Physiological Optics**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 77–92, 2016. DOI: 10.1111/opo.12271. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/opo.12271>.

CDC. **Acanthamoeba Keratitis (AK)**. 2014. Disponível em: <https://www.cdc.gov/contactlenses/parasitic-keratitis.html>. Acesso em: 8 mar. 2021.

CDC. **Healthy Contact Lens Wear and Care**. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/contactlenses/parasitic-keratitis.html>. Acesso em: 8 mar. 2021.

CHAN, H. C. Stephen; SHAN, Hanbin; DAHOUN, Thamani; VOGEL, Horst; YUAN, Shuguang. Advancing Drug Discovery via Artificial Intelligence. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 40, n. 8, p. 592–604, 2019. DOI: 10.1016/j.tips.2019.06.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016561471930135X>.

CHOI, Jun Yong; CALVET, Claudia M.; GUNATILLEKE, Shamila S.; RUIZ, Claudia; CAMERON, Michael D.; MCKERROW, James H.; PODUST, Larissa M.; ROUSH, William R. Rational Development of 4-Aminopyridyl-Based Inhibitors Targeting Trypanosoma cruzi CYP51 as Anti-Chagas Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 56, n. 19, p. 7651–

7668, 2013. DOI: 10.1021/jm401067s. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm401067s>.

CHOI, Jun Yong; PODUST, Larissa M.; ROUSH, William R. Drug Strategies Targeting CYP51 in Neglected Tropical Diseases. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 114, n. 22, p. 11242–11271, 2014. DOI: 10.1021/cr5003134. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr5003134>.

CLARKE, Daniel W.; NIEDERKORN, Jerry Y. The pathophysiology of Acanthamoeba keratitis. **Trends in Parasitology**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 175–180, 2006. DOI: 10.1016/j.pt.2006.02.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492206000481>.

DA ROSA, Rafael; DE MORAES, Milene Höehr; ZIMMERMANN, Lara Almida; SCHENKEL, Eloir Paulo; STEINDEL, Mario; BERNARDES, Lílian Sibelle Campos. Design and synthesis of a new series of 3,5-disubstituted isoxazoles active against Trypanosoma cruzi and Leishmania amazonensis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 128, p. 25–35, 2017. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.01.029. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523417300399>.

DESIRAJU, Gautam R. The C–H···O Hydrogen Bond: Structural Implications and Supramolecular Design. **Accounts of Chemical Research**, [S. l.], v. 29, n. 9, p. 441–449, 1996. DOI: 10.1021/ar950135n. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ar950135n>.

DIMASI, Joseph A.; GRABOWSKI, Henry G.; HANSEN, Ronald W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, [S. l.], v. 47, p. 20–33, 2016. DOI: 10.1016/j.jhealeco.2016.01.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>.

DOYLE, Patricia S.; CHEN, Chiung Kuang; JOHNSTON, Jonathan B.; HOPKINS, Stephanie D.; LEUNG, Siegfried S. F.; JACOBSON, Matthew P.; ENGEL, Juan C.; MCKERROW, James H.; PODUST, Larissa M. A nonazole CYP51 inhibitor cures Chagas' disease in a mouse model of acute infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 54, n. 6, p. 2480–2488, 2010. DOI: 10.1128/AAC.00281-10.

FDA. **Orphan Drug Act - Relevant Excerpts**. 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/industry/designating-orphan-product-drugs-and-biological-products/orphan-drug-act-relevant-excerpts>. Acesso em: 29 ago. 2022.

FDA. **Novel Drug Approvals for 2021**. 2021. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2021>. Acesso em: 12 ago. 2022.

FERREIRA, Leonardo L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D. Chemoinformatics Strategies for Leishmaniasis Drug Discovery. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 9, n. NOV, p. 1–11, 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.01278. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.01278/full>.

FERREIRA, Leonardo L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D. ADMET modeling approaches in drug discovery. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 1157–1165, 2019. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.03.015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644618303301>.

FISCHER, André; SMIEŠKO, Martin; SELNER, Manuel; LILL, Markus A. Decision Making in Structure-Based Drug Discovery: Visual Inspection of Docking Results. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 64, n. 5, p. 2489–2500, 2021. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c02227. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.0c02227>.

FOKOUÉ, Harold; PINHEIRO, Pedro; FRAGA, Carlos; SANT'ANNA, Carlos. HÁ ALGO NOVO NO RECONHECIMENTO MOLECULAR APLICADO À QUÍMICA MEDICINAL? **Química Nova**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 78–89, 2020. DOI: 10.21577/0100-4042.20170474. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=8030&nomeArquivo=RV20190406.pdf.

FRIGGERI, Laura et al. Structural Basis for Rational Design of Inhibitors Targeting Trypanosoma cruzi Sterol 14 α -Demethylase: Two Regions of the Enzyme Molecule Potentiate Its Inhibition. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 57, n. 15, p. 6704–6717, 2014. DOI: 10.1021/jm500739f. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm500739f>.

FRIGGERI, Laura et al. Sterol 14 α -Demethylase Structure-Based Optimization of Drug Candidates for Human Infections with the Protozoan Trypanosomatidae. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 61, n. 23, p. 10910–10921, 2018. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01671.

GIORDANO, Deborah; BIANCANIELLO, Carmen; ARGENIO, Maria Antonia; FACCHIANO, Angelo. Drug Design by Pharmacophore and Virtual Screening Approach. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 646, 2022. DOI: 10.3390/ph15050646. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/15/5/646>.

GOMES, Thiago Dos Santos et al. Acanthamoeba spp. in Contact Lenses from Healthy Individuals from Madrid, Spain. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. e0154246, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0154246. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0154246>.

GORE, Mohini; JAGTAP, Umesh B. **Computational Drug Discovery and Design**. Primeira ed. New York, NY: Springer New York, 2018. v. 1762 DOI: 10.1007/978-1-4939-7756-7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644611002194>.

HARGROVE, Tatiana Y. et al. Complexes of trypanosoma cruzi Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) with Two Pyridine-based Drug Candidates for Chagas Disease: Structural basis for pathogen selectivity. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 288, n. 44, p. 31602–31615, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M113.497990.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, Dolores et al. Evaluation of the sensitivity to chlorhexidine, voriconazole and itraconazole of T4 genotype Acanthamoeba isolated from Mexico. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 197, n. 1, p. 29–35, 2019. DOI: 10.1016/j.exppara.2019.01.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.01.006>.

HOEKSTRA, William J. et al. Clinical Candidate VT-1161's Antiparasitic Effect In Vitro , Activity in a Murine Model of Chagas Disease, and Structural Characterization in Complex with the Target Enzyme CYP51 from Trypanosoma cruzi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 1058–1066, 2016. DOI: 10.1128/AAC.02287-15.

Disponível em: <https://aac.asm.org/content/60/2/1058>.

HUGHES, JP; REES, S.; KALINDJIAN, SB; PHILPOTT, KL. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 162, n. 6, p. 1239–1249, 2011. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>.

JHOTI, Harren; REES, Stephen; SOLARI, Roberto. High-throughput screening and structure-based approaches to hit discovery: is there a clear winner? **Expert Opinion on Drug Discovery**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 1449–1453, 2013. DOI: 10.1517/17460441.2013.857654. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17460441.2013.857654>.

JONES, Gareth; WILLETT, Peter; GLEN, Robert C.; LEACH, Andrew R.; TAYLOR, Robin. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 267, n. 3, p. 727–748, 1997. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0897. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283696908979>.

KALYAANAMOORTHY, Subha; CHEN, Yi-Ping Phoebe. Structure-based drug design to augment hit discovery. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 16, n. 17–18, p. 831–839, 2011. DOI: 10.1016/j.drudis.2011.07.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644611002194>.

KASERER, Teresa; BECK, Katharina; AKRAM, Muhammad; ODERMATT, Alex; SCHUSTER, Daniela. Pharmacophore Models and Pharmacophore-Based Virtual Screening: Concepts and Applications Exemplified on Hydroxysteroid Dehydrogenases. **Molecules**, [S. l.], v. 20, n. 12, p. 22799–22832, 2015. DOI: 10.3390/molecules201219880. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/12/19880>.

KHAN, Naveed Ahmed. Acanthamoeba : biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 564–595, 2006. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x>.

KIRIIRI, Geoffrey Kabue; NJOGU, Peter Mbugua; MWANGI, Alex Njoroge. Exploring different approaches to improve the success of drug discovery and development projects: a review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 27, 2020. DOI: 10.1186/s43094-020-00047-9. Disponível em: <https://fjps.springeropen.com/articles/10.1186/s43094-020-00047-9>.

KITCHEN, Douglas B.; DECORNEZ, Hélène; FURR, John R.; BAJORATH, Jürgen. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004. DOI: 10.1038/nrd1549. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd1549>.

KONKLE, Mary E. et al. Indomethacin Amides as a Novel Molecular Scaffold for Targeting Trypanosoma cruzi Sterol 14 α -Demethylase. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 52, n. 9, p. 2846–2853, 2009. DOI: 10.1021/jm801643b. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm801643b>.

KRAUS, James M.; TATIPAKA, Hari Babu; MCGUFFIN, Sarah A.; CHENNAMANENI, Naveen Kumar; KARIMI, Mandana; ARIF, Jenifer; VERLINDE, Christophe L. M. J.;

BUCKNER, Frederick S.; GELB, Michael H. Second Generation Analogues of the Cancer Drug Clinical Candidate Tipifarnib for Anti-Chagas Disease Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 53, n. 10, p. 3887–3898, 2010. DOI: 10.1021/jm9013136. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm9013136>.

KRAUS, James M.; VERLINDE, Christophe L. M. J.; KARIMI, Mandana; LEPESHEVA, Galina I.; GELB, Michael H.; BUCKNER, Frederick S. Rational modification of a candidate cancer drug for use against chagas disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 52, n. 6, p. 1639–1647, 2009. DOI: 10.1021/jm801313t.

