



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

FILIPE RODRIGUES DE OLIVEIRA SILVA

**PLANEJAMENTO DE INIBIDORES DA ENZIMA TRIPANOTIONA  
REDUTASE UTILIZANDO FERRAMENTAS *IN SILICO***

ORIENTADORA: Profa. Dra. Lílian Sibelle Campos Bernardes

Florianópolis

2022

Filipe Rodrigues de Oliveira Silva

**Planejamento de inibidores da enzima tripanotona redutase utilizando  
ferramentas *in silico***

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-Medicamentos

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Lílian Sibelle Campos Bernardes**

Florianópolis

2022

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

Silva, Filipe Rodrigues de Oliveira  
Planejamento de inibidores da enzima tripanotiona  
redutase utilizando ferramentas in silico / Filipe  
Rodrigues de Oliveira Silva ; orientador, LÍlian Sibelle  
Campos Bernardes, 2022.  
122 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. Farmácia. 3. Tripanotiona redutase. 4.  
Modelagem molecular. 5. Análogo acetamida. I. Bernardes,  
LÍlian Sibelle Campos. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Filipe Rodrigues de Oliveira Silva

**Planejamento de inibidores da enzima tripanotiona redutase utilizando  
ferramentas *in silico***

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

Prof. Ricardo Ferreira Affeldt, Dr.  
UFSC, Florianópolis, SC (Membro Titular)

Prof. Filipe Carvalho Matheus, Dr.  
UFSC, Florianópolis, SC (Membro Titular)

Profa. Solange Lúcia Blatt, Dra.  
UFSC, Florianópolis, SC (Membro Suplente)

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.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Profa. Dra. Lilian Sibelle Campos Bernardes  
Orientadora

Florianópolis, 2022

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Marthin Luther King

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-graduação em Farmácia pela oportunidade proporcionada de realizar meu mestrado e a CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa concedida.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram em algum momento desta jornada desafiadora, em especial:

A Deus, a quem devo todas as realizações da minha vida.

A minha família principalmente a minha mãe Ivone que foi meu alicerce durante toda vida, e que nesta jornada muitas vezes difíceis e desanimadoras me deu cada vez mais apoio para prosseguir com meus sonhos, sendo uma mulher exemplar e motivo de orgulho.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Lilian Sibelle Campos Bernardes que teve papel fundamental na elaboração deste trabalho, e que deu todo suporte material, organizacional, motivacional e conhecimento científico, mas além do que já foi citado pelo carinho, paciência e muito cuidado que dedicou a mim durante toda este tempo difícil percorrido na execução do mestrado.

Aos meus companheiros de laboratório Lucas, Camila e principalmente a Suellen que estive desde o início desta caminhada comigo, por sempre me escutar, por me auxiliar em momentos de difícil compreensão de determinados temas e pelo companheirismo de almoços no RU.

Aos meus amigos Eduarda, Carolina, Lisandra, Ediana por estarem comigo em grande parte deste processo desde a graduação até o mestrado, e em especial a minha amiga Lais por mais uma vez ser uma grande parceira durante todos os momentos alegres e difíceis que enfrentei durante tempos muito, mas muito desafiadores.

## RESUMO

O processo de desenvolvimento de novos fármacos é complexo, oneroso e prolongado devido aos diversos processos envolvidos até o registro sanitário do novo composto. A durabilidade destes estudos eleva o custo e tempo empregados no desenvolvimento, e as técnicas computacionais e de inteligência artificial auxiliam na diminuição do tempo e custo deste processo. Neste trabalho foram realizados estudos de modelagem molecular *in silico* de 7 análogos da acetamida 1, um inibidor da tripanotiona redutase, enzima presente em parasitas como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. As propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), juntamente com a avaliação *druglikeness*, foram calculadas e avaliadas utilizando servidores como OSIRIS, SwissADME, PreADMET e Pro-tox II. Os resultados das previsões de ADMET e de *drug-likeness* sugeriram que quatro destes compostos apresentam parâmetros *drug-likeness* promissores e todos apresentaram de média a baixa probabilidade de toxicidade. Por fim, foram realizados estudos de *docking* molecular na enzima tripanotiona redutase utilizando o programa GOLD e, a partir das análises, foi possível selecionar 3 análogos que demonstraram interações moleculares favoráveis *in silico*, sugerindo que podem atuar como potenciais inibidores da tripanotiona redutase.

**Palavras-chave:** Doença de chagas; leishmaniose, tripanotiona redutase; estudos *in silico*; modelagem molecular; *drug-likeness*.

## ABSTRACT

The process of developing new drugs is complex, expensive, and prolonged due to the different processes involved until the sanitary registration of the new compound. The durability of these studies increases the cost and time used in the development, and computational and artificial intelligence techniques help to reduce the time and cost of this process. In this work, *in silico* molecular modeling studies of 7 analogs of acetamide 1, an inhibitor of trypanothione reductase, an enzyme present in parasites such as *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. Physicochemical, and pharmacokinetic properties such as absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET), along with drug-likeness assessment, were calculated and evaluated using servers such as OSIRIS, SwissADME, PreADMET, and Pro-tox II. The results of ADMET and drug-likeness predictions suggested that four of these compounds have promising drug-likeness parameters and all have a medium to a low probability of toxicity. Finally, molecular docking studies were performed on the trypanothione reductase enzyme using the GOLD program and, from the analysis, it was possible to select 3 analogs that demonstrated favorable molecular interactions *in silico*, suggesting that they may act as potential inhibitors of trypanothione reductase.

**Keywords:** Chagas disease; Leishmaniasis; trypanothione reductase; *in silico* studies; molecular modeling; drug-likeness.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Processo de desenvolvimento de fármacos, adaptado de Bhagat e Butle (2021). ....	11
Figura 2 - Estrutura química dos fármacos atualmente utilizados para controle parasitário benznidazol e nifurtimox. ....	17
Figura 3 - Estrutura química dos principais fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses. ....	19
Figura 4 - Esquema reacional do metabolismo da tripanotona. ....	22
Figura 5 - Dímero da enzima tripanotona redutase de <i>T. cruzi</i> com as cadeias A e B (adaptado de BOND <i>et al.</i> , 1999). ....	23
Figura 6 - Comparação entre os dois sítios catalíticos: em verde, glutatona redutase (1XAN) e em ciano, tripanotona redutase (1BZL). ....	24
Figura 7 - Antidepressivos tricíclicos identificados com ação na tripanotona redutase. ....	25
Figura 8 - Estrutura química dos compostos S21 e S33, estudo realizado por Zimmermann, 2018. ....	36
Figura 9 - Estrutura química do composto S21, selecionado em estudos de triagem virtual e seu análogo acetamida 1, obtido por simplificação molecular e variação de grupos funcionais. ..	37
Figura 10 - À esquerda o Bioavailability Radar- gráfico de perfil ideal de biodisponibilidade (área rosa) e à direita o gráfico BoiledEgg. ....	41
Figura 11 - Estrutura do composto 1 e os respectivos análogos propostos, compostos 2-8. ....	45
Figura 12 - Complexo cristalográfico da enzima tripanotona redutase, modelo 1BZL. ....	46
Figura 13 - Radar de biodisponibilidade dos compostos 2,3,4 e 8. ....	52
Figura 14 - Radar de biodisponibilidade dos compostos 5,6 e 7. ....	53
Figura 15 - BOILED-Egg dos análogos. ....	54
Figura 16 - Posições dos átomos para análise dos prováveis sítios de metabolização fornecidos pelas plataformas SmartCYP e SOMP. ....	59
Figura 17 - Prováveis sítios de interações fornecidos pela ferramenta SmartCYP para os compostos 2,3,6 e 8. ....	59
Figura 18 - Prováveis sítios de interações fornecidos pela ferramenta SmartCYP para os composto 4,5 e 7. ....	60
Figura 19 - Prováveis sítios de interações fornecidos pela ferramenta SOMP para os compostos 2 e 3. ....	62
Figura 20 - Prováveis sítios de interações fornecidos pela ferramenta SOMP para os compostos 4 e 5. ....	62

Figura 21 - Prováveis sítios de interações fornecidos pela ferramenta SOMP para os compostos 6 e 7. ....	63
Figura 22 - Prováveis sítios de interações fornecidos pela ferramenta SOMP para o composto 8. ....	64
Figura 23 - Número de alvos indicados pelo PASSonline para cada composto do estudo. ....	69
Figura 24 - Interações entre os resíduos de aminoácidos do receptor tripanotiona redutase com o modelo de bis(gamma-glutamil-cisteinil-glicinil)espermidina construído para a validação da docagem.....	73
Figura 25 -. Disposição dos análogos biossintéticos no sítio ativo da tripanotiona redutase.	74
Figura 26 - Posições dos átomos para análise dos resultados das interações obtidas através do <i>docking molecular</i> e das reações de metabolismo.....	74
Figura 27 - Interações obtidas no processo de <i>docking</i> com o composto 2.....	79
Figura 28 - Interações obtidas no processo de <i>docking</i> com o composto 3.....	80
Figura 29 - Interações obtidas no processo de <i>docking</i> com o composto 4.....	81
Figura 30 - Interações obtidas no processo de <i>docking</i> com o composto 5.....	82
Figura 31 - Interações obtidas no processo de <i>docking</i> com o composto 6.....	83
Figura 32 - Interações obtidas no processo de <i>docking</i> com o composto 7.....	83
Figura 33 - Interações obtidas no processo de <i>docking</i> com o composto 8.....	84
Figura 34 - Rota sintética proposta para obtenção de análogos bioisómeros do protótipo acetamida 1.....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados dos compostos obtidos no software “Osiris DataWarrior”. .....	48
Tabela 2 - Dados dos compostos obtidos nos softwares SwissADME e PreADMET.	50
Tabela 3 - Valores da % de ligação a proteínas plasmáticas, ação de inibição na Pgp e logKp referente a permeabilidade da pele. ....	55
Tabela 4 - Resultado da predição de inibição dos compostos as isoformas CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4 .....	57
Tabela 5 - Perfil toxicológico preditos pelo ProTox II para os compostos 2-8.....	65
Tabela 6 - Resultados dos testes de toxicidade fornecido pelo PreADMET.....	67
Tabela 7 - Potenciais atividades biológicas identificadas, pelo PASSonline para cada composto. ....	70
Tabela 8 - Predição de atividades anti parasitárias fornecidas pelo PASSOnline dos compostos 2 - 8.....	71
Tabela 9 - Principais interações encontradas para os derivados ancorados na TR.....	75

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos descritores moleculares. ....	29
Quadro 2 - Parâmetros estatísticos empregados na validação interna.....	31
Quadro 3 - Parâmetros estatísticos empregados na validação externa. ....	33
Quadro 4 - Resultados obtidos na etapa de validação do processo de docagem. Ligante: composto bis(gamma-glutamil-cisteinil-glicinil)espermidina.....	70
Quadro 5 - Ranking de melhores scores de cada derivado biossintético obtidos no estudo de docagem molecular pelo software GOLD.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D bidimensional

3D tridimensional

ADME Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção

AM1 Austin Model 1

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASP Astex Statistical Potential

BHE Barreira hemato encefálica

*Caco-2* Células de adenocarcinoma colorretal humano

CI<sub>50</sub> Concentração inibitória média

COVID-19 Coronavirus disease 2019

CYP Citocromo P

Da Dalton

DS Discovery Studio

DTN Doenças tropicais negligenciadas

ESOL Estimated SOLubility

FAD Flavina adenina dinucleotídeo

FAD flavina adenina dinucleotídeo

FDA Food and Drug Administration

GA *genetic algorithm*

GR Glutathione redutase

GSE General Solubility Equation

HIA Absorção gastrointestinal passiva

HIV Vírus da imunodeficiência humana

HTS High-throughput screening

IUPAC União Internacional de Química Pura e Aplicada

K<sub>i</sub> Constante de inibição

K<sub>p</sub> coeficiente de permeabilidade da pele

LBDD ligand-based drug design

LogP coeficiente de partição octanol/água

LogS coeficiente de solubilidade

MDCK Células renais caninas Madin-Darby  
MDR1 Multidrug resistance protein 1  
MNDO *modified neglect of diatomic overlap*  
NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina  
NADPH Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina  
NHBA Número de aceptores de hidrogênio  
NHBD Número de doadores de hidrogênio  
NRotb Número de ligações rotacionáveis  
OMS Organização Mundial da Saúde  
PAINS *pan assay interference compounds*  
PASS Prediction of Activity Spectra for Substances  
PBPK *Physiologically based pharmacokinetic*  
PCDT Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas  
PD&I Pesquisa, desenvolvimento e inovação  
PDB Protein Data Bank  
PDR Physicians Desk Reference  
Pgp Glicoproteína P  
PHP *Hypertext Preprocessor*  
PK *clinical pharmacokinetic*  
PM peso molecular  
PM3 Parametric Method 3  
PM7 Parametric Method 7  
PPB *Plasma Protein Binding*  
PSA Área de superfície polar  
QM Quantum mechanics  
QSAR *Quantitative structure-activity relationship*  
QSPR *Quantitative structure-property relationship*  
REA Relação estrutura atividade  
RMN Ressonância magnética nuclear  
RO5 Rega dos 5  
SBDD structure-based drug discovery  
SMILES Simplified Molecular Input Line Entry System  
SOM *Site of metabolism*

SOMP *Site of metabolism prediction*

TGI Trato gastrointestinal

TPSA área topológica superficial polar

TR Tripanotiona redutase

TXN Triparedoxina

TXNPx Triparedoxina peroxidase I

UGT uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase

VS *Virtual Screening*

LD<sub>50</sub> Dose letal média

hERG - *Ether-a-go-go potassium channel*

## LISTA DA NOMENCLATURA DOS AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Código
Glicina	Gly
Alanina	Ala
Leucina	Leu
Valina	Val
Isoleucina	Ile
Prolina	Pro
Fenilalanina	Phe
Serina	Ser
Treonina	Thr
Cisteína	Cys
Tirosina	Tyr
Asparagina	Asn
Glutamina	Gln
Aspartato	Asp
Glutamato	Glu
Arginina	Arg
Lisina	Lys
Histidina	His
Triptofano	Trp
Metionina	Met



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
2.1	QUÍMICA MEDICINAL E PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS.....	13
2.2	DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOES.....	15
2.3	ALVOS MOLECULARES E ESTUDOS COMPARATIVOS .....	20
<b>2.3.1</b>	<b>Tripanotona redutase.....</b>	<b>21</b>
2.4	ABORDAGENS COMPUTACIONAIS.....	25
<b>2.4.1</b>	<b>Interação ligante proteína e <i>docking molecular</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Farmacocinética baseada em fisiologia (PBPK).....</b>	<b>31</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Análises <i>in silico</i> de propriedades farmacocinéticas, metabolismo e toxicologia.</b>	<b>32</b>
2.5	COMPOSTOS CARBAMATOS E ACETAMIDAS COM ATIVIDADE TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA.....	34
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
<b>3.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>38</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>		<b>39</b>
4.1	ESTUDOS COMPUTACIONAIS .....	39
<b>4.1.1</b>	<b>Preparação da estrutura dos compostos.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.2</b>	<b><i>Docking molecular</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Avaliação <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas e de biodisponibilidade.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Avaliação <i>in silico</i> das propriedades de metabolismo dos compostos e toxicidade .</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
5.1	PLANEJAMENTO .....	44
5.2	ENSAIOS <i>IN SILICO</i> .....	46

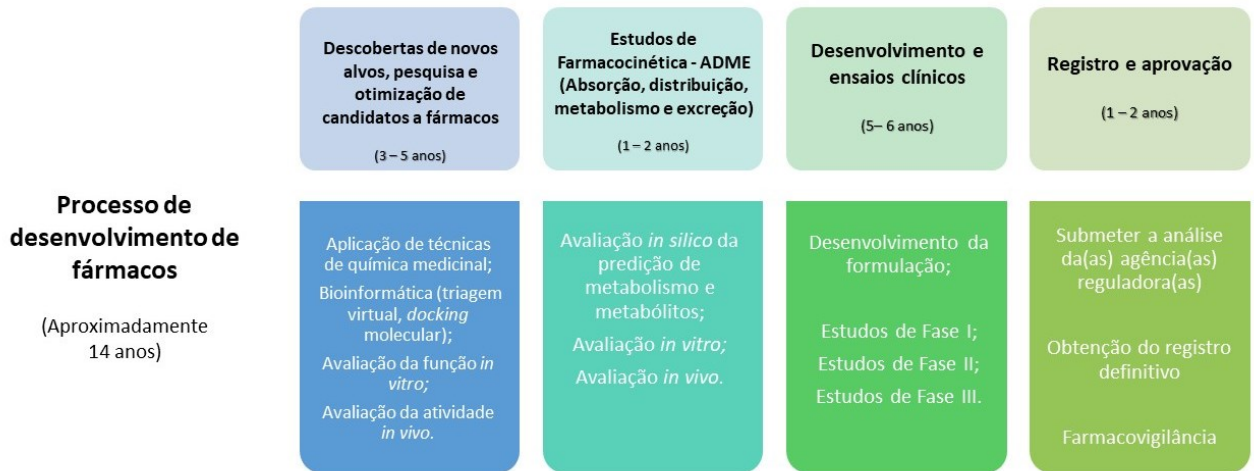
5.2.1	Avaliação <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas e biodisponibilidade.....	47
5.2.2	Avaliação <i>in silico</i> do metabolismo dos compostos.....	56
5.2.3	Docking molecular.....	71
6	CONCLUSÃO .....	86
7	PERSPECTIVAS.....	87
	REFERÊNCIAS .....	89



## 1 INTRODUÇÃO

A pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) de fármacos é um processo complexo, oneroso e de grande duração, que pode durar entre os processos de fase pré-clínica até o registro sanitário, cerca de 14 anos com um custo de aproximadamente US\$ 1,8 bilhões (BHAGAT; BUTLE, 2021). O estímulo para a produção de novos projetos de desenvolvimento de fármacos tem como motivação diversos fatores, entre eles, o fato que ainda existem patologias e condições clínicas em que não há disponibilidade de tratamentos adequados, quando há alternativa medicamentosa algumas vezes é de alto custo e também há presença ainda de tratamentos que causam diversos efeitos adversos dificultando assim a adesão medicamentosa (SCHUHMACHER *et al.*, 2016; LUPATINI *et al.*, 2019).

Figura 1- Processo de desenvolvimento de fármacos, adaptado de Bhagat e Butle (2021).



Fonte: AUTOR (2022)

O desenvolvimento dessas substâncias que serão futuramente candidatas a fármacos, além de um elevado custo e alta demanda de tempo, também requer uma combinação de ações com a atuação de diversas áreas da ciência e de novas tecnologias, e como consequência desta integração nos últimos anos obtiveram-se resultados expressivos no desenvolvimento de diversas estratégias no planejamento de novos compostos ativos e inovações terapêuticas com resultados promissores (AMARAL *et al.*; 2017; BHAGAT; BUTLE, 2021).

As novas tecnologias, entre elas as computacionais e de inteligência artificial também desenvolvem papel fundamental neste processo, pois oferecem mais opções para os avanços científicos na pesquisa e desenvolvimento de fármacos, e levando a resultados bem promissores para melhorias na qualidade de vida de distintas populações ao redor de mundo (AMARAL *et. al.*; 2017; SWINNEY; ANTHONY, 2011).

A química medicinal fornece ampla interdisciplinaridade temática, com a aplicação de conhecimentos de várias áreas científicas como, por exemplo, a química com o aperfeiçoamento de técnicas de síntese orgânica, análise e purificação de substâncias, e, na biologia em que seus conceitos esclarecem informações relevantes sobre mecanismos fisiopatológicos e farmacológicos para o melhor entendimento dos processos de reconhecimento da molécula e seu alvo de ação e desenvolvimento de ensaios biológicos, além da análise de propriedades toxicológicas e farmacocinética dos candidatos a fármacos (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Os processos de identificação e otimização de protótipos é uma das etapas mais desafiadoras na pesquisa por novos fármacos, sendo necessário o conhecimento e a associação de diferentes abordagens científicas e tecnológicas (PATRICK, 2017). Acompanhando a evolução científica, duas principais estratégias se destacam: o planejamento fenotípico de fármacos, o qual consiste na identificação de um composto com atividade farmacológica, e a partir deste protótipo, se obtém análogos estruturais que podem ser modificados, permitindo explorar o espaço químico de um determinado esqueleto estrutural, favorecendo os estudos de relação estrutura-atividade e contribuindo para o planejamento de compostos com propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas adequadas para que possam se tornar um fármaco. E, o planejamento genotípico, o qual consiste na identificação de um alvo molecular validado, a identificação de um composto “*hit*” para aquele alvo e realização de modificações moleculares dessa molécula, visando a otimização do perfil de atividade biológica, bem como de propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. (WERMUTH, 2015; ZIMMERMANN, 2018).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 QUÍMICA MEDICINAL E PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

A química medicinal tem como objetivo o estudo e aprimoramento de técnicas para potencialização de compostos, que estão em fase de desenvolvimento ou mesmo já descobertos em fase pré-clínica ou mesmo aprovados, e estes estudos possuem como finalidade aumentar a potência destes compostos frente aos alvos, mitigar efeitos adversos e descobrir novos alvos para essas moléculas com o intuito de tratar várias doenças e ter a possibilidade de prolongar e aumentar a qualidade de vida (IMMING *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2016).

O corpo humano nada mais é que uma entidade biológica, e para que os objetivos farmacoterapêuticos de novos fármacos sejam alcançados, as descobertas na área da ciência biológica são, sem dúvida, de extrema importância, pois entender todo sistema biológico e metabólico principalmente do complexo enzima receptor, é essencial na prática da química medicinal (IMMING *et al.*, 2006; CHOU, 2017).

Para o processo de desenvolvimento e produção de fármacos normalmente levam-se em consideração algumas abordagens para a definição de prioridades, uma dessas é quantitativa e utiliza como parâmetro os dados epidemiológicos (morbidade, mortalidade ou carga de doença), financeiros (custos e utilização) e clínicos, entre outros. Esse tipo de abordagem pode ser melhor visualizada em um grande relatório realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que considera que, quanto maior a carga da doença, maior sua importância sanitária, maior o custo da doença para a sociedade e mais prioritária para a Saúde Pública (WHO, 2013; FIGUEIREDO, 2016).

O processo para a descoberta de um novo composto e seu desenvolvimento, é um processo demorado e custoso com elevado tempo médio envolvido no desenvolvimento de que pode variar anos ou mesmo décadas (VAN NORMAN, 2016; BHAGAT; BUTLE, 2021). Pensando nestas dificuldades encontradas no processo, normalmente as indústrias farmacêuticas utilizam de preferência os estudos de patologias cujo custo do tratamento fornecerão rápido retorno financeiro. Segundo revisão de Weng, Chen e Wang (2018) em 2010, o investimento de US \$ 2,4 bilhões em doenças tropicais negligenciadas (DTN) representou apenas 1% das despesas gerais com pesquisas relacionadas à saúde, e no período entre 2000 e 2013, houve três novas aprovações de fármacos para tratamento de DTN, e cinco fármacos direcionados a DTN estavam em ensaios clínicos de fase III, incluindo um para dengue, três

para oncocercose/esquistossomose e um para todas as três doenças (leishmaniose, doença de Chagas e doença do sono africana) (WENG; CHEN; WANG,2018; BHAGAT; BUTLE, 2021).

As abordagens computacionais, como a triagem virtual baseada nas estruturas de grandes bibliotecas digitais de compostos e a avaliação dos modos de ligação do ligante em seu alvo, tornaram-se um componente de extrema importância na descoberta de fármacos na atualidade. Além de fornecer informações importantes sobre moléculas que potencialmente se ligam a um alvo específico, também auxiliam na interpretação de observações experimentais, como estudos de relação estrutura atividade (REA) (LYU *et al.*, 2019; FISCHER *et al.*, 2021).

Um dos principais métodos aplicados na descoberta de medicamentos com base na estrutura é o acoplamento ou ancoragem molecular também comumente chamado de *docking molecular* (LYU *et al.*, 2019). A adesão a técnica da triagem virtual deve-se principalmente a seu custo-benefício, já que seu uso permite em sua grande maioria minimizar os custos e reduzir a ocorrência de falhas no estágio final, já que é uma ferramenta que traz informações relevantes sobre possíveis modos de interação e afinidade de um ligante a uma determinada proteína aumentando assim seu potencial na identificação de novos quimiotipos e percepções com uma maior acurácia das interações entre o ligante e seu alvo (MACALINO *et al.*, 2015; FISCHER *et al.*, 2021).

Os processos de identificação e otimização de protótipos é uma das etapas mais desafiadoras na pesquisa e desenvolvimento, sendo necessário o conhecimento e a associação de diferentes abordagens científicas e tecnológicas (PATRICK, 2017).

As estratégias de modificação molecular permitem explorar o espaço químico de um determinado esqueleto estrutural, favorecendo os estudos de relação estrutura-atividade e contribuindo para o planejamento de compostos com propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas adequadas para que possam se tornar um fármaco. Entre estas estratégias, o bioisosterismo se destaca em função de sua versatilidade permitindo que seja feita uma avaliação da influência química e estérica de determinados grupos funcionais (WERMUTH, 2015; BARREIRO; FRAGA, 2015; PATRICK,2017).

O aprimoramento de parâmetros físico-químicos é um grande desafio no processo de desenvolvimento de fármacos, e a abordagem *in silico* é de extrema importância neste processo. O processo de metabolização de xenobióticos (por exemplo, fármacos) envolve biologicamente ação de transportadores e enzimas, através de um processo denominado biotransformação em que os fármacos são modificados estruturalmente em diferentes moléculas (metabólitos) por várias enzimas com capacidade metabolizadoras (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Os estudos acerca deste tema são considerados processos-chave na otimização de compostos líderes, no desenvolvimento de compostos com propriedades farmacocinéticas ideais, na identificação de novas entidades químicas com base na descoberta de metabólitos ativos, na minimização de potenciais riscos de segurança do seu uso devido à formação de metabólitos reativos ou tóxicos, e, para comparar resultados pré-clínicos do metabolismo entre animais com humanos e assim garantir uma reprodutibilidade adequada acerca da produção de metabólitos nessas espécies e para apoiar a previsão da dose terapêutica humana segura (ZHANG; TANG, 2018; ZHANG; ZHU; TANG, 2009).

A capacidade da química medicinal de auxiliar e otimizar este processo inicial de desenvolvimento de novos compostos, tem sido muito importante em patologias como as doenças tropicais negligenciadas (DTNs) as quais têm sido negligenciadas há muito tempo na agenda global de saúde. As DTNs que correspondem a um grupo de doenças que ocorrem em condições climáticas tropicais e subtropicais e estão diretamente ligadas à pobreza onde o acesso a saneamento é inadequado e assistência médica é limitada, e as pessoas vivem próximas a animais e vetores de doenças infecciosas, principalmente em áreas remotas e rurais. Entre as doenças consideradas como DTNs podemos citar a Doença de Chagas, Leishmaniose, Malária, entre outras, sendo predominante na África, Ásia e Américas (WHO 2020; ENGELS; ZHOU, 2020)

## 2.2 DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSES

Segundo os dados da OMS estima-se que aproximadamente de 6 milhões a 7 milhões de pessoas estejam com a infecção causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, esta denominada como Doença de Chagas. Estima-se que cerca de 75 milhões de pessoas estão sob risco da doença, devido ao alto número de pessoas não diagnosticadas ou não tratadas. É uma doença endêmica em 21 países continentais da América Latina entre eles Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai entre outros (WHO, 2022).

No Brasil estima-se em mais de um milhão o número de pessoas que ainda convivem com a infecção por *T. cruzi*, e, é uma das principais causas de óbitos causados por patologias infecto-parasitárias (BRASIL, 2019). Entre 2003 e 2018, foram notificados 4.556 casos de chagas, com algumas mudanças nas regiões afetadas a partir de 2007, com maior concentração de notificação de casos e incidência na região Norte. Ocorreram alterações no perfil epidemiológico da doença, principalmente pelo aumento nas ações de controle vetorial, além



das transformações ambientais e de ordem socioeconômica, saindo do meio rural e instalando mais em meios urbanos (BRASIL, 2019; SANTOS *et al.*, 2020).

A denominação dada para doença de Chagas deve-se pela descoberta do médico e pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, que também descreveu detalhes da doença em 1909 (WHO, 2020). O ciclo de vida do *T. cruzi* alterna-se entre o inseto vetor conhecido como Barbeiro e o mamífero hospedeiro. A infecção humana resulta das picadas de vetores reduvídeos (família *Reduviidae*) durante o repasto sanguíneo desses hematófagos infectados e com a liberação de tripomastigotas metacíclicos em excreções como as fezes e urina do triatomíneo, próximo de uma área da pele lesada ou em mucosas íntegras do hospedeiro mamífero. Existem outras formas de transmissão entre elas estão: a ingestão de alimentos contaminados com excreções do barbeiro, transfusão de sangue, transplante de órgãos e verticalmente durante o parto da mãe para o recém-nascido (PEREIRA *et al.*, 2021; TYLER; ENGMAN, 2001).

O parasita possui dois tipos de hospedeiro, em que se completa seu ciclo de vida (também chamado de heteroxênico), um dos ciclos é no vetor triatomíneo, ele se infecta quando realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero infectado, os parasitos no epitélio intestinal do vetor passam da forma tripomastigota para epimastigota proliferativa, multiplicam-se e se diferenciam novamente na forma tripomastigota metacíclico, e via repasto sanguíneo infectar novamente outro humano, fechando o ciclo. No hospedeiro mamífero, os tripomastigotas metacíclicos invadem células próximas ao local onde ocorreu a inoculação, onde se diferenciam amastigotas intracelulares. Os amastigotas se multiplicam por divisão binária e se diferenciam posteriormente em tripomastigotas, e então são liberados na circulação e estas formas evolutivas infectam células de uma variedade de tecidos e se transformam em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção (CDC, 2019; WHO, 2020).

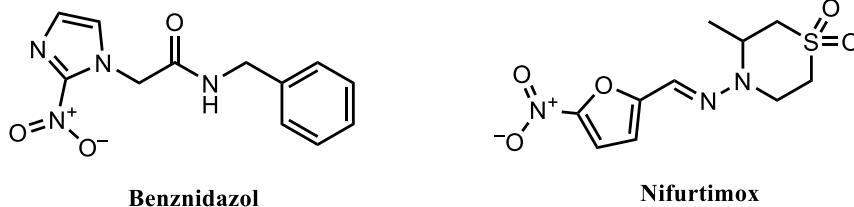
A doença se apresenta em duas fases, uma aguda e outra crônica. A fase aguda em geral é assintomática, podendo apresentar alguns sintomas inespecíficos e raramente é mais grave apresentando sinais e sintomas cardíacos ou neurológicos. Lesões nodulares chamados de chagomas, podem se desenvolver em torno do local de alimentação do vetor. A maioria dos casos agudos se resolve em um período de algumas semanas ou meses nesses casos mais prolongados apresentando uma forma crônica subclínica da doença também chamada de forma indeterminada (CDC, 2019; WHO, 2020).

A forma crônica sintomática (forma determinada) pode demorar anos ou mesmo décadas após a infecção inicial podendo incluir envolvimento cardíaco ou gastrointestinal, que

ocasionalmente ocorrem quase simultaneamente. As muitas complicações da doença de Chagas crônica podem ser fatais. A invasão da forma amastigota na musculatura de órgãos gastrointestinais e cardiovascular pode causar em cerca de 30% a 40% das pessoas megaesôfago, megacólon e cardiomiopatia dilatada (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019; CDC, 2019).