LACERDA, Ana Gomes; LIRA, Madalena. Acanthamoeba keratitis: a review of biology, pathophysiology and epidemiology. **Ophthalmic and Physiological Optics**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 116–135, 2021. DOI: 10.1111/opo.12752. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/opo.12752>.

LAGORCE, David; SPERANDIO, Olivier; BAELL, Jonathan B.; MITEVA, Maria A.; VILLOUTREIX, Bruno O. FAF-Drugs3: a web server for compound property calculation and chemical library design. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 43, n. W1, p. W200–W207, 2015. DOI: 10.1093/nar/gkv353. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv353>.

LAMB, David C.; WARRILOW, Andrew G. S.; ROLLEY, Nicola J.; PARKER, Josie E.; NES, W. David; SMITH, Stephen N.; KELLY, Diane E.; KELLY, Steven L. Azole Antifungal Agents To Treat the Human Pathogens *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* through Inhibition of Sterol 14 α -Demethylase (CYP51). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 59, n. 8, p. 4707–4713, 2015. DOI: 10.1128/AAC.00476-15. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/59/8/4707>.

LANGER, Thierry; HOFFMANN, Rémy D. **Pharmacophores and Pharmacophore Searches**. [s.l.] : Wiley, 2006. v. 32 DOI: 10.1002/3527609164. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/3527609164>.

LEACH, Andrew R.; GILLET, Valerie J.; LEWIS, Richard A.; TAYLOR, Robin. Three-Dimensional Pharmacophore Methods in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 539–558, 2010. DOI: 10.1021/jm900817u. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm900817u>.

LEE, Ji Eun; OUM, Boo Sup; CHOI, Hee Young; YU, Hak Sun; LEE, Jong Soo. Cysticidal effect on *Acanthamoeba* and toxicity on human keratocytes by polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. **Cornea**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 736–741, 2007. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31805b7e8e.

LEPESHEVA, Galina I.; FRIGGERI, Laura; WATERMAN, Michael R. CYP51 as drug targets for fungi and protozoan parasites: Past, present and future. **Parasitology**, [S. l.], v. 145, n. 14, p. 1820–1836, 2018. a. DOI: 10.1017/S0031182018000562.

LEPESHEVA, Galina I.; WATERMAN, Michael R. Sterol 14 α -Demethylase Cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all Biological Kingdoms. **Biochim Biophys Acta.**, [S. l.], v. 1770, n. 3, p. 467–477, 2007. b. DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.07.018.

LEPESHEVA, Galina I.; WATERMAN, Michael R. Structural basis for conservation in the CYP51 family. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1814, n.

1, p. 88–93, 2011. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.06.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.006>.

LI, Jin; FU, Ailing; ZHANG, Le. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 320–328, 2019. DOI: 10.1007/s12539-019-00327-w. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>.

LIEBESCHUETZ, John W.; COLE, Jason C.; KORB, Oliver. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 737–748, 2012. DOI: 10.1007/s10822-012-9551-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10822-012-9551-4>.

LIN, Xiaoqian; LI, Xiu; LIN, Xubo. A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 1375, 2020. DOI: 10.3390/molecules25061375. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/6/1375>.

LIPTROT, David J.; POWER, Philip P. London dispersion forces in sterically crowded inorganic and organometallic molecules. **Nature Reviews Chemistry**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 0004, 2017. DOI: 10.1038/s41570-016-0004. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41570-016-0004>.

LOMBARDINO, Joseph G.; LOWE, John A. The role of the medicinal chemist in drug discovery — then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 3, n. 10, p. 853–862, 2004. DOI: 10.1038/nrd1523. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrd1523>.

LORENZO-MORALES, Jacob; KHAN, Naveed A.; WALOCHNIK, Julia. An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, [S. l.], v. 22, p. 10, 2015. DOI: 10.1051/parasite/2015010. Disponível em: <http://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2015010>.

LORENZO-MORALES, Jacob; MARTÍN-NAVARRO, Carmen M.; LÓPEZ-ARENCEBIA, Atteneri; ARNALICH-MONTIEL, Francisco; PIÑERO, José E.; VALLADARES, Basilio. Acanthamoeba keratitis: An emerging disease gathering importance worldwide? **Trends in Parasitology**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 181–187, 2013. DOI: 10.1016/j.pt.2013.01.006.

LUIRINK, Rosa A.; VERKADE-VREEKER, Marlies C. A.; COMMANDEUR, Jan N. M.; GEERKE, Daan P. A Modified Arrhenius Approach to Thermodynamically Study Regioselectivity in Cytochrome P450-Catalyzed Substrate Conversion. **ChemBioChem**, [S. l.], v. 21, n. 10, p. 1461–1472, 2020. DOI: 10.1002/cbic.201900751. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.201900751>.

MACALINO, Stephani Joy Y.; GOSU, Vijayakumar; HONG, Sunhye; CHOI, Sun. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of Pharmacal Research**, [S. l.], v. 38, n. 9, p. 1686–1701, 2015. DOI: 10.1007/s12272-015-0640-5. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12272-015-0640-5>.

MARTÍN-NAVARRO, C. M.; LÓPEZ-ARENCEBIA, A.; ARNALICH-MONTIEL, F.; VALLADARES, B.; PIÑERO, J. E.; LORENZO-MORALES, J. Evaluation of the in vitro activity of commercially available moxifloxacin and voriconazole eye-drops against clinical strains of Acanthamoeba. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**,

[*S. l.*], v. 251, n. 9, p. 2111–2117, 2013. DOI: 10.1007/s00417-013-2371-y. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00417-013-2371-y>.

MOOIJ, Wijnand T. M.; VERDONK, Marcel L. General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [*S. l.*], v. 61, n. 2, p. 272–287, 2005. DOI: 10.1002/prot.20588. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.20588>.

MORIYAMA, Aline Silveira; HOFLING-LIMA, Ana Luisa. Contact lens-associated microbial keratitis. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, [*S. l.*], v. 71, n. 6, p. 32–36, 2008. DOI: 10.1590/S0004-27492008000700007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492008000700007&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

MYSINGER, Michael M.; CARCHIA, Michael; IRWIN, John J.; SHOICHET, Brian K. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. **Journal of Medicinal Chemistry**, [*S. l.*], v. 55, n. 14, p. 6582–6594, 2012. DOI: 10.1021/jm300687e. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm300687e>.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2014.

NERON, B.; MENAGER, H.; MAUFRAIS, Corinne; JOLY, Nicolas; MAUPETIT, Julien; LETORT, Sébastien; CARRERE, Sébastien; TUFFERY, Pierre; LETONDAL, Catherine. MobyLe: a new full web bioinformatics framework. **Bioinformatics**, [*S. l.*], v. 25, n. 22, p. 3005–3011, 2009. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp493. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btp493>.

NES, W. David. Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols. **American Chemical Society**, [*S. l.*], v. 111, n. 10, p. 6423–6451, 2011. DOI: 10.1021/cr200021m. Disponível em: pubs.acs.org/CR.

PAGE, Michael A.; MATHERS, William D. Acanthamoeba Keratitis: A 12-Year Experience Covering a Wide Spectrum of Presentations, Diagnoses, and Outcomes. **Journal of Ophthalmology**, [*S. l.*], v. 2013, n. June 2011, p. 1–6, 2013. DOI: 10.1155/2013/670242. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/joph/2013/670242/>.

PAIRAS, George N.; TSOUNGAS, Petros G. H -Bond: The Chemistry-Biology H -Bridge. **ChemistrySelect**, [*S. l.*], v. 1, n. 15, p. 4520–4532, 2016. DOI: 10.1002/slct.201600770. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/slct.201600770>.

PATRICK, Graham L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5. ed. United Kingdom: Oxford University Press, 2013.

PENS, Claiton José; DA COSTA, Marisa; FADANELLI, Cristina; CAUMO, Karin; ROTT, Marilise Brittes. Acanthamoeba spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. **Parasitology Research**, [*S. l.*], v. 103, n. 6, p. 1241–1245, 2008. DOI: 10.1007/s00436-008-1120-3. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-008-1120-3>.

PINTO, Larissa Fagundes; ANDRIOLO, Brenda Nazaré Gomes; HOFLING-LIMA, Ana Luisa; FREITAS, Denise. The role of Acanthamoeba spp. in biofilm communities: a systematic

review. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 120, n. 8, p. 2717–2729, 2021. DOI: 10.1007/s00436-021-07240-6. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00436-021-07240-6>.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. **Stereochemistry of polypeptide chain configurations**. **Journal of Molecular Biology**, 1963. DOI: 10.1016/S0022-2836(63)80023-6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283663800236>.

REIS, Suellen Dos; ZIMMERMANN, Lara Almida; BERNARDES, Lílian Sibelle Campos. Criação e validação de modelos farmacofóricos para identificação de potencial inibidor da enzima 14- α -demetilase. 2019. **Universidade Federal de Santa Catarina**, [S. l.], 2019.

ROJAS VARGAS, Julio Alberto; LÓPEZ, América García; PÉREZ, Yulier; COS, Paul; FROEYEN, Matheus. In vitro evaluation of arylsubstituted imidazoles derivatives as antiprotozoal agents and docking studies on sterol 14 α -demethylase (CYP51) from *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, and *Trypanosoma brucei*. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 118, n. 5, p. 1533–1548, 2019. DOI: 10.1007/s00436-019-06206-z. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-019-06206-z>.

SACCOLITI, Francesco et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New 1-(Aryl-1 H -pyrrolyl)(phenyl)methyl-1 H -imidazole Derivatives as Antiprotozoal Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 62, n. 3, p. 1330–1347, 2019. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01464. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.8b01464>.

SAIKIA, Surovi; BORDOLOI, Manobjyoti. Molecular Docking: Challenges, Advances and its Use in Drug Discovery Perspective. **Current Drug Targets**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 501–521, 2019. DOI: 10.2174/1389450119666181022153016. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/166524/article>.

SANDER, Thomas; FREYSS, Joel; VON KORFF, Modest; RUFENER, Christian. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 55, n. 2, p. 460–473, 2015. DOI: 10.1021/ci500588j. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci500588j>.

SANTOS, Rita et al. A comprehensive map of molecular drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 19–34, 2017. DOI: 10.1038/nrd.2016.230. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrd.2016.230>.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, Dina; DROR, Oranit; INBAR, Yuval; NUSSINOV, Ruth; WOLFSON, Haim J. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 36, n. Web Server, p. W223–W228, 2008. DOI: 10.1093/nar/gkn187. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkn187>.

SCHULZ-GASCH, Tanja; STAHL, Martin. Scoring functions for protein–ligand interactions: a critical perspective. **Drug Discovery Today: Technologies**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 231–239, 2004. DOI: 10.1016/j.ddtec.2004.08.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1740674904000149>.

SHARMA, Vandna; SHING, Brian; HERNANDEZ-ALVAREZ, Lilian; DEBNATH, Anjan; PODUST, Larissa M. Domain-Swap Dimerization of *Acanthamoeba castellanii* CYP51 and a

Unique Mechanism of Inactivation by Isavuconazole. **Molecular Pharmacology**, [S. l.], v. 98, n. 6, p. 770–780, 2020. DOI: 10.1124/molpharm.120.000092. Disponível em: <http://molpharm.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/molpharm.120.000092>.

SHING, Brian; SINGH, Seema; PODUST, Larissa M.; MCKERROW, James H.; DEBNATH, Anjan. The Antifungal Drug Isavuconazole Is both Amebicidal and Cysticidal against *Acanthamoeba castellanii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 64, n. 5, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1128/AAC.02223-19. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/64/5/e02223-19>.

SIERRA, Heidy; CORDOVA, Miguel; CHEN, Chih-Shan Jason; RAJADHYAKSHA, Milind. Confocal Imaging–Guided Laser Ablation of Basal Cell Carcinomas: An Ex Vivo Study. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 135, n. 2, p. 612–615, 2015. DOI: 10.1038/jid.2014.371. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15370834>.

SIJM, Maarten et al. Phenyldihydropyrazolones as Novel Lead Compounds Against *Trypanosoma cruzi*. **ACS Omega**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 6585–6596, 2019. DOI: 10.1021/acsomega.8b02847. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.8b02847>.

SOUZA, Sofia D.; PREMA, K. V. Machine learning models for drug – target interactions: current knowledge and future directions. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 748–756, 2020. DOI: 10.1016/j.drudis.2020.03.003.

STEWART, James J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–32, 2013. DOI: 10.1007/s00894-012-1667-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00894-012-1667-x>.

SZENTMÁRY, Nóra; DAAS, Loay; SHI, Lei; LAURIK, Kornelia Lenke; LEPPER, Sabine; MILIOTI, Georgia; SEITZ, Berthold. *Acanthamoeba* keratitis – Clinical signs, differential diagnosis and treatment. **Journal of Current Ophthalmology**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 16–23, 2019. DOI: 10.1016/j.joco.2018.09.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452232518301914>.

THOMSON, Scott; RICE, Christopher A.; ZHANG, Tong; EDRADA-EBEL, Ruangelie; HENRIQUEZ, Fiona L.; ROBERTS, Craig W. Characterisation of sterol biosynthesis and validation of 14 α -demethylase as a drug target in *Acanthamoeba*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017. a. DOI: 10.1038/s41598-017-07495-z. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-07495-z>.

USHA, Talambedu; SHANMUGARAJAN, Dhivya; GOYAL, Arvind Kumar; KUMAR, Chinaga Suresh; MIDDHA, Sushil Kumar. Recent Updates on Computer-aided Drug Discovery: Time for a Paradigm Shift. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 17, n. 30, p. 3296–3307, 2018. DOI: 10.2174/1568026618666180101163651. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/158758/article>.

VAN MONTFORT, Rob L. M.; WORKMAN, Paul. Structure-based drug design: aiming for a perfect fit. **Essays in Biochemistry**, [S. l.], v. 61, n. 5, p. 431–437, 2017. DOI: 10.1042/EBC20170052. Disponível em:

<https://portlandpress.com/essaysbiochem/article/61/5/431/78244/Structurebased-drug-design-aiming-for-a-perfect>.

VARMA, Manthena V. S.; OBACH, R. Scott; ROTTER, Charles; MILLER, Howard R.; CHANG, George; STEYN, Stefanus J.; EL-KATTAN, Ayman; TROUTMAN, Matthew D. Physicochemical Space for Optimum Oral Bioavailability: Contribution of Human Intestinal Absorption and First-Pass Elimination. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 53, p. 1098–1108, 2010. DOI: 10.1021/jm901371v.

VIEIRA, Debora F. et al. Binding Mode and Potency of N -Indolyloxopyridinyl-4-aminopropanyl-Based Inhibitors Targeting Trypanosoma cruzi CYP51. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 57, n. 23, p. 10162–10175, 2014. DOI: 10.1021/jm501568b. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm501568b>.

VISVESVARA, Govinda S.; MOURA, Hercules; SCHUSTER, Frederick L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 1–26, 2007. a. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x>.

VUORINEN, Anna; SCHUSTER, Daniela. Methods for generating and applying pharmacophore models as virtual screening filters and for bioactivity profiling. **Methods**, [S. l.], v. 71, n. C, p. 113–134, 2015. DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.10.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202314003302>.

WAGNER, J. Philipp; SCHREINER, Peter R. London Dispersion in Molecular Chemistry- Reconsidering Steric Effects. **Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 54, n. 42, p. 12274–12296, 2015. DOI: 10.1002/anie.201503476. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201503476>.

WANG, Zhe; SUN, Huiyong; SHEN, Chao; HU, Xueping; GAO, Junbo; LI, Dan; CAO, Dongsheng; HOU, Tingjun. Combined strategies in structure-based virtual screening. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 3149–3159, 2020. DOI: 10.1039/C9CP06303J. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9CP06303J>.

WHO. **World report on vision**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241516570>. Acesso em: 8 mar. 2021.

WU, Fengxu; ZHOU, Yuquan; LI, Langhui; SHEN, Xianhuan; CHEN, Ganying; WANG, Xiaoqing; LIANG, Xianyang; TAN, Mengyuan; HUANG, Zunnan. Computational Approaches in Preclinical Studies on Drug Discovery and Development. **Frontiers in Chemistry**, [S. l.], v. 8, n. September, 2020. DOI: 10.3389/fchem.2020.00726. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2020.00726/full>.

YAN, Xin Cindy et al. Augmenting Hit Identification by Virtual Screening Techniques in Small Molecule Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 60, n. 9, p. 4144–4152, 2020. DOI: 10.1021/acs.jcim.0c00113. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.0c00113>.

YANG, Zi-Yi; HE, Jun-Hong; LU, Ai-Ping; HOU, Ting-Jun; CAO, Dong-Sheng. Application of Negative Design To Design a More Desirable Virtual Screening Library. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 63, n. 9, p. 4411–4429, 2020. a. DOI:

10.1021/acs.jmedchem.9b01476. Disponível em:
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.9b01476>.

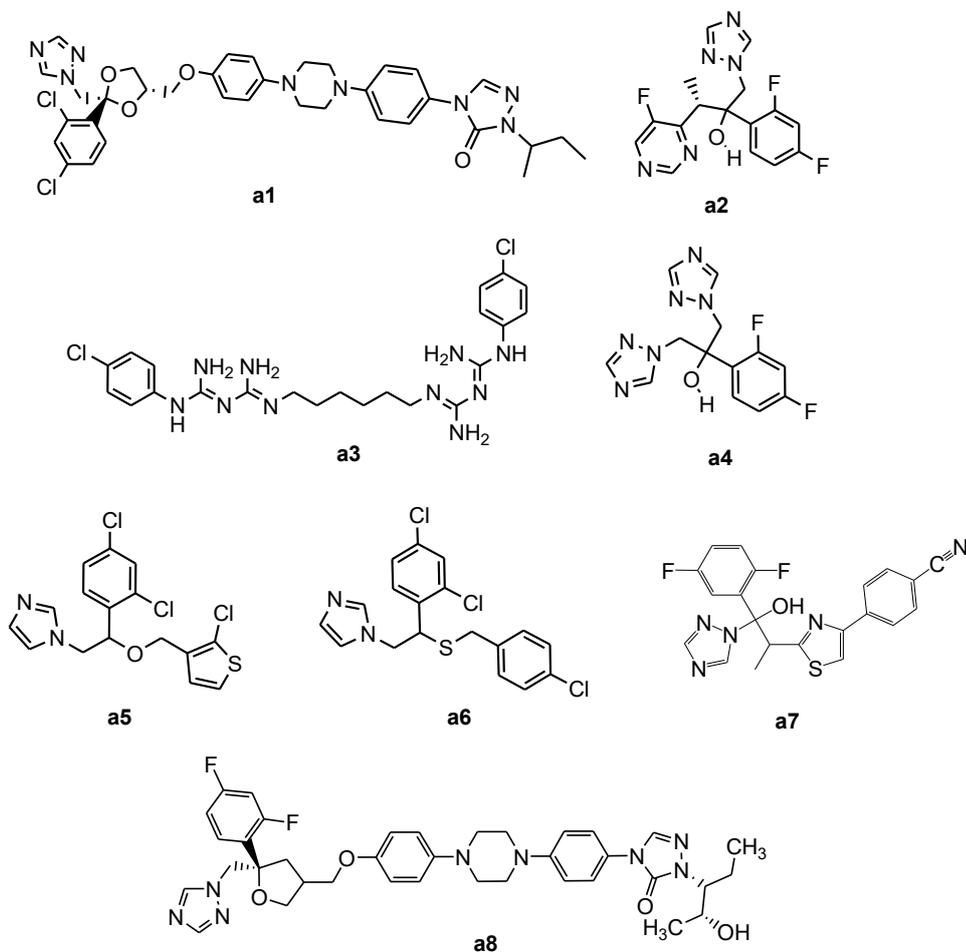
ZIMMERMANN, Lara A.; MORAES, Milene H. De; MELO, Eduardo B. De; PAULA, Fávero R.; SCHENKEL, Eloir P.; STEINDEL, Mario; BERNARDES, Lílian S. C. Synthesis and SAR of new isoxazole-triazole bis-heterocyclic compounds as analogues of natural lignans with antiparasitic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 26, n. 17, p. 4850–4862, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.08.025>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.08.025>.