Os dois principais tratamentos para eliminação do parasita causador da doença de Chagas são o benznidazol e também o nifurtimox (Figura 2), eles apresentam praticamente 100% de eficácia na cura da doença se ocorrer a administração logo após a infecção no início da fase aguda, incluindo nos casos de transmissão congênita. O tratamento também é indicado para aqueles nos quais a infecção foi reativada como por exemplo, em portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), em transplantados, entre outras imunodeficiências. e para pacientes no início da fase crônica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; WHO, 2020).

Figura 2 - Estrutura química dos fármacos atualmente utilizados para controle parasitário benznidazol e nifurtimox.



Fonte: AUTOR (2021)

Porém há uma diminuição da eficácia de ambos os fármacos quando a pessoa está mais tempo com processo infeccioso (processo crônico), mas adultos infectados, principalmente os assintomáticos, devem receber o tratamento antiparasitário para poder prevenir ou reduzir a progressão da doença, porém deve-se avaliar muito bem o uso como medida preventiva já que ocorre um aumento das reações adversas como intolerância gástrica, erupções cutâneas ou problemas neuromusculares, principalmente em pessoas com idade avançada com exposição progressiva ao fármaco, o que pode atrapalhar o tratamento farmacológico (ALTCHEH *et al.*, 2014; ECHEVERRIA; MORILLO, 2019; WHO, 2020).

Apesar de ambos os medicamentos terem alto grau de eficácia, no Brasil o Benznidazol é o fármaco de primeira escolha, e em casos de resistência ou intolerância a medicação é utilizado como segunda opção o nifurtimox (DIAS *et al.*, 2016).

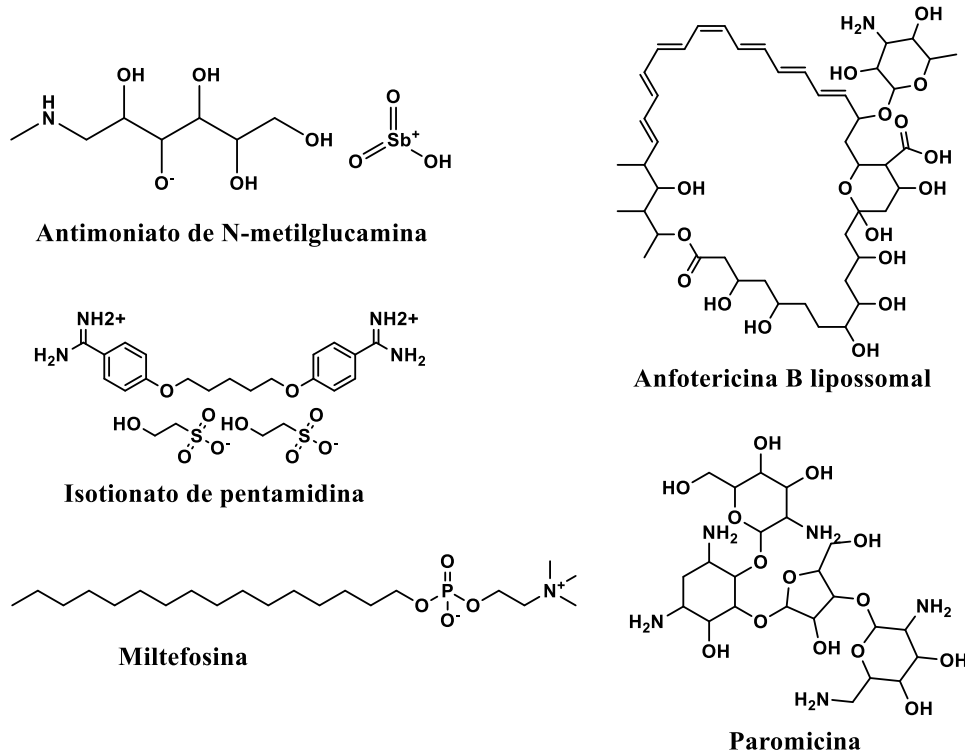
As leishmanioses são doenças parasitárias transmitidas por vetores de ao menos 20 espécies do gênero *Leishmania*, e são transmitidos entre hospedeiros mamíferos por mais de 90 espécies de flebotomíneos fêmeas. Os parasitas de *Leishmania* apresentam dois estágios morfológicos: promastigotas flagelados extracelulares no trato digestivo do vetor flebotomíneo e formas amastigotas dentro das células do sistema fagocítico mononuclear (macrófagos) do hospedeiro (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Existem três formas de manifestações clínicas da doença: cutânea, mucocutânea e leishmaniose visceral, afetam coletivamente 12 milhões de pessoas em 98 países e 1 bilhão estão em risco de infecção, além disso, são relatados quase 1 milhão de novos casos e 30.000 mortes atribuídas a leishmanioses a cada ano (BAZIN *et al.*, 2021; WHO, 2020).

A leishmaniose visceral (também conhecido como kala-azar ou calazar) é fatal em mais de 95% dos casos se não ocorrer tratamento adequado, o quadro clínico é caracterizado por episódios irregulares de febre, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e anemia. A maioria dos casos ocorre no Brasil, África Oriental e na Índia, com uma estimativa que 50.000 a 90.000 novos casos de leishmania visceral ocorram em todo o mundo anualmente, em 2018, mais de 95% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 10 países entre eles Brasil, China, Etiópia, Índia, entre outros da Ásia, da África e Oriente médio (WHO, 2020).

A comunidade científica tenta desenvolver mecanismos para tratamento e prevenção da leishmaniose, testes com vacinas já foram realizadas, mas ainda não há uma com amplo uso clínico para prevenção da leishmaniose humana e outras abordagens como controle vetorial permanecem extremamente difíceis nos principais países atingidos pela doença (WHO, 2020).

Além destas dificuldades, o tratamento farmacológico é de difícil adesão, assim como ocorre com a doença de Chagas há um número limitado de medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose, incluindo antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina, paromomicina e miltefosina (Figura 3), sendo este último o único fármaco ativo administrado por via oral e é altamente eficaz com taxas de cura de até 98%, e os demais fármacos normalmente são administradas por via parenteral. Porém, a maioria desses fármacos causam uma série de eventos adversos e altas taxas de toxicidade, além de serem de alto custo e o uso a longo prazo pode levar a resistência parasitária (BAZIN *et al.*, 2021, WHO 2020).

Figura 3 - Estrutura química dos principais fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses.



Fonte: AUTOR (2021)

Vários aspectos estão envolvidos no sucesso do tratamento farmacológico como fatores do hospedeiro (genética, imunidade e apresentação clínica da doença), recursos de tratamento, dosagem, duração e conclusão da terapia, além das características do parasita, como sensibilidade da espécie e resistência ao medicamento. No Brasil, a recomendação pelo ministério da saúde para o tratamento da leishmaniose visceral são os seguintes medicamentos: antimoniato de N-metilglucamina, desoxicolato de anfotericina B e anfotericina B lipossomal (ASSIS *et al.*, 2017).

Esforços foram empregados na última década por alguns setores governamentais e organizações de origem não governamentais e sem fins lucrativos para o desenvolvimento de novos compostos com avanços para os estágios pré-clínicos e clínicos no processo de descoberta de novos compostos, especialmente contra a leishmaniose visceral, mas o conjunto de novos medicamentos ainda é extremamente limitado, portanto, ainda há necessidade na identificação de novos compostos para o tratamento da doença de Chagas e leishmanioses, que sejam protótipos para o desenvolvimento de fármacos com maior potência e seletividade e que atuem com especificidade em vias essenciais e únicas dos parasitos assim diminuindo a

toxicidade e efeitos colaterais dos fármacos (ZIMMERMANN, 2018; BAZIN *et al.*, 2021; DE RYCKER, M. *et al.* 2018).

### 2.3 ALVOS MOLECULARES E ESTUDOS COMPARATIVOS

Na última década, vem em constante crescimento o interesse em pequenas moléculas com múltiplos alvos moleculares, especialmente no contexto da polifarmacologia, este conceito refere-se a cada vez mais evidências de que pode haver melhor eficácia dos medicamentos com o envolvimento de múltiplos alvos terapêuticos, porém esse processo ainda percorrerá um longo caminho, pois também inclui efeitos colaterais indesejados na farmacoterapia, devido a interações específicas de compostos com múltiplos alvos (BOLOGNESI; CAVALLI, 2016; STUMPFE; GILBERG; BAJORATH, 2018).

As proteínas intracelulares que possuem alta especialização são as enzimas, elas atuam com extrema eficiência catalítica, e são fundamentais para qualquer processo bioquímico. Algumas destas enzimas não requerem nenhum outro grupamento químico para realização de sua atividade, porém muitas delas dependem da presença de cofatores como íons inorgânicos ou pequenas moléculas como NADH e NADPH (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014; PATRICK, 2017).

O conhecimento do mecanismo de catálise da enzima é muito importante para o planejamento na procura de alvos para determinadas enzimas, já que muitos dos fármacos disponíveis exercem seu efeito biológico através de diversas interações com estas proteínas. A catalise realizada por uma enzima ocorre dentro de um bolsão da enzima, também chamado de sítio ativo que é revestido por resíduos de aminoácidos e a molécula que é ligada no sítio ativo é denominada de substrato que através de interações físico-químicas com estes resíduos provem a catálise, portanto os fármacos podem ser projetados para se ligarem neste local, impedindo a ligação do substrato, e assim, inibindo sua ação (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014; PATRICK, 2017).

Para que ocorra a interação efetiva do fármaco com o sítio ativo, é necessário certo grau de afinidade e especificidade com os resíduos de aminoácidos de determinados alvos moleculares, os quais serão determinados pelas interações intermoleculares como: ligações covalentes, interações eletrostáticas ou iônicas, interações de hidrogênio, van der Waals, dipolo-dipolo e hidrofóbicas (BARREIRO; FRAGA, 2015). Existem 20 aminoácidos comumente encontrados em humanos responsáveis pelas ligações peptídicas presentes nas

proteínas. Estas ligações são planares, sendo que a conformação adotada pela proteína depende dos resíduos de cada aminoácido e eles podem ser classificados quanto à natureza química de acidez ou basicidade e de polaridade (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014).

Através da descoberta genômica e da bioquímica parasitária, foi possível identificar estruturalmente novos alvos exclusivamente dos parasitas. Como exemplo, as enzimas do metabolismo dependentes de grupo tióis (tripanotiona redutase, tripanotiona sintetase e triparedoxina peroxidase) e cruzaina (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2017).

Estudos comparativos entre os parasitas *T.cruzi* e *Leishmania* spp. tem sido conduzidos com intuito de identificar um composto com amplo espectro parasitário e que atue em ambos os parasitos. Enzimas como a tripanotiona redutase (TR) está entre os principais alvos de novos fármacos, tanto em *Leishmania* spp. e outros tripanossomatídeos devido ao papel altamente relevante na manutenção da homeostase redox do parasita preenchendo requisitos relevantes para ser um alvo interessante, pois é essencial para a sobrevivência do parasita (SCHMIDT *et al.*, 2002; BUDDE *et al.*, 2003; BERNARDES; ZANI; CARVALHO, 2013).

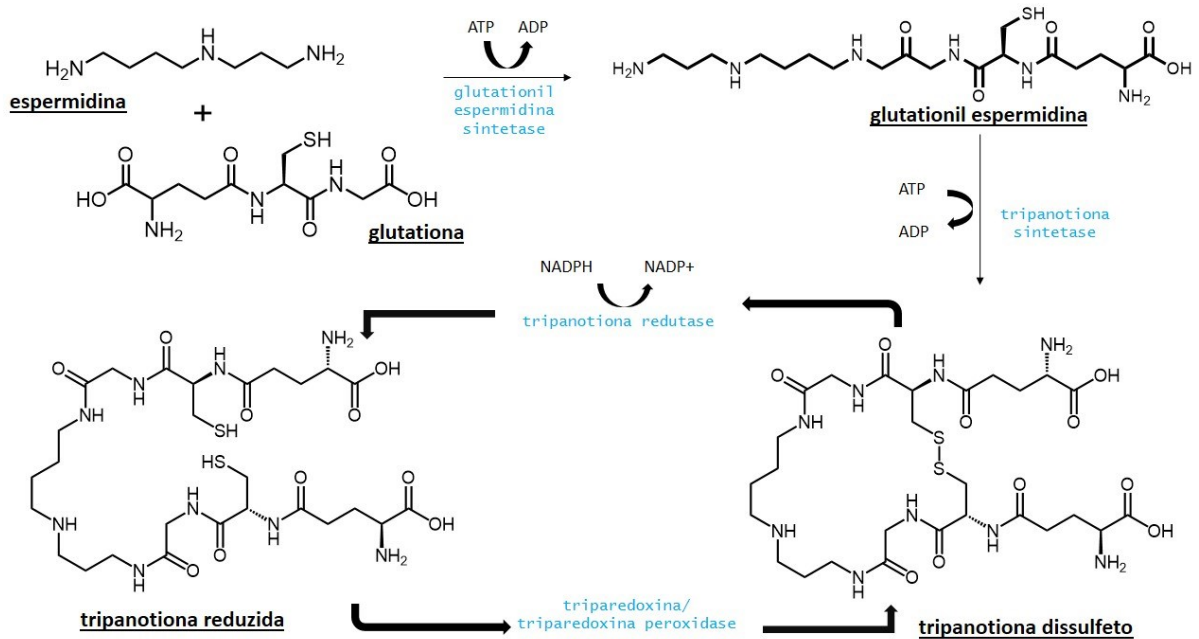
### 2.3.1 Tripanotiona redutase

Ao contrário dos mamíferos que possuem a homeostase redox baseado na glutatona, os parasitas tripanossomatídeos possuem tripanotiona N1, N8-bis (glutationil) espermidina conhecida também como tripanotiona reduzida como o principal agente desintoxicante contra o dano oxidativo. Este ditiol é sintetizado pela tripanotiona sintetase (e é reduzido a tripanotiona reduzida pela tripanotiona redutase) (Figura 4). A tripanotiona reduzida é então usado pelo conjunto de enzimas chamadas triparedoxina / triparedoxina peroxidase I (TXN/TXNPx) para neutralizar peróxido de hidrogênio produzido por macrófagos durante a infecção (COLOTTI *et al.*, 2019; COLOTTI *et al.*, 2013).

Os parasitas *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. compartilham muitas características celulares, entre elas a conservação de genes, elevada identidade de aminoácidos entre suas proteínas, presença de estruturas subcelulares, como glicossomos e cinetoplastídeos, e arquitetura de seu genoma; tais conservações podem tornar o desenvolvimento de fármacos específico da família, em vez de específico somente para a espécie, isto é, com base na inibição de um alvo comum. O TR foi validado como alvo tanto em *Leishmania* spp. quanto em *Trypanosoma* spp., a alta homologia de sequência de TR's de diferentes organismos (80-100%)

o torna um alvo de grande valia para o desenvolvimento de um único fármaco de amplo espectro ativo contra todos os tripanossomatídeos (ILARI *et al.*, 2017; BATTISTA *et al.*, 2020).

Figura 4 - Esquema reacional do metabolismo da tripanotiona.