Anexos

Tabela A1. Dados referente aos compostos ativos (inibidores) da enzima 14 α -demetilase para protozoário *Acanthamoeba* spp. e compostos considerados no modelo farmacofórico baseado nos ligantes

Inibidores	Atividade	Compostos sobrepostos	Referências
a1	IC ₅₀ 0,23 μ M Kd 10 nM	X	(LAMB et al., 2015) (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2019)
a2	IC ₅₀ 0,39 μ M Kd 13 nM	X	(LAMB et al., 2015) (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2019)
a3	IC ₅₀ 8,61 \pm 1,63 μ M (<i>A. castellanii</i>)		(HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2019)
a4	IC ₅₀ 30 μ M Kd 2,137 nM		(LAMB et al., 2015)
a5	IC ₅₀ 13,04 μ M (<i>A. castellanii</i> T4) IC ₅₀ 3,43 μ M (<i>A. castellanii</i>) IC ₅₀ 5,38 μ M (<i>A. polyphaga</i>)		(THOMSON et al., 2017)
a6	IC ₅₀ 24,43 μ M (<i>A. castellanii</i> T4) IC ₅₀ 11,48 μ M (<i>A. castellanii</i>) IC ₅₀ 15,09 μ M (<i>A. polyphaga</i>)		(THOMSON et al., 2017)
a7	EC ₅₀ 0,001 – 0,026 μ M	X	(SHING, SINGH, PODUST, MCKERROW, & DEBNATH, 2020)
a8	EC ₅₀ 0,003 – 0,065 μ M		(SHING, SINGH, PODUST, MCKERROW, & DEBNATH, 2020)

Figura A1. Estrutura dos compostos ativos (inibidores) da enzima 14 α -demetilase para protozoário *Acanthamoeba* spp. que compõem a biblioteca de construção



* Os inibidores da enzima CYP51 de *Acanthamoeba* spp, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. com os respectivos códigos a8, a38 e a98 tratam-se da molécula do posaconazol. Os compostos a61 e a87 tratam-se dos compostos VFV. E os compostos a39 e a90 trata-se do VNI.

Tabela A2. Dados referente aos compostos ativos (inibidores) da enzima 14 α -demetilase para protozoário *Trypanosoma cruzi* e compostos considerados nos modelos farmacofóricos baseado nos ligantes

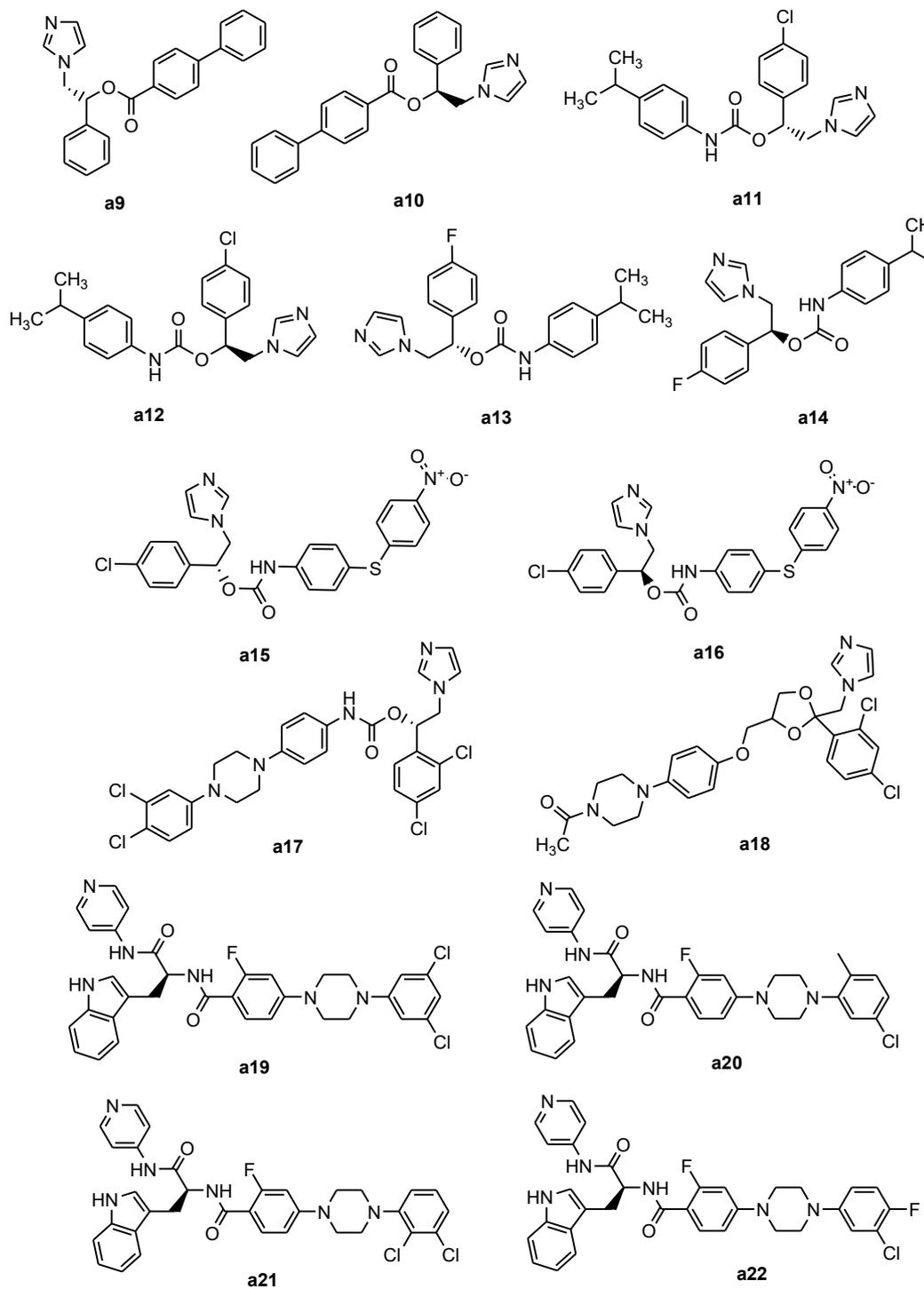
Inibidores	Atividade	Modelo Maior n° Mol 1	Modelo Maior n° Mol 2	Modelo Maior <i>score</i>	Maior <i>score</i> (Posaco- nazol)	Referências
a9						
a10	Ks 0,046 μ M					(FRIGGERI et al., 2014)
a11	Ks 0,056 μ M					(FRIGGERI et al., 2014)
a12	Ks 0,032 μ M					(FRIGGERI et al., 2014)
a13	Ks 0,083 μ M					(FRIGGERI et al., 2014)
a14	Ks 0,032 μ M					(FRIGGERI et al., 2014)
a15	Ks 0,715 μ M	X				(FRIGGERI et al., 2014)
a16	Ks 0,162 μ M					(FRIGGERI et al., 2014)
a17	Ks 0,064 μ M					(FRIGGERI et al., 2014)
a18	Ks 0,123 μ M					(FRIGGERI et al., 2014)
a19	EC ₅₀ 1,9 \pm 0,9nM K _D 190 \pm 40 nM	X	X			(VIEIRA et al., 2014)
a20	EC ₅₀ 1,6 \pm 1,3 nM K _D \leq 10 nM	X				(VIEIRA et al., 2014)
a21	EC ₅₀ 2,0 \pm 1,3 nM K _D 240 \pm 110 nM					(VIEIRA et al., 2014)
a22	EC ₅₀ 4,4 \pm 2,7 nM K _D \leq 10 nM	X	X			(VIEIRA et al., 2014)
a23	EC ₅₀ 6nM					(KRAUS et al., 2009)
a24	EC ₅₀ 0,6 nM					(KRAUS et al., 2009)
a25	EC ₅₀ 0,7 nM					(KRAUS et al., 2010)
a26	EC ₅₀ 0,5 nM					(KRAUS et al., 2010)
a27	EC ₅₀ 0,31 nM					(KRAUS et al., 2010)
a28	K _D 4,8 nM					(DOYLE et al., 2010)
a29	KD 0,44 μ M					(KONKLE et al., 2009)

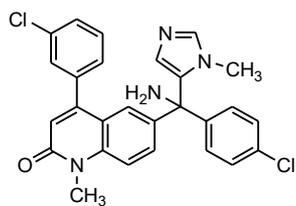
Inibidores	Atividade	Modelo Maior n° Mol 1	Modelo Maior n° Mol 2	Modelo Maior <i>score</i>	Maior <i>score</i> (Posaco- nazol)	Referências
a30	K _D 0,75 µM	X				(KONKLE et al., 2009)
a31	K _D 0,29 µM	X	X			(KONKLE et al., 2009)
a32	K _D 0,54 µM					(KONKLE et al., 2009)
a33	K _D 0,37 µM	X	X			(KONKLE et al., 2009)
a34	K _D 0,56 µM					(KONKLE et al., 2009)
a35	K _D 0,26 µM	X	X			(KONKLE et al., 2009)
a36	K _D 0,019 µM					(HARGROVE et al., 2013)
a37	K _D 0,032 µM					(HARGROVE et al., 2013)
a38	K _D 0,018 µM				X	(HARGROVE et al., 2013)
a39	K _D 0,015 µM					(HARGROVE et al., 2013)
a40	K _D 0,10 µM					(LEPESHEVA et al., 2007)
a41	K _D 0,07 µM					(LEPESHEVA et al., 2007)
a42	K _D 0,11 µM					(LEPESHEVA et al., 2007)
a43	K _D 0,06 µM					(LEPESHEVA et al., 2007)
a44	EC ₅₀ 17nM K _D <5 nM					(CHOI; PODUST; ROUSH, 2014)
a45	EC ₅₀ 760nM K _D 65 nM					(CHOI; PODUST; ROUSH, 2014)
a46	EC ₅₀ 260nM K _D 53 nM					(CHOI; PODUST; ROUSH, 2014)
a47	EC ₅₀ 580nM K _D <5 nM	X				(CHOI; PODUST; ROUSH, 2014)
a48	EC ₅₀ 80nM K _D 76 nM					(CHOI; PODUST; ROUSH, 2014)
a49	EC ₅₀ 200nM K _D <5 nM					(CHOI; PODUST; ROUSH, 2014)
a50	K _D 70 nM					(CHOI; PODUST; ROUSH, 2014)
a51	K _D 100 nM					(CHOI; PODUST; ROUSH, 2014)

Inibidores	Atividade	Modelo Maior n° Mol 1	Modelo Maior n° Mol 2	Modelo Maior <i>score</i>	Maior <i>score</i> (Posaco- nazol)	Referências
a52	pIC ₅₀ 6,0					(SIJM et al., 2019)
a53	pIC ₅₀ 6,0					(SIJM et al., 2019)
a54	pIC ₅₀ 7,2					(SIJM et al., 2019)
a55	IC ₅₀ 0,035 µM					(SACCOLITI et al., 2019)
a56	IC ₅₀ 0,018 µM					(SACCOLITI et al., 2019)
a57	IC ₅₀ 0,003 µM					(SACCOLITI et al., 2019)
a58	IC ₅₀ 0,003 µM					(SACCOLITI et al., 2019)
a59	IC ₅₀ 0,002 µM					(SACCOLITI et al., 2019)
a60	IC ₅₀ 0,005 µM					(SACCOLITI et al., 2019)
a61	K _D 6,8 ± 4 nM					(FRIGGERI et al., 2018)
a62	K _D 8,4 ± 3 nM					(FRIGGERI et al., 2018)
a63	K _D 4,2 ± 3 nM					(FRIGGERI et al., 2018)
a64	IC ₅₀ 0,1 µM					(FERREIRA DE ALMEIDA FIUZA et al., 2018)
a65	EC ₅₀ 2.20 ± 0.01 µM					(FERREIRA DE ALMEIDA FIUZA et al., 2018)
a66	EC ₅₀ 2.70 ± 0.01 µM					(FERREIRA DE ALMEIDA FIUZA et al., 2018)
a67	K _D 24 nM					(HOEKSTRA et al., 2016)
a68	K _D 10 nM	X	X			(SIERRA et al., 2015)
a69	K _D 0,21 µM					(ANDRIANI et al., 2013)
a70	K _D 0,067 µM					(ANDRIANI et al., 2013)
a71	K _D 0,18 µM					(ANDRIANI et al., 2013)
a72	K _D ≤10 nM EC ₅₀ 0.82 ± 0.01	X	X	X	X	(VIEIRA et al., 2014b)
a73	K _D 47 ± 19 nM EC ₅₀ 2,6 ± 0,5	X	X	X	X	(VIEIRA et al., 2014b)

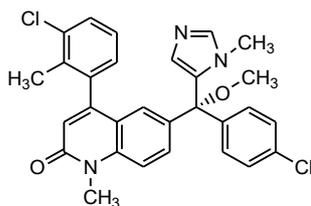
Inibidores	Atividade	Modelo Maior n° Mol 1	Modelo Maior n° Mol 2	Modelo Maior <i>score</i>	Maior <i>score</i> (Posaco- nazol)	Referências
a74	K _D <5 nM EC ₅₀ 0,11µM	X	X	X	X	(CHOI et al., 2013)
a75	K _D <5 nM EC ₅₀ 0,26µM	X	X	X	X	(CHOI et al., 2013)
a76	K _D <5 nM EC ₅₀ 0,19µM	X		X	X	(CHOI et al., 2013)
a77	K _D <5 nM EC ₅₀ 0,014 µM					(CHOI et al., 2013)
a78	K _D <5 nM EC ₅₀ 0,057 µM					(CHOI et al., 2013)
a79	K _D <5 nM EC ₅₀ 0,018 µM					(CHOI et al., 2013)
a80	K _D 77 ± 24 nM EC ₅₀ 0.017 nM					(CALVET et al., 2014)
a81	K _D 12 ± 5 nM EC ₅₀ 21,4 nM					(CALVET et al., 2014)
a82	K _D <10 nM EC ₅₀ 170±10 nM	X	X	X	X	(CALVET et al., 2014)
a83	K _D 16±4 nM EC ₅₀ 78±10 nM					(CALVET et al., 2014)
a84	K _D <10 nM EC ₅₀ 6,8±1,9 nM					(CALVET et al., 2014)
a85	K _D 240±110 nM EC ₅₀ 17±1 nM					(CALVET et al., 2014)
a86	K _D <10 nM EC ₅₀ 29±8 nM		X	X	X	(CALVET et al., 2014)

Figura A2 . Estrutura dos compostos ativos (inibidores) da enzima 14 α -demetilase para protozoário *Trypanosoma cruzi* que compõem a biblioteca de construção