Fonte: Adaptado de Colotti *et al.* 2019

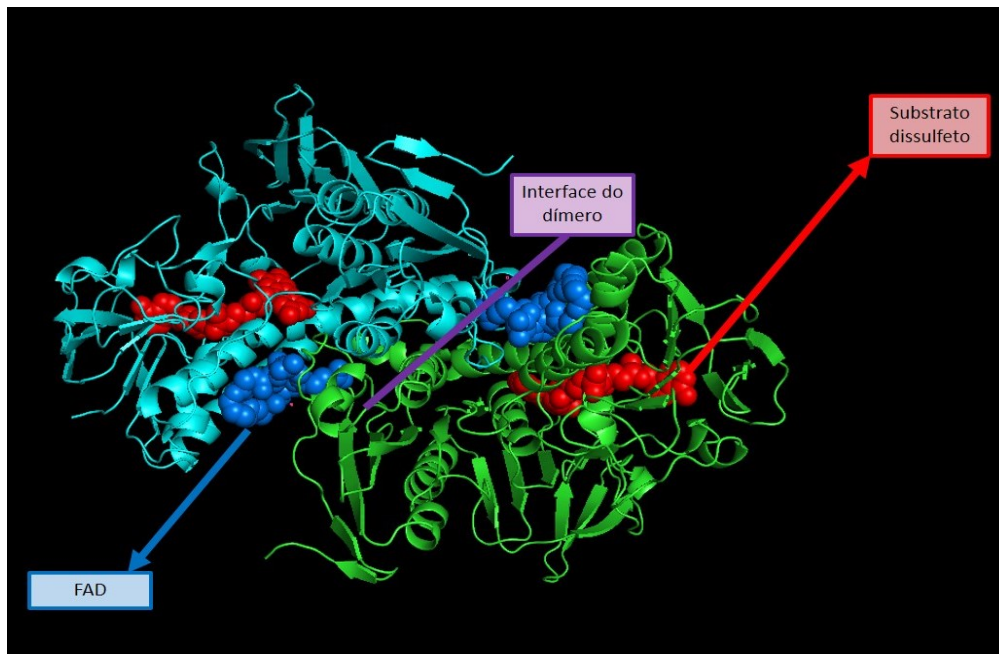
Os tripanossomatídeos possuem muitas vias metabólicas e funções celulares únicas, divergentes de outros eucariotos, e estas são alvos potenciais para a descoberta de novos. Por exemplo, essa família não possui a enzima glutatona redutase (GR), enzima que possui como função a manutenção a homeostase redox antioxidante nos humanos. Embora, TR e GR possuam cerca de 40% de identidade entre seus aminoácidos, elas apresentam local de ligação do substrato diferente (ILARI *et al.*, 2018; BAILEY *et al.*, 1993).

O substrato da TR difere da glutatona dissulfeto, substrato da glutatona redutase, em tamanho, sendo maior e pela presença de uma porção espermidina e grupos amônios catiônicos no lugar dos grupos carboxilatos aniônicos. Este fato confere em pH fisiológico uma carga +1 à tripanotiona dissulfeto, enquanto a glutatona tem carga -2, justificando a seletividade dos substratos. Estas diferenciações proporcionam maior possibilidade de identificar moléculas capazes de ter como alvo especificamente a TR (BAILEY *et al.*, 1993; HUNTER *et al.*, 1992; SULLIVAN *et al.*, 1991).

A TR é uma proteína homodimérica (Figura 5), onde cada monômero (A e B) é formado por três domínios de ligação: domínio FAD (aminoácidos 1-160 e 289-360), domínio

NADPH (aminoácidos 161-289) e de interface entre os monômeros (aminoácidos 361-488) (ILARI *et al.*, 2017). A tripanotiona redutase possui um sítio de ligação com 20 Å de comprimento, 15 Å de profundidade e 15 Å de largura. Os aminoácidos que compõe esse sítio de ligação estão correlacionados com o domínio de ligação FAD (15A–22A, 53A–62A, 103A–114A e 335A-343A) e domínio de interface entre as duas subunidades 396B-399B e 461B-470B (BOND *et al.*, 1999).

Figura 5 - Dímero da enzima tripanotiona redutase de *T. cruzi* com as cadeias A e B (adaptado de BOND *et al.*, 1999).



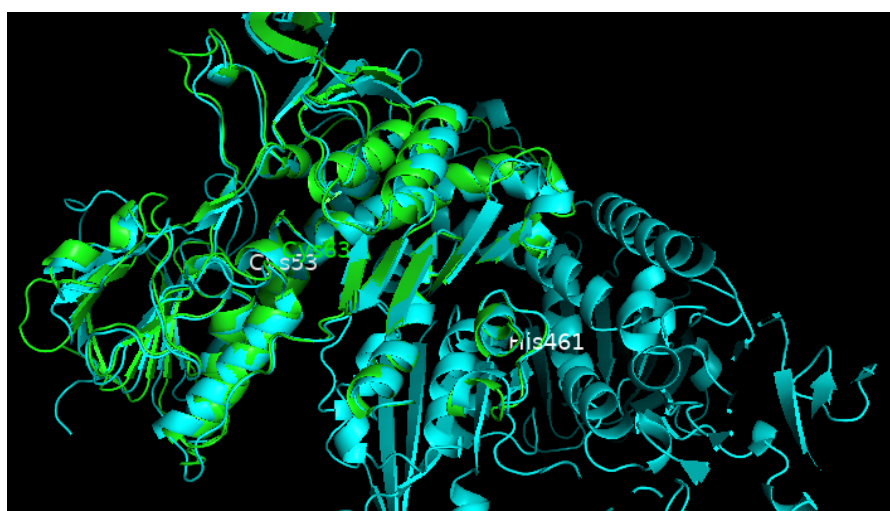
FAD esfera azul. Substrato dissulfeto esfera vermelha. A interface do dímero está indicado por uma reta púrpura. Dímero A verde e dímero B ciano. Fonte: AUTOR (2021), ilustrações obtidas através do PyMOLWin.

A tripanotiona dissulfeto, interage com 25 aminoácidos do sítio ativo da TR, em grande parte por meio de interações hidrofóbicas. Há também presença ligações de hidrogênios entre a ligação peptídica nas porções glicina e espermidina do substrato e os aminoácidos Glu19A e Tyr111A da tripanotiona. A GR possui um total de 19 aminoácidos envolvidos na interação com o substrato (Figura 6), desses, 14 estão presentes na TR, incluindo as do sítio catalítico da GR (aminoácidos Cys53A, Cys58A e o resíduo básico His461B). Já os aminoácidos não conservados entre as duas enzimas são Glu19A (Ala34A em GR), Trp22A



(Arg37A), Ser110A (Ile113A), Met114A (Asn117A), e Ala344A (Arg347A) (BOND *et al.*, 1999; KARPLUS; SCHULZ, 1989, ZIMMERMANN, 2018; SULLIVAN *et al.*, 1991).

Figura 6 - Comparação entre os dois sítios catalíticos: em verde, glutatona redutase (1XAN) e em ciano, tripanotiona redutase (1BZL).

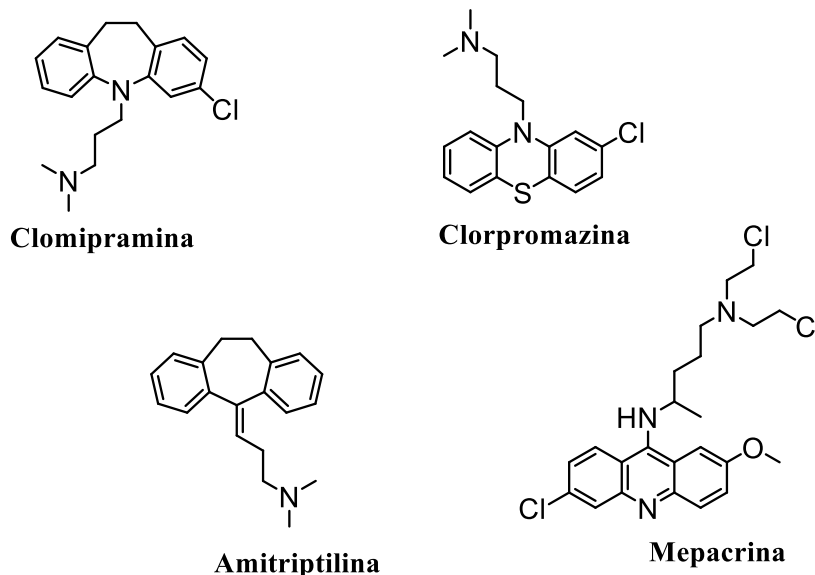


Fonte: AUTOR (2021), ilustrações obtidas através do PyMOLWin.

Com o avanço nos estudos da enzima TR e a identificação da tripanotiona dissulfeto como seu substrato, inibidores miméticos aos substratos começaram a ser pensados e dentre os já identificados podemos citar os compostos bicíclicos, heterocíclicos, tricíclicos, peptídeos miméticos, poliaminas e diarilssulfetos e organometálicos que atuam de diversas maneiras na inibição enzimática de forma competitiva, irreversível ou subversivo levando a produção de radicais livres e consequentemente ao estresse oxidativo (BENSON *et al.*, 1992; ILARI *et al.*, 2017; CHAN *et al.*, 1998; MACCARI *et al.*, 2011; ZIMMERMANN, 2018).

A tripanotiona dissulfeto, substrato da TR, é uma molécula de elevado peso molecular, sendo este um fator de limitação, muitas vezes, para a descoberta de compostos líderes. A fim de identificar compostos que possuíssem um outro esqueleto estrutural e com atuação na enzima TR, Benson e colaboradores (1992) realizaram o primeiro estudo de modelagem molecular. A partir deste estudo, compostos antidepressivos tricíclicos foram identificados como sendo inibidores competitivos da enzima TR (Figura 7) como a clomipramina, clorpromazina, amitriptilina e mepacrina (BENSON *et al.*, 1992; JACOBY *et al.*, 1996; ZIMERMMAN, 2018).

Figura 7 - Antidepressivos tricíclicos identificados com ação na tripanotona redutase.



Fonte: AUTOR (2022)

## 2.4 ABORDAGENS COMPUTACIONAIS

Com o desenvolvimento de novas tecnologias, as abordagens e metodologias usadas durante o planejamento de fármacos alteraram-se com o decorrer dos anos. Com o aumento de estudos que utilizam produtos naturais como fontes de moléculas com atividade biológica e de triagens biológicas automatizadas em alta escala (*high-throughput screening*, HTS), o uso de abordagens computacionais já pode ser considerado como parte do desenvolvimento em vários estágios no processo de planejamento e descoberta de um novo composto *hit* (KALYAANAMOORTHY *et al.*, 2011, ZIMMERMANN, 2018; HOFFER *et al.*, 2018).

Determinado composto é considerado *hit* quando apresenta a atividade específica no alvo desejado no processo da triagem virtual de bancos de dados de compostos naturais, sintéticos ou bibliotecas combinatorias e tem sua atividade confirmada através de ensaios biológicos (HUGHES *et al.*, 2011; KATSUNO *et al.*, 2015). Durante as fases iniciais de planejamento de fármacos, são identificadas diversas moléculas que normalmente apresentam baixa potência e afinidade e que precisam de otimizações em relação a uma série de propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas (HOFFER *et al.*, 2018).

Os estudos de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR – do termo em inglês *quantitative structure-activity relationship*) ou de relação estrutura-propriedade (QSPR – do inglês *quantitative structure-property relationship*) tornam-se essenciais em projetos de desenvolvimento de novos fármacos. (FERREIRA, 2002; YANG *et al.*, 2020).

Na área de química medicinal teórica, a predição da atividade biológica de novos compostos usando relações matemáticas baseadas em propriedades estruturais, físico-químicas e conformacionais de potenciais compostos previamente testados, é de extrema relevância nos estudos científicos. Os estudos de REA são úteis para entender e explicar o mecanismo de ação de fármacos em nível molecular e permite o projeto e o desenvolvimento de novos compostos com propriedades biológicas desejáveis além de permitir a síntese (MARTINS; FERREIRA, 2013; FERREIRA, 2002).

Com o desenvolvimento de diversas tecnologias e softwares que auxiliam no processo de descoberta de novos fármacos, várias metodologias de triagem estão sendo empregadas para melhor desenvolvimento destes novos compostos. Entre essas metodologias destacam-se as empregadas no design negativo ou também conhecido como *negative design* é um grupo de métodos de triagem virtual que possui como proposta eliminar compostos com propriedades “indesejadas” nos estágios iniciais do desenvolvimento de novos compostos biologicamente ativos (RAREY, 2009; YANG *et al.*, 2020).

Essas metodologias empregadas preveem três características importantes de propriedades farmacológicas: semelhança entre fármacos mais conhecido como *drug-likeness* em que se explora a correlação entre diversas moléculas, como propriedades estruturais e físico-químicas, e comportamentos moleculares *in vivo*, especialmente para efeitos farmacocinéticos; a presença compostos “promíscuos” (do inglês *frequent hitters*) que possuem a capacidade de ligar-se a diferentes alvos (compostos que se ligam em diversos alvos moleculares podem não ser o desejado para os fármacos durante o desenvolvimento de novos compostos); e por fim, a análise do metabolismo e toxicidade que visa analisar o potencial toxicológico desses *hits* (YANG *et al.*, 2020; WALTERS; A MURCKO, 2002, MCGOVERN *et al.*, 2002).

Com a finalidade de cada vez mais proporcionar o aumento de eficácia neste processo de desenvolvimento, o *negative design* propõe regras ou filtros baseados em propriedades físico-químicas e/ou baseadas em subestruturas geradas em processos de metabolização, estes filtros podem ser aplicados em diversos softwares que facilitam a análise desses dados. Tais métodos apresentam vantagens em sua simplicidade, o emprego de algumas ferramentas de baixo custo e boa interpretabilidade destes resultados, mas também possuem defeitos inerentes

ao método como inflexibilidade algumas vezes podendo dificultar na tomada de decisão quando deparam-se com os resultados obtidos, além da descontinuidade de algumas dessas ferramentas de análise (YANG *et al.*, 2020).

As abordagens computacionais, como a triagem virtual baseada nas estruturas de grandes bibliotecas digitais de compostos e a avaliação dos modos de ligação do ligante em seu alvo, tornaram-se um componente de extrema importância na descoberta de fármacos atualmente. Além de fornecer informações importantes sobre moléculas que potencialmente se ligam a um alvo específico, também auxiliam na interpretação de observações experimentais, como estudos de REA (LYU *et al.*, 2019). O aumento na adesão a técnica da triagem virtual origina-se de seu custo-benefício, seu potencial para identificar novos quimiotipos e percepções dos mecanismos das interações entre o ligante e seu alvo, e um dos principais métodos aplicados na descoberta de medicamentos com base na estrutura é o *docking molecular* (FISCHER *et al.*, 2021; LYU *et al.*, 2019).

#### **2.4.1 Interação ligante proteína e *docking molecular***

As interações entre complexos e proteínas ocorrem através de forças de interação bem documentadas atualmente na literatura bioquímica (IUPAC, 2019; BARREIRO; FRAGA, 2015; PATRICK, 2017; FOKOUE *et al.*, 2020). Comumente estas interações, são classificadas em dois grupos, as forças eletrostáticas propriamente ditas (como as de íon-dipolo ou íon-íon) e as forças de van der Waals, estas, que são forças residuais de atração ou repulsão entre átomos que não estão ligados por ligações covalentes ou por forças eletrostáticas entre íons ou entre íons e espécies neutras (FOKOUE *et al.*, 2020).

Já entre as interações eletrostáticas a mais destacada é a interação de hidrogênio, que são interações atrativas entre um átomo de hidrogênio (H) de uma molécula ou fragmento molecular X-H em que X seja mais eletronegativo que H, e quanto maior a eletronegatividade da molécula ou fragmento aqui representado como X mais forte é a interação. As propriedades de ligação de hidrogênio são muito importantes neste processo de *docking*, devido à sua forte influência na especificidade de ligação, sua onipresença e flexibilidade tornam as ligações de hidrogênio a interação física mais importante em sistemas de biomoléculas em solução aquosa, já que os átomos de hidrogênio compreendem aproximadamente metade dos átomos de macromoléculas biológicas (FOKOUE *et al.*, 2020; WILLIAMS *et al.*, 2008).

As demais interações encontradas são classificadas como interação cátion –  $\pi$  uma interação molecular não covalente que ocorre entre um sistema  $\pi$  rico em elétrons e um cátion adjacente a ele. Interações ânion- $\pi$  que são interações que ocorre entre sistemas aromáticos deficientes em elétrons e ânions, sendo assim como um tipo especial das interações iônicas ou interações íon-dipolo. Empilhamento  $\pi$  – amida, também uma interação não covalente que ocorre entre um sistema  $\pi$  rico em elétrons e uma amida. Outras que merecem importância na análise dos resultados são a interação alquila-arila que é considerada com um tipo de ligação de hidrogênio não clássica com anel aromático (CH- $\pi$ ), que ocorre quando uma ligação C-H de um grupo alquila é polarizada na presença de um anel com sistema  $\pi$  e as interações hidrofóbicas que ocorre devido a tendência dos hidrocarbonetos em formar agregados intermoleculares em meio aquoso (FOKOUE *et al.*, 2020; BARREIRO; FRAGA, 2015; NISHIO *et al.*, 2014).

No *docking molecular*, as configurações de ligações ligante-proteína são identificadas, e são gerados resultados que são chamados de poses de ligante, a geração desta interação do complexo molécula-proteína pode prever qual a melhor orientação espacial durante a interação do complexo e também qual seria sua conformação mais estável da molécula analisada dentro da proteína de alvo de interesse. Para quantificar esse processo utilizam-se funções de pontuação que são cálculos matemáticos gerados para estabelecer esse tipo de predição (WÓJCIKOWSKI *et al.*, 2019; FISCHER *et al.*, 2021).

Porém assim como outros métodos computacionais encontram-se algumas limitações neste método, por exemplo, a quantificação das interações ligante-proteína é baseada em uma função de pontuação simplista, e, essa modelagem molecular simplificada é uma limitação substancial da metodologia, que se manifesta por imprecisões na classificação de pose e um resultado desfavorável na previsão de energias livres de ligação absoluta ou relativa (CAPPEL *et al.*, 2020; FISCHER *et al.*, 2021).

Além disso, a amostragem correta de poses de ligante pode ser limitada por efeitos de ajustes induzidos, ou por estados conformacionais distintos da proteína, que na maioria das vezes é tratada como um “corpo rígido”, levando a imprecisões além daquelas impostas pelas funções de pontuação. Por isso é importante desenvolver um método de inspeção visual nesta metodologia, diminuindo assim possíveis erros computacionais e otimizando ainda mais o processo de escolha das moléculas (CAPPEL *et al.*, 2020; RIPPHAUSEN *et al.*, 2012; FISCHER *et al.*, 2021).

O processo de minimização de energia molecular, etapa importante nos estudos de *docking*, é feita com cálculos de mecânica molecular. A metodologia da mecânica molecular está baseada na aproximação de Born-Oppenheimer, que é caracterizada por considerar os movimentos nucleares e por tratar os elétrons indiretamente, diferindo dos métodos quânticos de orbitais moleculares, caracterizados por estudar a estrutura eletrônica, para uma posição nuclear fixa. Na mecânica molecular supõe-se que a densidade eletrônica pode ajustar-se instantaneamente a qualquer alteração na configuração geométrica dos núcleos, assumindo que os núcleos possuem movimento livre e que todas as interações nucleares são de características aditivas. No modelo de mecânica molecular as moléculas são consideradas como uma coleção de átomos ligados entre si por forças elásticas ou harmônicas e a descrição destas forças são feitas pelas funções de energia potencial das contribuições estruturais, comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros e interações em que não há ligações (COELHO *et al.*, 1999; ALLINGER *et al.*, 1975).

Estes softwares levam em consideração que durante a construção da estrutura 3D da molécula analisada pode ocorrer alterações no comprimento das ligações, ângulos das ligações ou ângulos de torção e precisam ser submetidas a um processo chamado de minimização de energia. Neste processo, a partir da molécula em sua conformação inicial, são feitas variações no comprimento e ângulo das ligações e de torção até alcançar uma conformação energeticamente favorável, o que permite melhor visualização das interações com o alvo estudado (JONES *et al.*, 1997; PATRICK, 2017).

Para esse processo de minimização de energia utilizam-se métodos semi-empíricos como AM1, PM3 e PM7 que empregam parâmetros determinados com base na experiência e observação estrutural, esses métodos normalmente são rápidos e precisos, e possuem parâmetros ajustáveis para reproduzir propriedades químicas importantes. A AM1 que utiliza funções Gaussianas para computar a energia total das moléculas e sua geometria ideal (FORESMAN; FRISCH, 1996). A PM3 baseado no método *modified neglect of diatomic overlap* – MNDO, primeiro método utilizado para reproduzir propriedades químicas importantes através de cálculos semi-empíricos (CRAMER, 2002). E a PM7 um dos métodos mais atuais e utilizados em softwares de *docking* foi projetado para melhorar os anteriores e reproduzir tanto as energias de interação intermoleculares quanto os calores de formação das reações químicas (STEWART, 2012).

Para realização do trabalho de *docking* e previsão dos modos de ligação e afinidades de compostos na interação com um sítio de ligação na proteína, utilizam-se diferentes softwares

com diversos algoritmos disponíveis para realização do *docking* proteína-ligante entre eles encontram-se o DOCK, FlexX, PRO\_LEADS, e GOLD que são exemplos de softwares para essa finalidade. A maioria das abordagens considera a proteína (principalmente) rígida e permite que o ligante seja flexível (JONES *et al.*, 1997; VERDONK, 2003).

Um dos principais softwares o GOLD utiliza como base do algoritmo para cálculos funções de pontuação ou também chamadas de score, entre elas a GOLDScore uma função de mecânica molecular que utiliza quatro termos:

$$\text{GOLD Fitness} = S_{hb\_ext} + S_{vdw\_ext} + S_{hb\_int} + S_{vdw\_int}$$

Sendo que  $S_{hb\_ext}$  é a pontuação fornecida referente a ligação de hidrogênio do ligante-proteína e  $S_{vdw\_ext}$  é a pontuação das interações de van der Waals.  $S_{hb\_int}$  é a contribuição para um cálculo chamado Fitness devido às ligações de hidrogênio intramoleculares no ligante ancorado e o  $S_{vdw\_int}$  é a contribuição devido à tensão intramolecular no ligante (VERDONK, 2003; JONES *et al.*, 1997).

Os principais átomos citados na literatura como principais doadores de ligações de hidrogênio são os grupos N-H, O-H e F-H. A energia associada a uma ligação de hidrogênio varia de 2 a 10 kcal mol<sup>-1</sup> e as distâncias entre o átomo H do doador (A) e o átomo acceptor (B) da ligação H ficam tipicamente entre 1,7 e 2,4 Å (FOKOUE *et al.*, 2020; MARTIN *et al.*, 1999). As interações de Van der Waals encontram-se principalmente em regiões hidrofóbicas das moléculas e são mais fracas energeticamente que interações de hidrogênio (LONDON *et al.*, 1937; FOKOUE *et al.*, 2020).

As pontuações fornecidas pelo GOLD GoldScore, ChemScore, ASP (Astex Statistical Potential) e ChemPLP são consideradas adimensionais, no entanto, em cada uma destas pontuações são fornecidas escalas em que pode se inferir quão boa é a pose; quanto maior a pontuação, melhor será o resultado do *docking*. A função GoldScore já mencionada anteriormente é função de pontuação original. A função de ChemScore leva em conta a área de contato hidrofóbico-hidrofóbico, ligação de hidrogênio, flexibilidade do ligante e interação do ligante com metal (JONES *et al.*, 1997; CCDC, 2020).

A função de ASP é um potencial de distância átomo-átomo derivado de uma base de dados de complexos proteínas-ligandos e pode ser comparado com outros potenciais de pontuação baseados em conhecimento e incorpora alguns parâmetros do ChemScore. O ChemPLP usa principalmente as interações de hidrogênio, alguns parâmetros de ChemScore e

múltiplos potenciais lineares para modelar van der Waals e termos repulsivos. É rápido de calcular (um pouco mais rápido que o ChemScore e até quatro vezes mais rápido que o GoldScore) e testes de validação recentes mostraram que ele é geralmente mais eficaz do que as outras funções de pontuação para previsão de pose e triagem virtual. Essa função de pontuação é o padrão para GOLD versão 5.1 e posterior (JONES *et al.*, 1997; CCDC, 2020).

#### 2.4.2 Farmacocinética baseada em fisiologia (PBPK)

Com o desenvolvimento e avanço tecnológico há um aumento significativo no número de aplicações desenvolvidas e publicadas sobre temas que abordam a predição de farmacocinética clínica (PK, do inglês *clinical pharmacokinetics*), impulsionada em grande parte pela exigência de empresas farmacêuticas integrarem dados gerados em estudos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (ADME) *in vitro* e parâmetros de PK *in vivo* em ensaios pré-clínicos durante a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (THOMAS, 2008; FERREIRA *et al.*, 2021).

São elevados os benefícios potenciais da previsão farmacocinética na descoberta de medicamentos. Dentre estes benefícios podemos citar: a identificação de compostos que possuam maior probabilidade de ter farmacocinética *in vivo* aceitável, levando em consideração a eficácia e os potenciais efeitos colaterais indesejados; durante o desenvolvimento com o planejamento dos ensaios clínicos adequados economizando tempo e custo; e por fim no pós-lançamento com a previsão da farmacocinética em vários cenários clinicamente relevantes para eficácia do medicamento, análise nas diferentes populações-alvo, regimes de dosagem, interações medicamentosas, etc. (SAGER *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2021).

O intuito do estudo da farmacocinética baseada em fisiologia (PBPK, do inglês *Physiologically based pharmacokinetic*) é permitir a predição confiável da farmacocinética em populações, sejam de humanos ou animais em estudos pré-clínicos. Entre os dados que permitem essas predições encontram-se: propriedades físico-químicas, dados de ensaios de triagem de ADME *in vitro* e dados de PK *in vivo* e esses métodos matemáticos têm sido usados para prever a farmacocinética (THOMAS, 2008; SAGER *et al.*, 2015).

Vários métodos matemáticos têm sido descritos para a predição da farmacocinética. Três que são comumente usados são: a alometria que relaciona parâmetros como depuração e volume de distribuição entre os organismos (SIMEONI *et al.*, 2004); modelagem QSPR já



mencionada anteriormente que tenta prever várias propriedades de um composto por meio de descritores quantitativos calculados a partir da estrutura do composto; e a modelagem de PK que envolve o desenvolvimento de modelos de simulação matemática projetados para simular o destino temporal de um ou mais compostos administrados a um organismo, baseados em variações de um modelo conceitual dos órgãos importantes do corpo, de tecidos distribuidores (como adiposo e muscular) e os fluxos sanguíneos entre eles que são responsáveis pela distribuição de diversos xenobióticos (THOMAS, 2008; SAGER *et al.*, 2015).

Os números relativos de dados de ADME *in vitro* e PK *in vivo* gerados variam entre instituições, empresa, softwares e, de fato, por projetos em geral. No entanto, a tendência é que as fases iniciais de descoberta de medicamentos sejam orientados por estudos de ADME e físico-químicos *in silico*, sendo estes complementados por dados obtidos *in vivo*, através de dados farmacocinéticos obtidos tanto em animais quanto em humanos durante o desenvolvimento pré-clínico ou pelos ensaios clínicos de Fase I e II (THOMAS, 2008; SAGER *et al.*, 2015).

Alguns parâmetros possuem relevância significativa na triagem/predição ADME *in silico* entre elas: nível de ligação de proteínas plasmáticas, depuração microsomal de hepatócitos, lipofilicidade e pKa. Já na década de 2000 essas metodologias já foram descritas como sendo apropriadas para o rastreamento de um grande número de compostos na identificação e otimização de composto líder, classificando-os de acordo com os critérios farmacocinéticos desejados, e selecionando esses compostos para progressão dos estudos (BRIGHTMAN *et al.*, 2005; THOMAS, 2008).

### **2.4.3 Análises *in silico* de propriedades farmacocinéticas, metabolismo e toxicologia.**

Entre os pontos considerados essenciais no desenvolvimento de novos fármacos um dos mais relevantes é a biodisponibilidade oral. Cada vez mais torna-se importante conhecer e analisar as propriedades moleculares que possam vir a limitar tal propriedade no fármaco. Com base em um grande banco de dados de fármacos conhecidos, a “Regra dos 5” (RO5) de Lipinski e colaboradores, as informações disponibilizadas através desses dados representa uma ferramenta rápida de análise e determina valores limites para quatro descritores: 1. peso molecular ( $\leq 500$ ); 2. cLogP ( $\leq 5$ ); 3. doadores de ligações de hidrogênio  $\leq 5$ ; 4. soma de ligações O-H e N-H ; 5. aceptores de ligações de hidrogênio  $\leq 10$ : soma de átomos de N e O) (LIPINSKI, 2000).

De forma complementar, Veber e colaboradores observaram que uma maior biodisponibilidade oral foi descrita para compostos que apresentavam número de ligações rotativas menores que dez e menores áreas de superfície polar ( $\leq 140 \text{ \AA}^2$ ) (VEBER *et al.*, 2002), e estas regras sugerem que compostos que violem um ou mais de descritos podem apresentar problemas de biodisponibilidade oral.

Diferentes ferramentas computacionais foram desenvolvidas com o tempo para análises dessas propriedades, e com seu desenvolvimento criou-se a oportunidade de promover cada vez mais a otimização química destas moléculas, empregando técnicas que visam promover uma relação estrutura-atividade destes compostos orientando na direção em suas otimizações (YANG *et al.*, 2020).

A maioria desses softwares desenvolvidos como ferramentas para análise e predição físico-química, utilizam regras baseadas em vários bancos de dados tradicionais com estruturas químicas, como o MACCS II Drug Data Report (MDDR, um conjunto de estruturas que foram rastreadas *in vitro*), Physicians' Desk Reference (PDR, um conjunto de estruturas de medicamentos já prescritos) e novas entidades de produtos químicos (NCE) que nada mais é que um conjunto de estruturas que passaram nas fases I e II de ensaios clínicos, além de banco de dados de diversas empresas da indústria farmacêutica (GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1998; CHARIFSON; WALTERS, 2002 YANG *et al.*, 2020).

Os modelos empregados nestas técnicas podem ser de natureza empírica, com a representação da distribuição de um fármaco em uma série de “compartimentos” interconectados com volumes de distribuição variados, essa depuração do fármaco pode ser representada usando a eliminação clássica de primeira ordem para a predição da depuração; ou pode ser mais complexa, por exemplo, a cinética de Michaelis Menten, ou mesmo os modelos farmacocinéticos de base fisiológica que representam órgãos “reais” conectados anatomicamente pelo fluxo sanguíneo, estes modelos matemáticos fornecem processos fisiológicos mais “reais” quando comparado a modelos obtidas nos modelos empíricos (JOHNSON; GOODY, 2011; UPTON; MOULD, 2014).

Em grande parte dos casos, esses processos biológicos são razoavelmente bem compreendidos e podem ser descritos matematicamente a partir de dados *in vivo* obtidos a partir de experimentos permitindo então a determinação de parâmetros farmacocinéticos relevantes, desde que tais dados estejam disponíveis para estudo (KUEPFER *et al.*, 2016; PETITO *et al.*, 2019).

No entanto estes testes *in vitro* geram um esforço significativo, com a aplicação de diversos ensaios e utilização de modelos animais, para o teste de apenas uma única molécula em muitos os casos, sendo assim, as ferramentas *in silico* são adequadas para análise prévia e permite a previsão virtual de alto rendimento das propriedades farmacocinéticas e ADME no início do processo de desenvolvimento de medicamentos (PETITO *et al.*, 2019). Propriedades como permeação da barreira hematoencefálica e absorção intestinal podem ser investigadas usando funções descritoras para compostos de interesse antes que estudos *in vitro* sejam decididos e aplicados (JAMEI *et al.*, 2009; PETITO *et al.*, 2019).