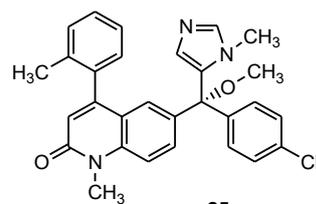




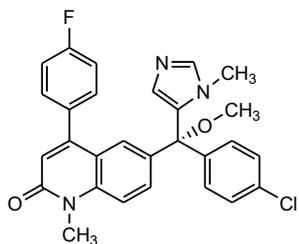
a23



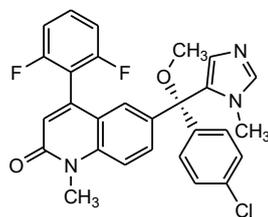
a24



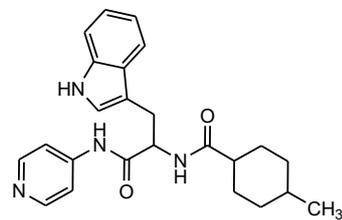
a25



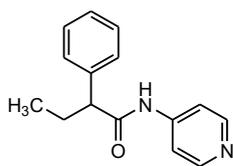
a26



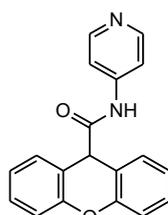
a27



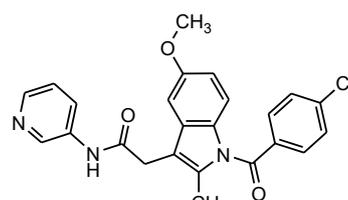
a28



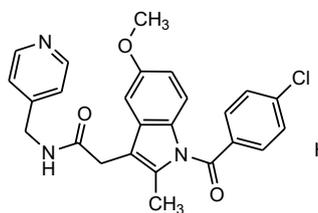
a29



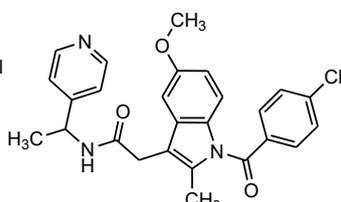
a30



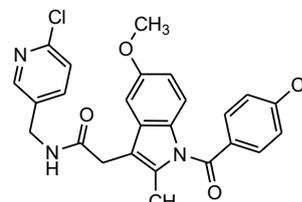
a31



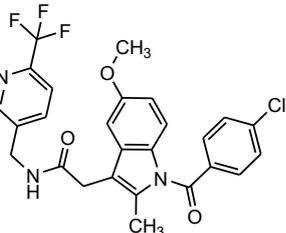
a32



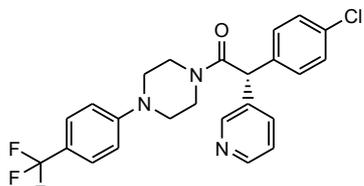
a33



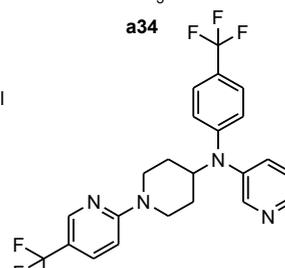
a34



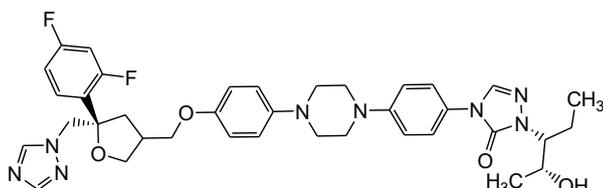
a35



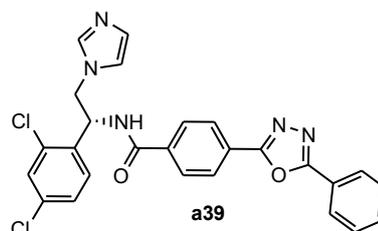
a36



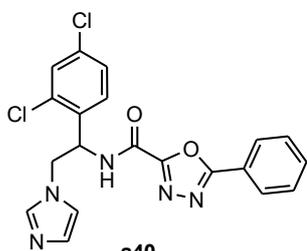
a37



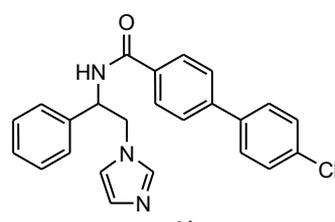
a38



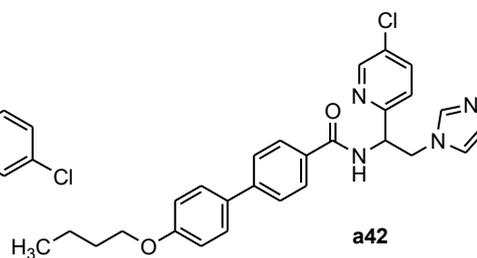
a39



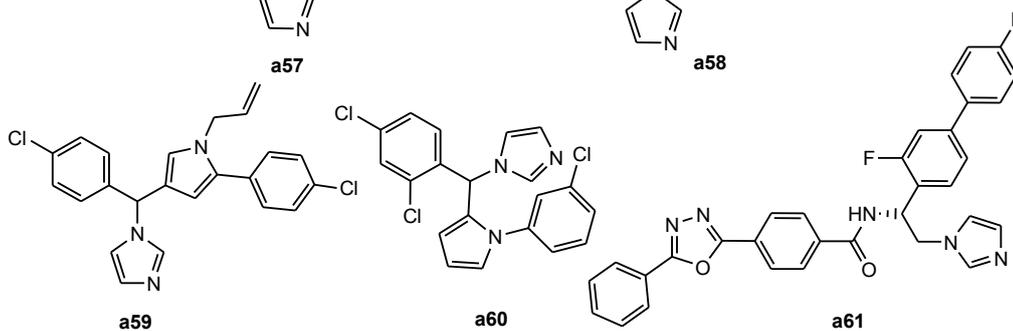
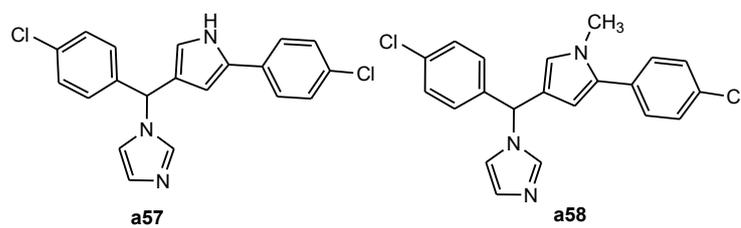
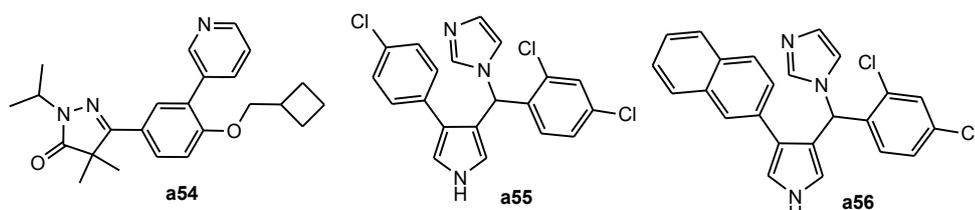
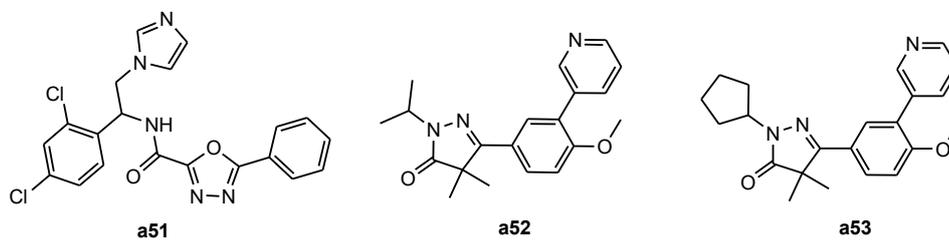
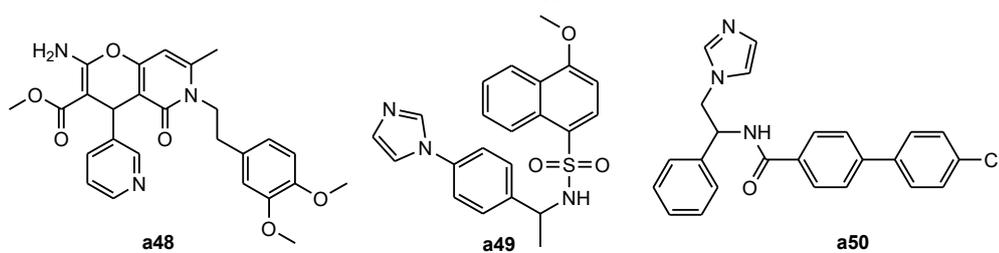
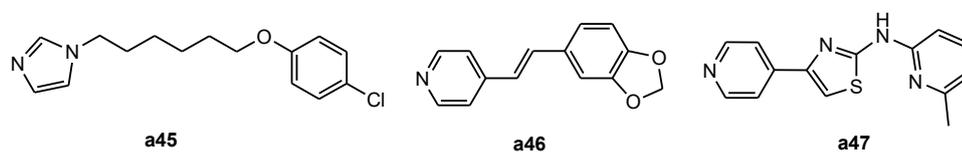
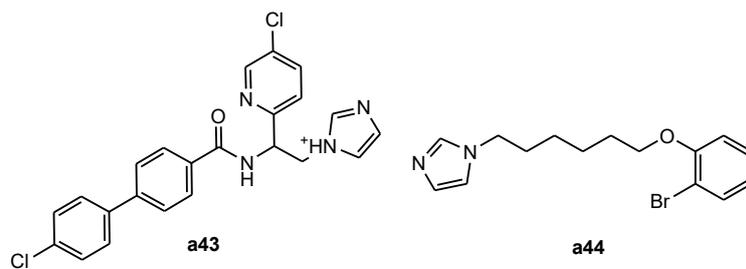
a40