O metabolismo do fármaco é dividido em reações de Fase I (oxidação, hidrólise, redução) e Fase II (conjugação). Os citocromos P450 (CYP) são as principais enzimas da Fase I e que metabolizam a maioria dos fármacos, e a glucuronidação é a principal reação da Fase II, que é catalisada pela uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase (UGT) e serve como mecanismo de depuração para fármacos de diversas classes terapêuticas (RUDIJK *et al.*, 2015).

## 2.5 COMPOSTOS CARBAMATOS E ACETAMIDAS COM ATIVIDADE TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA.

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando na busca de novos compostos líderes ativos contra o agente etiológico da doença de chagas e leishmania fazendo uso de diferentes ferramentas de Modelagem Molecular. Em um trabalho anterior realizado por Zimmermann (2018), foi realizado estudos de triagem virtual, para identificação de um composto inibidor da enzima tripanotiona redutase. (BOND *et al.*, 1999; BERNARDES; ZANNI; CARVALHO, 2015; VUORINEN; SCHUSTER, 2015).

No estudo conduzido por Zimmermann (2018), foi empregado dentre as técnicas atualmente mais utilizadas dentro da química medicinal a de triagem virtual (ou *Virtual Screening*). O termo *virtual screening* (VS), foi criado no final da década de 1990, e descreve o uso de algoritmos e modelos computacionais para a identificação de novas moléculas (SCHNEIDER, 2010; SCHNEIDER *et al.*, 2000).

Esta técnica tornou-se uma alternativa para os grupos acadêmicos e indústrias farmacêuticas na descoberta de novos compostos, tornando-se uma maneira mais econômica de encontrar *hits* rastreando grandes bibliotecas de compostos virtuais *in silico*. E com a avanço cada vez maior do processamento de hardware dos computadores, aprimorou-se ainda mais o

fluxo de trabalho neste processo de desenvolvimento reduzindo de maneira significativa o tempo deste ciclo de descoberta de *hits* (WANG *et al.*, 2020; DRWAL; GRIFFITH, 2013).

Os métodos VS podem ser classificados em duas grandes categorias: VS baseado em ligante com bioatividade (conhecido como structure-based drug discovery ou a sigla SBDD) geralmente fármacos candidatos e ou com atividades promissoras; e VS baseado em alvo/estrutura (também conhecido como ligand-based drug design ou a sigla LBDD), que começa a partir dos ligantes conhecidos de um alvo e da estrutura cristalina tridimensional (3D) de um alvo respectivamente (RIPPHAUSEN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2020).

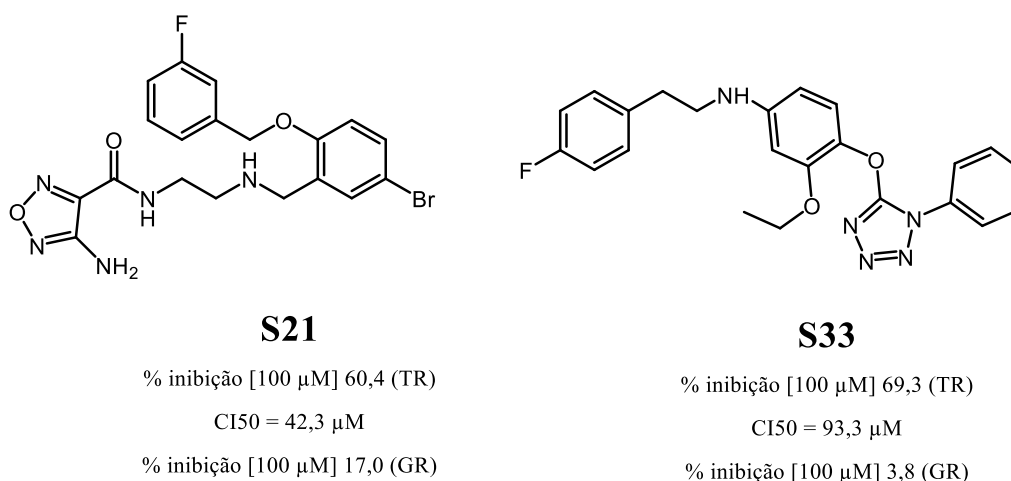
Para realização da triagem virtual no trabalho realizado por Zimmermann (2018), foram construídos diferentes modelos farmacofóricos, baseados em inibidores já descritos na literatura presentes em diferentes bibliotecas químicas, comerciais e *in house* (BRAGA; ANDRADE, 2013; VUORINEN; SCHUSTER, 2015). Os modelos gerados foram preferencialmente com base em estruturas cristalográficas já disponíveis para a enzima tripanotona, pois conferem maior confiabilidade na exposição da interação da enzima com os substratos e inibidores, e complementarmente para obtenção de uma maior cobertura química estrutural, foram elaborados modelos com base em inibidores da tripanotona redutase já descritos na literatura (ZIMMERMANN, 2018).

A geração do modelo farmacofórico ocorreu através do software LigandScout (LS) com base em duas estruturas cristalográficas, sendo que foi gerado um modelo automaticamente para cada estrutura cristalográfica selecionada. Para a construir os conjuntos de dados estruturais o estudo compilou o maior número de dados encontrados nas plataformas SCIFINDER e ChEMBL, selecionando preferencialmente, trabalhos publicados no período de 2010 a 2015, e que apresentassem descrição dos ensaios *in vitro* de inibição de tripanotona redutase, constando informações sobre o tipo de inibição (se é competitiva ou não) e dados sobre atividades biológicas mensuradas  $CI_{50}$  e/ou  $K_i$  (ZIMMERMANN, 2018).

Ao final da geração dos modelos farmacofóricos e da triagem virtual tanto em banco de dados comerciais quanto *in house*, foram identificados mais de 600 *hits* e, alguns desses foram selecionados e realizado um novo refinamento onde verificou-se: características físico-químicas, compostos que apresentaram na estrutura química probabilidade de interferirem nos ensaios biológicos e levarem a resultados falso-positivo, e o ancoramento molecular destes *hits* junto a enzima tripanotona redutase (BAELL; HOLLOWAY, 2010; BOND *et al.*, 1999; ZIMMERMANN, 2018).

Chegou-se a dois compostos mais ativos S21 e S33 (Figura 8), tiveram  $CI_{50}$  determinados:  $42,3 \mu\text{M}$  e  $93,3 \mu\text{M}$ , respectivamente, e verificou-se também a seletividade entre as duas enzimas, os compostos foram avaliando à capacidade de inibição enzimática, frente à enzima glutathione redutase (GR), e o composto S21 apresentou uma porcentagem de inibição em torno de 17 % e o compostos S33 em torno de 4%. Inferindo que são mais ativos frente a enzima parasitária do que para a enzima humana (a GR) nas concentrações avaliadas (ZIMMERMANN, 2018).

Figura 8 - Estrutura química dos compostos S21 e S33, estudo realizado por Zimmermann, 2018.



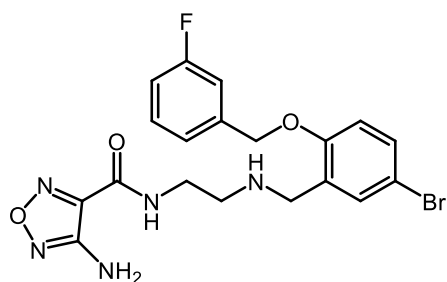
Fonte: ZIMMERMANN (2018)

Os dois compostos identificados como inibidores da enzima TR tiveram a atividade reportada pela primeira vez, instigando o planejamento e a elaboração de umas séries de compostos, tendo como protótipos os compostos S21 e S33. Foram sintetizados derivados objetivando o melhoramento da ação tripanocida e leishmanicida e diminuição da toxicidade, permitindo assim estabelecer estudos de REA destas classes de compostos (ZIMMERMANN, 2018). Para a otimização molecular destes compostos foram utilizadas diferentes estratégias de modificação molecular como variação de substituintes, substituição por bioisósteros, contração de cadeias, simplificação molecular, rigidez e flexibilidade da molécula (BARREIRO; FRAGA, 2015).

A partir dele, aplicando as estratégias de modificações moleculares clássicas dentro da química medicinal como simplificação de cadeia e variação de grupos funcionais (WERMUTH,

2015; PATRICK, 2017), foram planejados e sintetizados diferentes dos protótipos S21 e S33, e avaliados frente à inibição da enzima TR de *T. cruzi*, e também à enzima glutationa redutase, a fim de avaliar seletividade a enzima parasitária. Seis desses derivados, apresentaram melhor atividade leishmanicida que o protótipo S21 e um frente a atividade tripanocida e, de modo geral, menor citotoxicidade celular, dentre eles o composto sintético N-(2-((5-bromo-2-((3 fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)acetamida (Composto 1) se mostrou mais promissor (Figura 9).

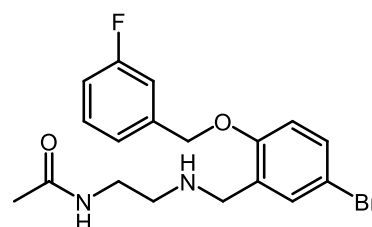
Figura 9 - Estrutura química do composto S21, selecionado em estudos de triagem virtual e seu análogo acetamida 1, obtido por simplificação molecular e variação de grupos funcionais.



**S21**

% inibição [100  $\mu$ M] 60,4 (TR)

CI50 = 42,3  $\mu$ M



**Composto 1**

% inibição [100  $\mu$ M] 60,4 (TR)

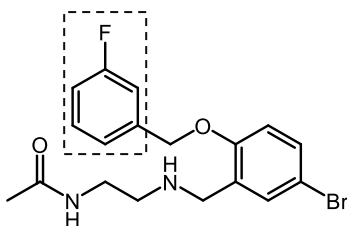
CI50 = 75,8  $\mu$ M

Fonte: ZIMMERMANN (2018)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Planejar análogos bioisostéricos do composto *N*-(2-((5-bromo-2-((3-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)acetamida **1** e avaliar as propriedades estruturais e físico-químicas utilizando ferramentas *in silico*.



**Composto 1**

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Calcular e avaliar as propriedades físico-químicas e parâmetros de biodisponibilidade dos compostos propostos utilizando metodologias *in silico*.
- Realizar estudo de metabolismo e toxicidade *in silico* dos análogos propostos
- Realizar estudos de *docking* molecular dos análogos propostos junto à enzima tripanotona redutase.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 ESTUDOS COMPUTACIONAIS

#### 4.1.1 Preparação da estrutura dos compostos

As estruturas 2D dos 7 compostos, foram construídas utilizando o software Chem Draw Ultra 16.0 (PERKIN ELMER, 2017). Os derivados bioisósteros do composto 1 foram desenhados com as substituições propostas no anel A. As estruturas 3D e otimização desses derivados foram obtidas pelo software Discovery Studio – DS (versão 20.1) (BIOVIA, 2021), através da utilização do código SMILES gerado no Chem Draw Ultra 16.0.

Foi realizado como complementação na preparação das moléculas a verificação do estado de protonação utilizando o software Marvin Scketch v. trial (<https://chemaxon.com/products/marvin-js>). Realizar a verificação do estado de protonação adequado de determinada molécula é importante para o *docking*, já que a força eletrostática é capaz de causar alterações conformacionais e de ionização tanto no receptor quanto no ligante. Para o presente estudo utilizou-se o pH intracelular (7,4), assumindo que no sítio ativo as moléculas estão em um ambiente químico de acordo com este pH (PETUKH; STEFL; ALEXOV, 2013).

A minimização de energia destes compostos foi feita no software Mercury (versão 2021.3.0) (CCDC, 2020). Durante esse cálculo de minimização, a energia do sistema é reduzida, alcançando, por fim, uma conformação mais estável para a molécula facilitando assim analisar as supostas interações (VERLI, 2014). O método selecionado para cálculo da minimização de energia foi Hamiltonian - QM - Quantum mechanics - PM7 (STEWART, 2012).

#### 4.1.2 *Docking molecular*

O estudo de docking molecular foi realizado em um processador Intel Core i7 com Windows 10, utilizando o programa GOLD (versão 2021.3.0) (JONES *et al.*, 1997). O complexo cristalográfico da enzima tripanotona redutase ligado com substrato tripanotona dissulfeto (1BZL) (BOND *et al.*, 1999) e com resolução de 2.4 Å, foi retirado do banco de dados PDB (“RCSB Protein Data Bank – RCSB PDB,” 2015).



As simulações foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: o sítio ativo foi definido em 9 Å em volta do ligante original na cadeia [A] da proteína e o número de algoritmos genéticos ou *genetic algorithm* (GA) runs estabelecidos foi de 400 e como função de pontuação foi aplicado ChemPLP. A reancoramento ou *re-docking* do substrato da enzima serviu para validar o método utilizado.

A análise das poses obtidas nos cálculos de *docking molecular* dos compostos bioisómeros propostos (Compostos 2-8) no sítio ativo da enzima tripanotona redutase foi realizada utilizando o programa DS v.21.1.0.20298, 2021 (BIOVIA, 2021). Para cada composto foram analisados os melhores scores obtidos e as principais interações moleculares foram identificadas por meio das medidas de distância entre os átomos do ligante e da enzima.

#### **4.1.3 Avaliação in silico das propriedades físico-químicas e de biodisponibilidade.**

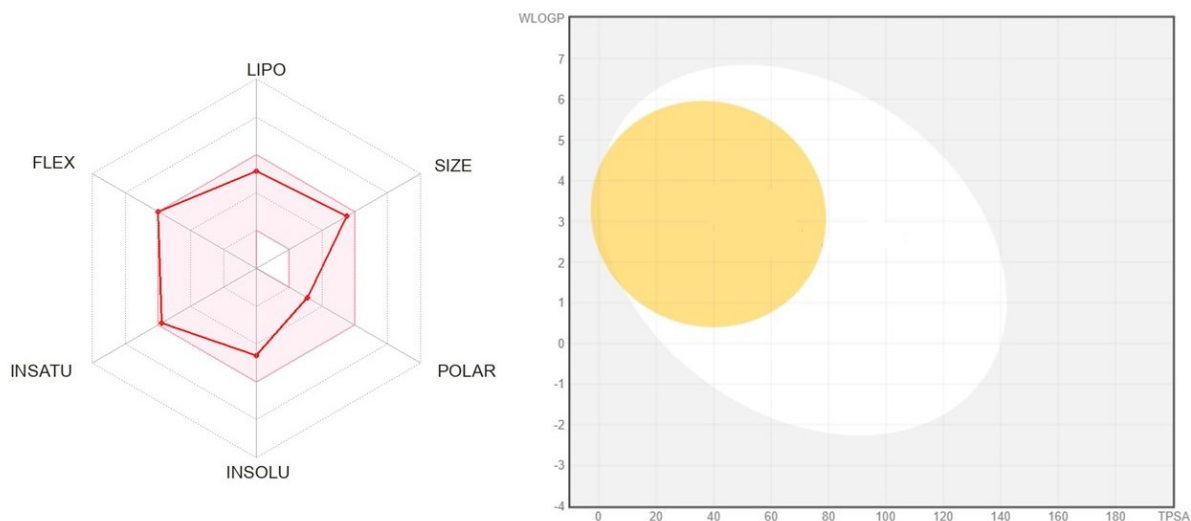
Nos estudos *in silico* foram previstas as propriedades físico-químicas dos análogos bioisómeros do composto 1, bem como o perfil de administração, distribuição e excreção (ADME) e toxicidade das moléculas analisadas no presente estudo.

Os parâmetros físico-químicos de área de superfície polar (PSA), coeficiente de partição octanol/água (LogP), massa molécula (g/mol), número de grupos aceptores e doadores de ligação hidrogênio (regra de Lipinski) e o número de ligações rotacionáveis foram avaliados através do software livre Osiris Property Explorer (OPEN MOLECULES, 2016). Os dados de solubilidade em água (LogS) e parâmetros de permeabilidade foram obtidos através de dois softwares gratuitos disponíveis online o SwissADME (SIB, 2022), e PreADMET (AVADA 2021). Essas plataformas cada vez mais estão presentes em estudos recentes acerca do tema, e mostrando-se bases seguras para os cálculos dessas propriedades (DAINA *et al.*, 2017; DOLABELA *et al.*, 2018; SILVA, 2020).

O programa SwissADME permite a representação de dados em formato de dois importantes gráficos: o Bioavailability Radar (apresenta um conjunto de propriedades favoráveis para biodisponibilidade) baseado em 6 propriedades: lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação, e o BOILED-Egg para que fornece dados referentes a absorção gastrointestinal passiva (HIA) (área correspondente a elipse de cor branca) e a permeabilidade da barreira hematoencefálica (círculo amarelo), e a presença de PAINS (pan-assay interference compounds) esta que visa identificar compostos reativos que tendem a atuar

como falsos positivos, além de avaliar a possibilidade dos compostos serem substratos da Pgp (glicoproteína P) (Figura 10) (DAINA; ZOETTE, 2016; PEREIRA, 2019).

Figura 10 - À esquerda o Bioavailability Radar- gráfico de perfil ideal de biodisponibilidade (área rosa) e à direita o gráfico BoiledEgg.



Fonte: SwissADME (2022)

Sabendo que a família das isoenzimas citocromo P450 (CYP450) bem como a glicoproteína P são de elevada importância não apenas para previsão da biodisponibilidade de determinado fármaco, mas também para previsão de eventos adversos e interações medicamentosas foi realizada, por meio do programa SwissADME e PreADMET, a previsão das moléculas estudadas serem substratos das 5 maiores isoformas de Citocromo P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2C9, CYP3A4) e da Pgp.

O programa PreADMET reside inteiramente em um servidor web, escrito principalmente em PHP, uma linguagem de script comumente usada para aplicativos da Web. O PreADMET consiste em quatro partes principais: cálculo de descritores moleculares constitucionais, topológicos, eletrostáticos, físico-químicos e geométricos (LIPINSKI, 2000; VEBER *et al.*, 2002). Predição da semelhança de fármacos (*frequent hitters*) que relaciona as estruturas químicas às possíveis atividades biológicas por exemplo em bancos de dados como o MDDR (TEAGUE *et al.*, 1999; OPREA *et al.*, 2000).

A determinação da permeabilidade dos fármacos através de membranas do trato gastrointestinal (TGI) é importante na previsão da biodisponibilidade, e diversos estudos *in vitro* possibilitam determinar a permeabilidade efetiva, estes métodos utilizam tecidos e segmentos de intestino de diferentes espécies animais. Há uma diferença morfológica e

funcional entre os modelos animais e os enterócitos humanos, e devido a essa diferença surgiram pesquisas e modelos matemáticos visando correlacionar os resultados de permeabilidade obtidos em animais com os originados em humanos, atualmente estão sendo estudadas metodologias empregando cultura de células como Caco-2, MDCK e MDCK-MDR1 (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; KULKARNI; HAN; HOPFINGER, 2002; IRVINE *et al.*, 1999;)

A plataforma PreADMET fornece a predição da absorção utilizando dados de compostos armazenados com estudos *in vitro* já realizados em modelos como o Caco-2 e o modelo de células MDCK (Madin-Darby canine renal) através da comparação entre as moléculas presentes nesses bancos de dados e a molécula alvo de estudo, através disso torna-se possível uma previsão da absorção oral de candidatos a novos fármacos. Além disso este módulo fornece modelos *in silico* da absorção intestinal humana e o modelo de permeabilidade da pele, sendo que ambos podem prever potenciais medicamentos para administração oral e transdérmicos (KULKARNI; HAN; HOPFINGER, 2002; IRVINE *et al.*, 1999).

#### **4.1.4 Avaliação *in silico* das propriedades de metabolismo dos compostos e toxicidade**

Para predição dos sítios de metabolização foram utilizadas ferramentas online SmartCyp e SOMP. A SmartCyp foi desenvolvida por pesquisadores da Universidade de Copenhague, Dinamarca (MONTEFIORI *et al.*, 2006; RYDBERG *et al.*, 2010). E a segunda ferramenta SOMP foi desenvolvida pelo Institute of Biomedical Chemistry of Rus. Acad. Med. Sci. (IBMC 2022; RUDIK *et al.*, 2015).

Com a produção de diversas plataformas *in silico* tornou-se também possível a predição de toxicidade, através da análise de dados obtidos através de uma rede neural de informações classificam diversas características de compostos com a capacidade de mutagenicidade utilizando resultados de estudos mutagênicos como por exemplo o Ames Salmonella que utiliza várias cepas da bactéria *Salmonella typhimurium* que carregam mutações em genes envolvidos na síntese de histidina (essencial para crescimento e multiplicação) e neste tipo de testes os compostos são avaliados quanto a capacidade de causar uma reversão no crescimento dessas bactérias em um meio livre de histidina (AMES *et al.*, 1972; LAGAROS; PAPADRAKAKIS, 2012).

Plataformas como o Pro-ToxII (PREISSNER, 2018) realiza a predição do perfil de toxicidade de diversas estruturas, utilizando um algoritmo relacionado a árvores de decisão para

classificar cada ligante em seis classes de risco toxicológico fazendo uso de árvores de tomada de decisão (BANERJEE *et al.*, 2018; MARQUES, 2021).

Outro mecanismo utilizado para a previsão de possíveis efeitos adversos foi a utilização da ferramenta PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) que permite estimar o perfil de atividade biológica de um composto orgânico (cuja massa molecular varia de 50 a 1250 Da) com base em sua fórmula estrutural, a estimativa é baseada em uma análise das relações estrutura-atividade de um conjunto de dados contendo informações sobre a estrutura e atividade biológica de mais de 300.000 compostos orgânicos, entre elas substâncias medicamentosas, candidatos a medicamentos em vários estágios de estudos clínicos e pré-clínicos, e compostos, para os quais são conhecidas informações específicas de toxicidade (IBMC, 2022). Assim, o PASS pode ser usado para estimar os perfis de atividade biológica para moléculas projetadas virtualmente, muito antes de sua síntese química e testes biológicos (FILIMONOV *et al.*, 2014).

## 5 RESULTADOS

O presente trabalho teve como propósito o planejamento, estudos *in silico* e síntese de análogos bioisostéricos de compostos acetamidas com atividade tripanocida e leishmanicida. Devido a pandemia de COVID-19, e seus efeitos em toda a sociedade, adaptações tiveram que ser realizadas no trabalho focando especialmente no planejamento, aplicando estratégias atualmente muito presentes e difundidas na química medicinal como o estudo de bioisosterismo e a realização de diversas análises *in silico*, para direcionamento e posterior processo de síntese destes compostos e finalizar com os testes de sua atividade biológica e por fim executar a relação estrutura e atividade destes compostos.

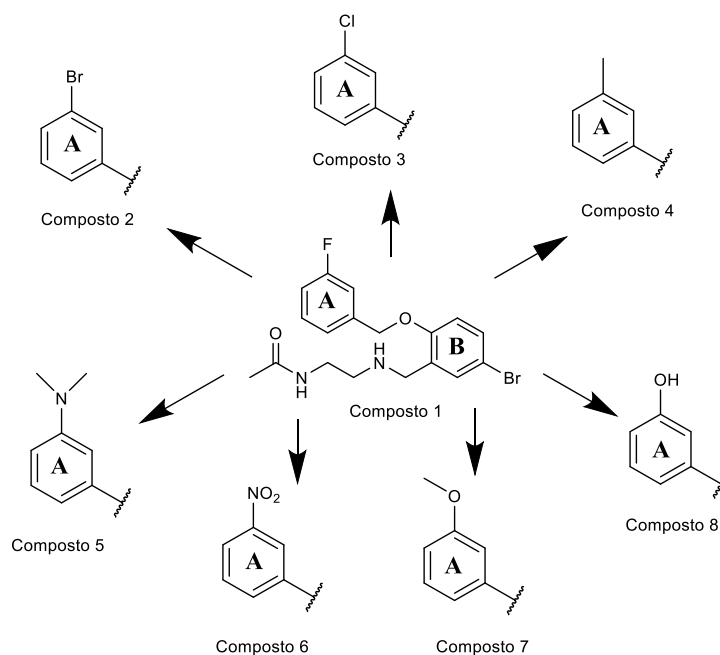
### 5.1 PLANEJAMENTO

O planejamento racional de fármaco possui como base a aplicação de um conjunto de técnicas, que envolve dois passos importantes os estudos *in silico* e a aplicação experimental através da síntese e obtenção dos compostos previamente planejados, visando obter novas moléculas potencialmente ativas, tentando utilizar metodologias que envolvam reações de obtenção rápidas e com menores números de reagentes químicos.

Considerando as estratégias de modificação molecular com intuito de explorar o espaço químico e aperfeiçoar propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, no presente trabalho utilizamos a técnica de bioisosterismo, que nos permite fazer a avaliação da influência química e estérica dos grupos funcionais propostos para o trabalho. Os estudos *in silico* foram realizados com 7 análogos bioisostérico derivados do composto **1** (Figura 11), o qual no trabalho anterior apresentou resultados promissores (ZIMMERMANN, 2018).

Foram sugeridos compostos com os seguintes substituintes no anel A: -Br (Composto 2), -Cl (Composto 3) , -CH<sub>3</sub> (Composto 4) , -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Composto 5), -NO<sub>2</sub> (Composto 6), -OCH<sub>3</sub> (Composto 7) e -OH (Composto 8) conforme Figura 4, no presente trabalho também nomeamos os anéis aromáticos da estrutura como anéis A e B. Desta forma, as estruturas 2D dos compostos propostos foram construídas no software ChemDraw Ultra 16.0 e, posteriormente, otimizadas utilizando o programa Visual Studio 2020.

Figura 11 - Estrutura do composto 1 e os respectivos análogos propostos, compostos 2-8.



Fonte: AUTOR (2022)

A estrutura 3D foi obtida pelo software CORINA Classic (<https://www.mn-am.com/products/corina>), através do código SMILES, no ChemDraw e o processo de minimização de energia pelo software Mercury 2020.1.1. Durante esse cálculo, a energia do sistema é reduzida, alcançando, por fim, uma conformação mais estável para o sistema de interações (VERLI, 2014). O método selecionado foi Hamiltonian - QM - Quantum mechanics - PM7 (STEWART, 2012).

A enzima tripanotona redutase (Figura 12) é uma proteína homodimérica, onde cada monômero (A e B) é formado por três domínios: domínio de ligação FAD (aminoácidos 1-160 e 289-360), domínio de ligação NADPH (aminoácidos 161-289) e domínio de interface (aminoácidos 361-488) (ILARI *et al.*, 2017). A maioria dos aminoácidos do sítio ativo da TR interagem com a tripanotona dissulfeto por meio de interações hidrofóbicas. Observam-se ligações de hidrogênios entre a ligação peptídica nas porções glicina e espermidina da tripanotona e os aminoácidos Glu19A e Tyr111A (BOND *et al.*, 1999; ZIMMERMANN, 2018). O complexo cristalográfico enzimático utilizado foi obtido no Banco de dados PDB (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB” 2021) e dentre as estruturas disponíveis, optou-se

por utilizar o complexo cristalográfico 1BZL com resolução de 2,40Å, o qual possui cocrystalizado na proteína o composto bis(gama-glutamil-cisteinil-glicinil)espermidina.

Figura 12 - Complexo cristalográfico da enzima tripanotona redutase, modelo 1BZL



Fonte: PROTEIN DATA BANK (2021)

## 5.2 ENSAIOS *IN SILICO*

A capacidade de prever a farmacocinética de um medicamento e entender os principais fatores que influenciam na interação do fármaco com os alvos pretendidos durante as fases iniciais do desenvolvimento de novos compostos bioativos, é uma ferramenta poderosa para evitar o desperdício de tempo e principalmente de materiais que muitas vezes são onerosos e com potencial tóxico (ALQAHTANI, 2017). A modelagem molecular (*in silico*) emprega ferramentas adequadas para esta tarefa e tem potencial para minimizar os requisitos propostos durante os estudos experimentais (PETITO *et al.*, 2019).

Os tópicos a seguir irão explorar três estudos de predição *in silico* sendo eles as análises das características físico-químicas e de biodisponibilidade, metabolismo e predição toxicológica e pôr fim a ancoragem molecular (*docking molecular*) utilizando como alvo a tripanotona redutase, enzima presente nos parasitas causadores de doença de Chagas (causada por *Trypanosoma cruzi*) e Leishmaniose (causada por *Leishmania sp.*), obtendo resultados preditivos de perfis farmacocinético, a biodisponibilidade, a toxicidade e possíveis mecanismos de interação destes compostos com o alvo, para estudos biológicos posteriores.

### 5.2.1 Avaliação *in silico* das propriedades físico-químicas e biodisponibilidade

Com o desenvolvimento e aperfeiçoamento de inúmeros bancos de dados estruturais, a etapa da avaliação *in silico* tornou-se essencial para determinar a viabilidade de determinados compostos, visto que a maioria dos medicamentos possui a administração via oral como principal meio de adesão farmacológica (YANG *et al.*, 2020). Várias mudanças podem ser observadas nas distribuições de propriedades dos medicamentos com o decorrer dos anos, e algumas características físico-químicas em comum foram observados no processo de desenvolvimento até a aprovação principalmente de medicamentos administrados por via oral (LEESON; DAVIS, 2004; PROUDFOOT, 2005; YANG *et al.*, 2020).

O peso molecular médio aumentou significativamente de uma média de ~300 na década de 1950 para ~420 na década de 2010, enquanto log P permaneceu estável com um ligeiro aumento de ~2,5 na década de 1950 para ~3,3 na década de 2010. Portanto para uma melhor comparação e análise, os dados de peso molecular, logP, número de aceptores de hidrogênio (NHBA), número de doadores de hidrogênio (NHBD), e o número de ligações rotativas (Nrotb), têm sido amplamente utilizadas na maioria das regras de avaliação *in silico* (LEESON; ST-GALLAY; WENLOCK, 2011; SHULTZ, 2018, YANG *et al.*, 2020).

O peso molecular (PM) é um importante descritor físico químico, pois o tamanho de uma molécula tem um impacto direto nos perfis de ADME, o aumento do PM acima de 400Da levaria, a um declínio constante da biodisponibilidade (incluindo um decréscimo constante da absorção intestinal), moléculas com peso maior de 500Da (como macrociclos e peptídeos), apresentam como forma de administração principal a via parenteral (VARMA *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2020). O logP tem uma grande influência na potência nos perfis ADME e de toxicidade, compostos com alta lipofilicidade, frequentemente são mais propensos a se ligar a múltiplos alvos que aumentam a probabilidade de alta promiscuidade dos alvos, podendo levar a eventos adversos não desejados para a farmacoterapêutica, no entanto, se apresentar valores baixos, há uma maior probabilidade de possuir baixa permeabilidade e problemas de depuração, portanto estar na faixa ideal de lipofilicidade é destacada como bons indícios de biodisponibilidade (A ARNOTT; PLANEY, 2012; YANG *et al.*, 2020).

Em estudos mais recentes observou-se que a interação de hidrogênio desempenha um papel muito importante na permeação da membrana e absorção intestinal, com ação direta em glicoproteínas, além disso, é bem conhecido que as interações de hidrogênio têm uma grande

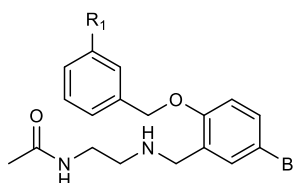


influência na afinidade de ligação entre o ligante e sua proteína alvo (DESAI; RAUB; BLANCO, 2012; ZHANG *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2020).