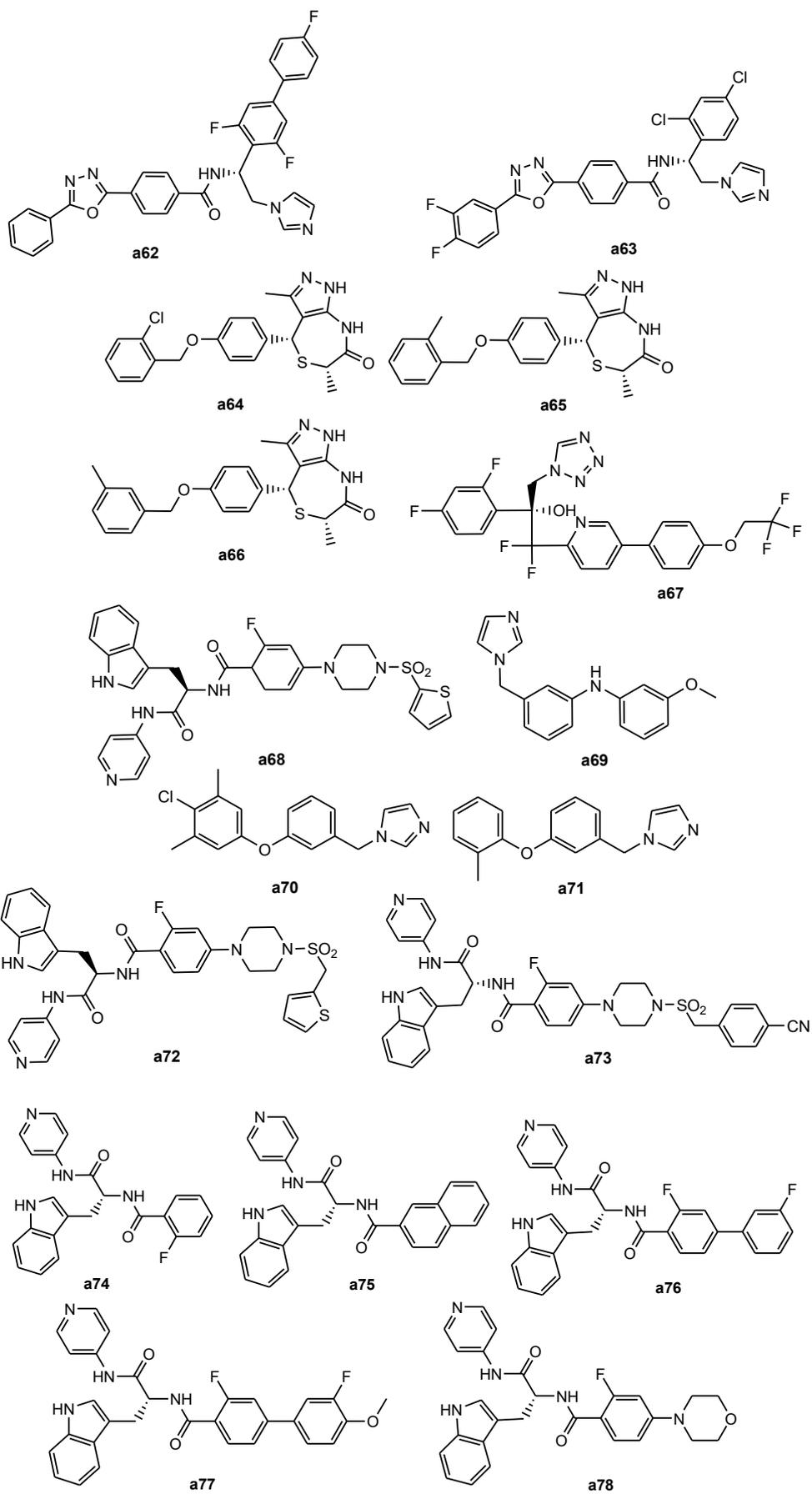


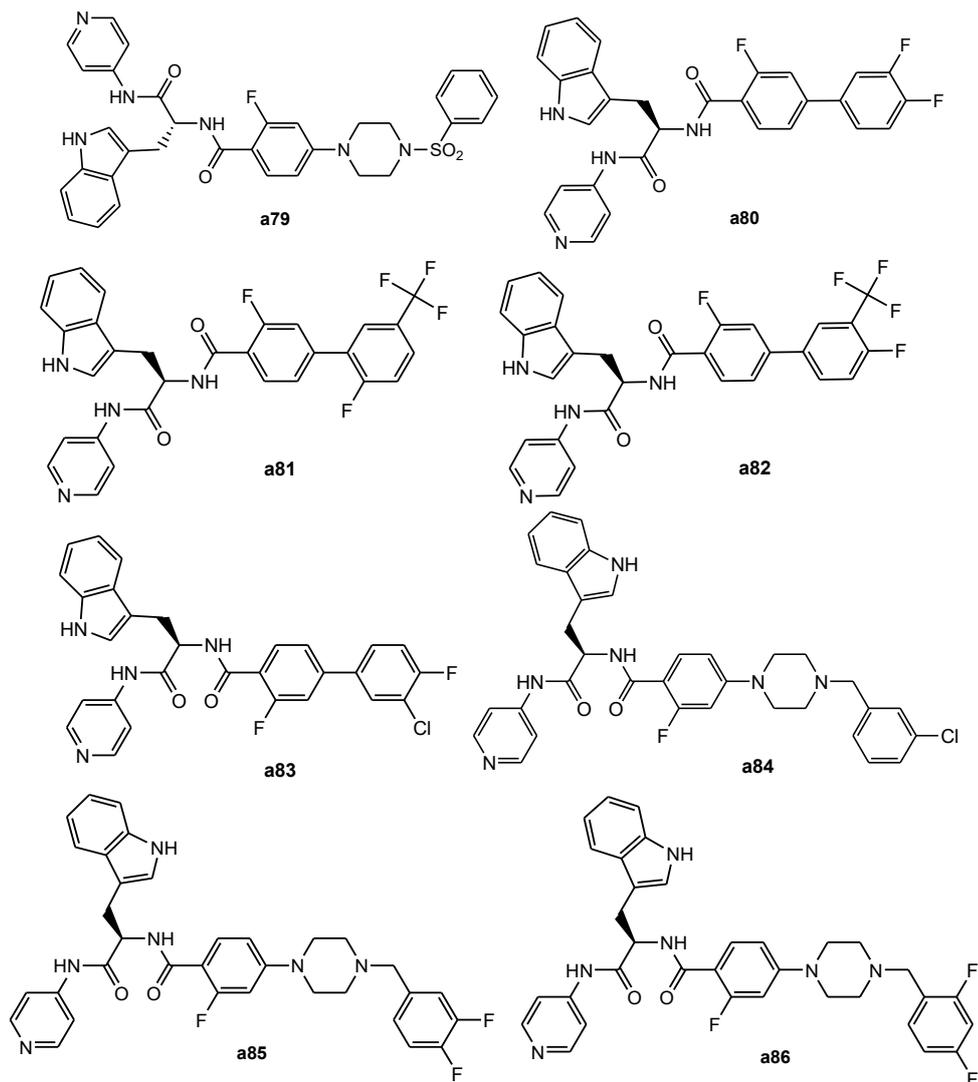
a41



a42







*Os inibidores da enzima CYP51 de *Acanthamoeba* spp, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. com os respectivos códigos a8, a38 e a98 tratam-se da molécula do posaconazol. Os compostos a61 e a87 tratam-se dos compostos VFV. E os compostos a39 e a90 trata-se do VNI.

Tabela A3. Dados referente aos compostos ativos (inibidores) da enzima 14 α -demetilase para protozoário *Leishmania* spp. e compostos considerados nos modelos farmacofóricos baseado nos ligantes

Inibidores	Atividade	Modelo Maior nº Moléculas	Modelo Maior score	Maior score (VNI)	Maior nº Moléculas (VNI)	Referências
a83	K _D 8,4 +/-4 nM			X	X	(FRIGGERI et al., 2018)
a84	K _D 24 +/-2 nM			X	X	(FRIGGERI et al., 2018)
a85	K _D 1,7 +/-1 nM			X	X	(FRIGGERI et al., 2018)
a86	K _D 2 +/- 0,2 nM			X	X	(FRIGGERI et al., 2018)
a87	IC ₅₀ 2,78 μ M	X				(SACCOLITI et al., 2019)
a88	IC ₅₀ 3,01 μ M	X				(SACCOLITI et al., 2019)
a89	IC ₅₀ 2,16 μ M	X				(SACCOLITI et al., 2019)
a90	IC ₅₀ 2,04 μ M	X				(SACCOLITI et al., 2019)
a91	IC ₅₀ 3,77 μ M	X				(SACCOLITI et al., 2019)
a92	K _D 0.156 +/- 0.006 μ M					(HARGROVE et al., 2013)
a93	K _D 0.419 +/- 0.019 μ M					(HARGROVE et al., 2013)
a94	K _D 0.018 +/- 0.001 μ M					(HARGROVE et al., 2013)
a95	IC ₅₀ 1,02 \pm 0,02 μ M K _i 7,00 nM	X	X			(ROJAS VARGAS et al., 2019)
a96	IC ₅₀ 10,23 \pm 1,16 μ M K _i 13,31 nM	X	X			(ROJAS VARGAS et al., 2019)
a97	IC ₅₀ 2,07 \pm 0,21 μ M K _i 0,36 nM	X	X			(ROJAS VARGAS et al., 2019)
a98	IC ₅₀ 8,20 \pm 0,81 μ M K _i 175,52 nM	X	X		X	(ROJAS VARGAS et al., 2019)
a99	IC ₅₀ 1,99 \pm 0,19 μ M K _i 128,58 nM	X	X		X	(ROJAS VARGAS et al., 2019)
a100	IC ₅₀ 4,11 \pm 0,51 μ M K _i 20.800 nM	X	X		X	(ROJAS VARGAS et al., 2019)
a101	IC ₅₀ 4,07 \pm 0,42 μ M K _i 61,34 nM	X				(ALBERTO et al., 2019)

Figura A3. Estrutura dos compostos ativos (inibidores) da enzima 14 α -demetilase para protozoário *Leishmania* spp. que compõem a biblioteca de construção

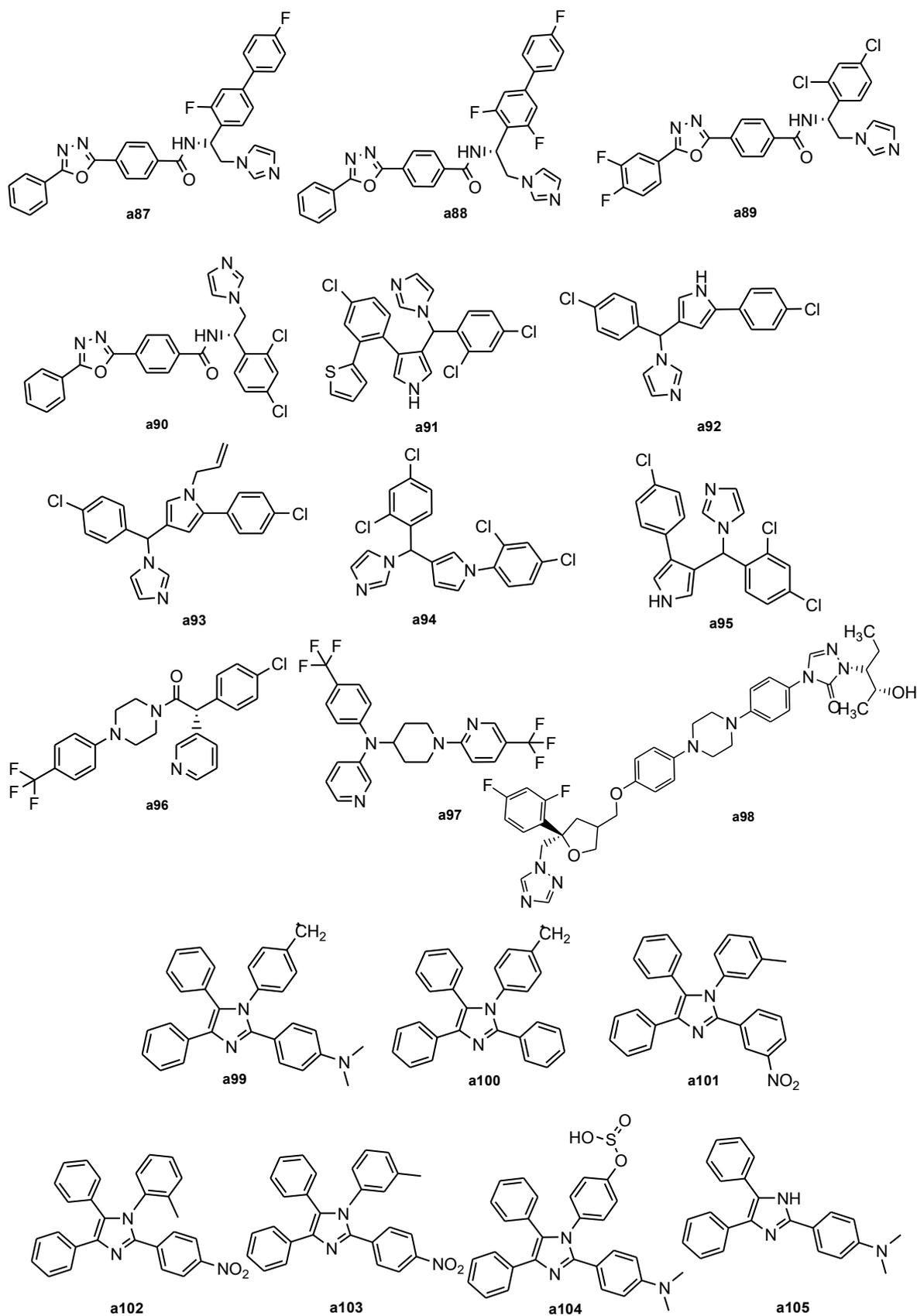


Tabela A4. Informações pertinentes ao depósito da estrutura cristalográfica da enzima CYP51 PDB 6UX0 de *Acanthamoeba castelanii*

Estrutura Cristalográfica Enzima CYP51 PDB 6UX0	
Classificação	Oxidoreductase
Organismo	<i>Acanthamoeba castelanii</i> str. Neff
Sistema de Expressão	<i>Escherichia coli</i>
Mutação	Não
Proteína de Membrana	Sim
Data de depósito no PDB	06-11-2019
Autores	Sharma, V., Podust, L.M.
Método de Cristalização	Difração de Raio-X
Ligante	Isavuconazol
Resolução	2.93 Å
Valor-R livre	0.308
Valor-R de trabalho	0.213
Valor-R observado	0.218
<i>Outliers</i> Ramachandran	2,5%

Tabela A5. Relação detalhada dos resultados para o modelo de farmacóforo validado referente aos inibidores da CYP51 para o protozoário *Acanthamoeba* spp.

Modelo de Farmacóforo Validado para CYP51 de <i>Acanthamoeba</i> spp.				
Modelo	1AC	2AC	3AC	4AC
<i>Score</i>	25.720 Jmol	25.720 Jmol	25.720 Jmol	25.720 Jmol
Aceptores	3	4	3	3
Aromaticidade	1	1	1	1
Hidrofobicidade	0	0	1	1
EF	22,7	50,0	50,0	50,0
Nº de compostos filtrados	89	5	6	3
Compostos Ativos	Ativos e inativos	4	2	2
Compostos Inativos	-	1	4	1
	Acceptor de hidrogênio	Acceptor de hidrogênio	Acceptor de hidrogênio	Acceptor de hidrogênio
	(x -3.018; y 0.0067); z -1.3506; r 0.1)			
	(x -5.078; y -0.3769; z -0.3946; r 0.5)			
	(x -0.4025; y -0.5847; z -1.6996; r 0.5)			
Coordenadas	Aromaticidade	Aromaticidade	Aromaticidade	Aromaticidade
	(x -3.8406; y 0.1132; z -0.306; r 1.10)			
		Acceptor de hidrogênio	Hidrofóbico	Hidrofóbico
		Voriconazol	Voriconazol	Itraconazol
		(x 0.9531; y -2.843; z -0.6214; r 0.8)	(x 0.8663; y 1.2908; z 1.8619; r 1.0)	(x 0.6496; y 0.612316; z -0.0564; r 1.0)

Tabela A6. Relação detalhada dos resultados para o modelo de farmacóforo validado referente aos inibidores da CYP51 para o protozoário *Trypanosoma cruzi*.

Modelo de Farmacóforo Validado para CYP51 de <i>Trypanosoma cruzi</i>				
Modelo	1TC1	1TC2	2TC	3TC
<i>Score</i>	40.000 Jmol	40.000 Jmol	67.752Jmol	30.845 Jmol
Doadores	1	2	1	0
Aceptores	2	1	2	3
Aromaticidade	2	2	2	2
EF	60,8	76,0	76,0	76,0
Nº de compostos filtrados	7	8	33	1
Compostos ativos	4	5	15	1
Coordenadas	Doador de hidrogênio (x -4.2811; y -1.1019; z -1.3309; r 0.5)	Doador de hidrogênio (x -4.2811; y -1.1019; z -1.3309; r 0.5)	Doador de hidrogênio (x 2.811; y -4.2099; z 1.457; r 0.5)	Aceptor de hidrogênio (x -8.2209; y 0.9676; z -0.969; r 0.5)
	Aceptor de hidrogênio (x -3.0705; y -0.5425; z 0.4421; r 0.5)	Aceptor de hidrogênio (x -3.0705; y -0.5425; z 0.4421; r 0.5)	Aceptor de hidrogênio (x 2.5092; y 0.495; z -1.6824; r 0.5)	Aromaticidade (x -4.026; y 1.8794; z -0.2342; r 0.5)
	Aromaticidade (x 0.1804; y 0.1937; z -0.025; r 1.10)	Aromaticidade (x 0.1804; y 0.1937; z -0.025; r 1.10)	Aromaticidade (x 8.4821; y 4.631; z -0.3168; r 0.5)	Aromaticidade (x -11.783; y 1.2015; z -0.0812; r 1.10)
	Aceptor de hidrogênio do POSA (x 0.2836; y 2.365; z 0.1095; r 1.10)	Aceptor de hidrogênio do POSA (x 0.2836; y 2.365; z 0.1095; r 1.10)	Aromaticidade (x -0.6661; y 0.9044; z 0.0187; r 1.10)	Aromaticidade (x -1.3066; y 1.5304; z -0.3439; r 1.10)
	Aceptor de hidrogênio do POSA (x -8.2209; y 0.9676; z -0.969; r 0.5)	Doador de hidrogênio do posaconazol (x 0.2836; y 2.365; z 0.1095; r 1.10)	Doador de hidrogênio do posaconazol (x 7.8157; y 3.4684; z -0.2329; r 1.10)	Aceptor de hidrogênio do posaconazol (x 9.6961; y -1.8934; z -0.6449; r 0.5)

Tabela A7. Relação detalhada dos resultados para o modelo de farmacóforo validado referente aos inibidores da CYP51 para o protozoário *Leishmania* spp.

Início:

Modelo de Farmacóforo Validado para CYP51 de <i>Leishmania</i> spp.			
Modelo	1LS	2LS1	2LS2
<i>Score</i>	38.141Jmol	52.500 Jmol	52.500 Jmol
Doadores	0	0	0
Aceptores	1	1	1
Aromaticidade	3	4	4
EF	23,3	64,0	64,0
Nº de compostos filtrados	526	353	353
Compostos ativos	12	7	7
	Aceptor de hidrogênio	Aceptor de hidrogênio	Aceptor de hidrogênio
	(x -0.3594; y 1.7922; z -0.0587; r 0.5)	(x -1.9626; y -1.9905; z -0.0091; r 0.5)	(x -1.9626; y -1.9905; z -0.0091; r 0.5)
	Aromático	Aromático	Aromático
	(x -0.6464; y 0.6732; z 0.0309; r 1.10)	(x -1.7194; y -0.8772; z 0.0126; r 1.10)	(x 1.6841; y -2.9915; z -0.0045; r 1.10)
Coordenadas	(x -3.9758; y 2.9561); z -0.1705; r 1.10)	(x -5.7197; y -1.3108; z -0.0388; r 1.10)	(x -1.7194; y -0.8772; z 0.0126; r 1.10)
	(x -3.6825; y -1.9235); z 0.2328; r 1.10)	(x -3.3145; y 2.8324; z 0.0625; r 1,10)	(x -3.3145; y 2.8324; z 0.0625; r 1.10)
		(x 1.2966; y 1.6724; z 0.0895; r 1.10)	(x 1.2966; y 1.6724; z 0.0895; r 1.10)

Continuação:

Modelo de Farmacóforo Validado para CYP51 de <i>Leishmania</i> spp.		
Modelo	3LS	4LS
<i>Score</i>	66.144 Jmol	37.947 Jmol
Doadores	1	0
Aceptores	2	2
Aromaticidade	2	3
EF	64,0	64,0
Nº de compostos filtrados	27	139
Compostos ativos	4	7
	Aceptor de hidrogênio	Aceptor de hidrogênio
	(x 6.3932; y 0.8284; z 1.0062; r 0.5)	(x -0.2423; y 3.3891; z 1.0063; r 0.5)
	(x 7.4189; y 0.0679; z 0.8481; r 0.5)	(x 6.3932; y 0.8284; z 1.0062; r 0.5)
	Doador de hidrogênio	Aromático
Coordenadas	(x -1.0301; y 1.5369; z 0.0673; r 0.5)	(x 2.6512; y 1.2471; z 0.5591; r 1.10)
	Aromático	(x 6.3771; y -0.1893); z 0.5612; r 1.10)
	(x 2.6512; y 1.2471; z 0.5591; r 1.10)	(x 8.7413; y -3.2707); z -0.38; r 1.10)
	(x 8.7413; y -3.2707; z -0.38; r 1.10)	

Tabela A8. Relação detalhada dos resultados para o modelo de farmacóforo validado referente a estrutura da enzima CYP51 para o protozoário *Acanthamoeba castelanii*

Modelo de Farmacóforo Validado para CYP51 de <i>Acanthamoeba castelanii</i>			
Modelo	Modelo 1.1	Modelo 2.1	Modelo 3.1
Doadores	0	1	0
Aceptores	0	0	1
Aromaticidade	2	1	1
Hidrofobicidade	4	3	4
EF	67,4	67,4	33,7
Nº de compostos filtrados	2	3	4
Compostos ativos	2	3	4
	Aromático	Doador de hidrogênio do	Aceptor de hidrogênio do
	(x -16.443; y 26.0204; z -18.390; r 1.0)	Isavuconazol	Isavuconazol
	(x -13.852; y 23.3186); z -17.109; r 1.0)	(x -19.246; y 28.424; z -18.872; r 0.4)	(x -19.344; y 29.56; z -14.585; r 0.6)
	Hidrofóbico	Aromático	Aromático
	(x -22.628; y 27.9025; z -17.545; r 1.0)	(x -16.443; y 26.0204; z -18.390; r 1.0)	(x -16.443; y 26.0204; z -18.390; r 1.0)
	Hidrofóbico	Hidrofóbico	Hidrofóbico
Coordenadas	(x -19.618; y 30.3564; z -15.440; r 1.0)	(x -22.628; y 27.9025; z -17.545; r 0.7)	(x -13.852; y 23.3186; z -17.109; r 1.0)
	(x -23.902; y 29.107; z -19.597; r 1.0)	(x -19.618; y 30.3564; z -15.440; r 0.7)	(x -22.628; y 27.9025; z -17.545; r 1.0)
	(x -21.304; y 26.709; z -15.529; r 1.0)	(x -19.686; y 25.963; z -19.703; r 1.0)	(x -19.618; y 30.3564; z -15.440; r 1.0)
			(x -19.686; y 25.963; z -19.703; r 1.0)

Figura A4. Gráfico de Ramachandran gerado com base na estrutura cristalográfica da enzima CYP51 PDB 6UX0 de *Acanthamoeba castellanii*