O número de ligações rotacionáveis, é uma característica que representa bem a flexibilidade molecular, e está intimamente relacionado à afinidade do alvo e à força da interação intermolecular, uma diminuição de  $N_{rotb}$  torna uma molécula mais rígida e, portanto, restringe sua liberdade conformacional, enquanto um grande aumento de  $N_{rotb}$  pode aumentar a complexidade molecular e, assim, influenciar sua atividade biológica, podendo ligar-se a distintos alvos moleculares, e por fim a área topológica de superfície polar (TPSA) se correlaciona bem com propriedades de transporte de fármacos, como absorção intestinal e penetração na barreira hematoencefálica, nos compostos ativos por via oral os valores de TPSA são geralmente inferiores a 120, e para medicamentos que precisam passar pela barreira hematoencefálica, são quase abaixo de 70 (KELDER *et al.*, 1999; VEBER *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2020).

Uma avaliação prévia das propriedades físico-químicas dos derivados bioisostéricos foi realizada utilizando o software de acesso livre “Osiris Data Warrior”, que fornece informações relacionadas a propriedades como solubilidade do fármaco e biodisponibilidade oral por meio resultados obtidos com base em cálculos teóricos (SANDER *et al.*, 2015).

Tabela 1 - Dados dos compostos obtidos no software “Osiris DataWarrior”.



Compostos	R <sub>1</sub>	PM (≤500 Da)	clogP (≤ 5)	HDA (≤5)	HBA (≤ 10)	TPSA (≤ 140 Å)	Nºde Rotb (≤10)
Composto 2	Br	456,77	3,30	2	4	50,36	8
Composto 3	Cl	411,72	3,18	2	4	50,36	8
Composto 4	CH <sub>3</sub>	391,31	2,92	2	4	50,36	8
Composto 5	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	420,35	2,47	2	5	53,60	9
Composto 6	NO <sub>2</sub>	422,28	1,66	2	7	96,18	9
Composto 7	OCH <sub>3</sub>	407,31	2,51	2	5	59,59	9
Composto 8	OH	393,28	2,23	3	5	70,59	8

Fonte: AUTOR (2022)

Como observado na Tabela 1 entre os análogos analisados não houve violação das regras propostas por Lipinski ou por Veber (LIPINSKI, 2000; VEBER *et al.*, 2002). Para que um fármaco apresente bons resultados de potência e eficácia, ele deve possuir boa capacidade de atravessar as barreiras fisiológicas e ser absorvido, sabendo disso os resultados do coeficiente de partição octanol água (LogP) é um ótimo preditivo para analisar a lipofilicidade teórica dos compostos propostos, e como observado nos resultados, essa série apresentou valores de LogP entre 1,66 e 3,30, valores menores que 5 ( $\text{LogP} \leq 5$ ) o que sugere boa permeabilidade em membranas biológicas e absorção (LIPINSKI, 2000; BARREIRO; FRAGA, 2015).

Outros softwares de livre acesso que fornecem dados importante de biodisponibilidade dos fármacos são o SWISSAdme e PreADMET, dados como solubilidade, predição da característica de absorção em determinadas metodologias empregadas na prática biofarmacêutica como metodologias Caco-2 e absorção transdérmica (incluindo a predição de irritabilidade da pele), além de predizer parâmetros de absorção pela barreira hemato-encefálica (BHE) ou do inglês *Blood-brain barrier* (BBB), capacidade de ligação a proteínas plasmáticas, porcentagem de absorção intestinal humana e probabilidade de efluxo pela glicoproteína P (Pgp) principal responsável pelo aumento do transporte de efluxo celular, podendo assim diminuir a biodisponibilidade do fármaco (DAINA *et al.*, 2017; YEE, 1997; BORGES, 2018).

A baixa solubilidade de diversos fármacos em meio aquoso é um dos grandes problemas não somente para o desenvolvimento de formulações, mas principalmente para absorção, já que para um medicamento possua sua absorção ideal é necessário que esse seja parte de uma solução aquosa (SHARMA *et al.*, 2009).

Portanto é importante o conhecimento acerca da solubilidade de candidatos a novos fármacos, por isso os compostos do presente estudo tiveram o perfil de solubilidade em meio aquoso (LogS) avaliado através da metodologia ESOL. Outras metodologias como a General Solubility Equation (GSE) possuem como descritores ponto de fusão e logP com valores ionizados, já o modelo Estimated SOLubility (ESOL) ESOL possui 4 descritores facilmente encontrados em softwares *in silico* para o cálculo da solubilidade, entre eles incluem-se o peso molecular de um composto, o número de ligações rotacionáveis que a molécula possui, a proporção de átomos “pesados” na molécula que estão diretamente associados com um sistema aromático, e o logP da molécula (JAIN; YALKOWSKY, 2001; DELANEY, 2004; ALI *et al.*, 2012).

Os compostos foram analisados no software SwissADME e os resultados podem ser observados na tabela 2, expressos em valores de LogS, solubilidade em mg/mL e a escala de

solubilidade de acordo com a seguinte escala: insolúvel (I) < - 10 < pouco solúvel (OS) < -6 < moderado (M) < -4 < solúvel (S) < -2 < muito solúvel (MS) < 0 < altamente solúvel (AS).

Tabela 2 - Dados dos compostos obtidos nos softwares SwissADME (□) e PreADMET (■).

Compostos	Parâmetros						
	LogS	Solubilidade mg/mL	Classificação de solubilidade	TPSA (A)	%ABS	Caco-2 (nm/seg)	Inibição da Pgp
Composto 2	-4.19	2.95e-02	M	50,36	95,63	48,19	Não
Composto 3	-4.13	3.08e-02	M	50,36	95,41	47,14	Não
Composto 4	-3.86	5.44e-02	S	50,36	95,04	46,1	Não
Composto 5	-3.67	9.08e-02	S	53,6	95,32	49,79	Não
Composto 6	-4.26	2.33e-02	M	96,18	95,18	12,25	Sim
Composto 7	-3.64	9.43e-02	S	59,59	95,1	45,58	Não
Composto 8	-3.53	1.15e-01	S	70,59	92,85	24,14	Não

Fonte: AUTOR (2022)

Os compostos analisados possuem valores de LogS entre -3,53 e -4,26, todos os compostos apresentam valores maior que -5,00, os compostos 2,3 e 6 apresentaram valores característicos de solubilidade moderada e os compostos 4,5, 7 e 8 demonstrar boa solubilidade. Portanto pode-se inferir que todos os compostos são teoricamente solúveis em fluidos biológicos pelos valores apresentados de solubilidade (LogS > -5) (ALI *et al.*, 2012).

Outra etapa importante realizada pela plataforma SwissADME é a identificação de PAINS (*pan-assay interference compounds*) que no contexto de triagem virtual e análises *in silico* são amplamente conhecidos como compostos altamente promíscuos que produzem resultados falsos positivos com a possibilidade de interação com diversos alvos. Esses PAINS possuem estruturas definidas, abrangendo várias classes de compostos, estas estruturas normalmente estão presentes em bancos de dados sejam do meio acadêmico ou mesmo de indústrias farmacêuticas, e identificar compostos com estas características são essenciais para evitar a otimização de compostos que provavelmente irão gerar insucessos durante todo seu desenvolvimento. Na presente análise realizada através do SwissADME os compostos não geraram alertas da presença de PAINS o que é esperado para prosseguimento dos estudos (BAELL; WALTERS, 2014; ISYAKU *et al.*, 2020; BOLZ *et al.*, 2021).

Antes de um fármaco atingir seu alvo de ação e exercer seu efeito farmacológico, ele é levado para a corrente sanguínea e distribuído entre os diferentes tecidos. Esse processo geralmente ocorre através de superfícies como as mucosas do trato digestivo principalmente a absorção intestinal, mas outras formas de absorções também podem ocorrer no processo de transporte até a corrente sanguínea, como por via enteral, parenteral (subcutânea, intramuscular ou intravenosa), via membrana mucosa ou transdérmica.

A avaliação desse processo de absorção tornou-se uma etapa muito importante para o planejamento de novos fármacos, uma vez que sua análise pode avaliar esses novos compostos quanto a sua biodisponibilidade e conseqüentemente na previsão de sua via de administração (GOLAN, 2009). Logo, sabendo que a absorção via gastrointestinal é o mais comum entre os fármacos disponíveis, foi avaliado o perfil preditivo de parâmetros de absorção gastrointestinal (%ABS), e permeação de células Caco-2 disponibilizado através do software PreADMET.

O TPSA ou também conhecido como PSA é um parâmetro relacionado com o transporte passivo membranar e permite a predição da absorção intestinal humana e passagem através da BHE, no qual valores de TPSA  $<140(\text{Å}^2)$  são considerados desejáveis para indicar boa absorção gastrointestinal e passagem na barreira hematoencefálica. Todos os compostos apresentaram porcentagem de absorção intestinal acima de 90% (Tabela 2) o que é um indicativo de uma biodisponibilidade relevante, lembrando que esta é uma metodologia de comparações e claro podem existir algumas diferenças nos valores experimentais destes compostos ou seus metabólitos (YEE, 1997; BORGES, 2018).

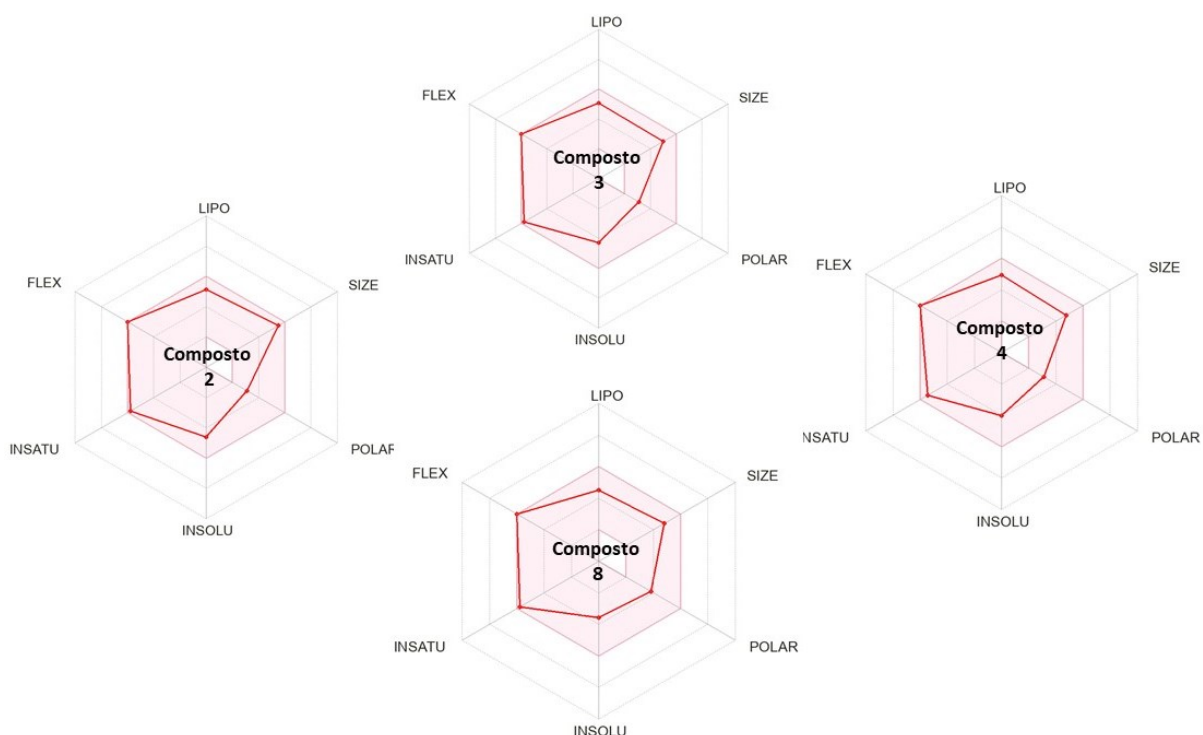
O PreADMET fornece além da previsão da absorção intestinal, métodos de previsão de absorção através de técnicas como a Caco-2 fornecendo dados importantes sobre a absorção de determinados compostos. Em relação ao Caco-2 (Permeabilidade nas células), há uma classificação empregada pelo banco de dados PreADMET feita por Yamashita *et al.* 2000 e IRVINE *et al.*, 1999, em que valores inferiores a 4 nm/seg indicam baixa permeabilidade, entre 4 e 70 nm/seg uma permeabilidade média e maiores que 70 nm/seg, uma permeabilidade alta. Dessa forma, como observado na Tabela 2 todas as moléculas analisadas apresentaram a classificação de média permeabilidade com destaque aos compostos 2, 3 4 e 7 que apresentaram valores próximos a 50 nm/seg.

Os derivados bioisotéricos também foram analisados segundo o gráfico Bioavailability Radar (Figuras 13 e 14) da plataforma SwissADME, que correlaciona dados como tamanho da molécula, flexibilidade, solubilidade, lipofilicidade, saturação e polaridade. A área marcada de

cor rosa tem o papel de delimitar as condições ideais de biodisponibilidade para a administração de um fármaco via oral (DAINA *et al.*, 2017).

Como pode ser visto nas figuras 13 e 14, a maioria dos compostos parece apresentar excelência para biodisponibilidade oral, uma vez que, praticamente todos os parâmetros avaliados estão dentro da área rosada, que corresponde de padrões ideais de biodisponibilidade. Comparando os análogos, nota-se que os derivados 2, 3, 4 e 8 (Figura 13) atendem teoricamente uma excelente biodisponibilidade, já que todas as moléculas se encontram dentro dos parâmetros físico-químicos ideais para esse tipo de predição.

Figura 13 - Radar de biodisponibilidade dos compostos 2,3,4 e 8.

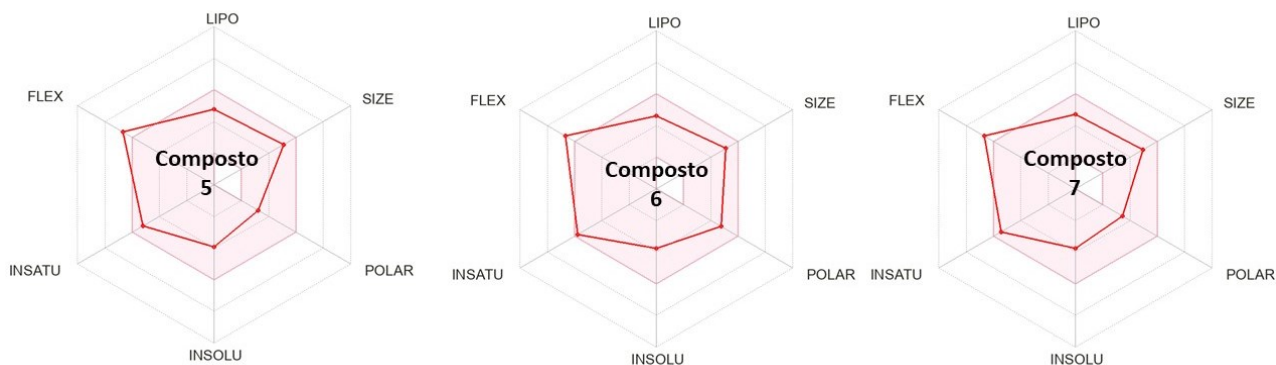


Legenda: LIPO (lipofilicidade)= XLOGP3 entre -0.7 e +0.5, SIZE (tamanho da molécula) = entre 150 e 500 g/mol, POLAR (polaridade)= TPSA entre 20 e 130Å<sup>2</sup>, INSOLU (insolubilidade)= LOG S < 6, INSATU (saturação)= fração de carbonos em sp<sup>3</sup> ≥ 0.25, FLEX (flexibilidade) ≤ 9 grupos rotáveis. Fonte: AUTOR (2022)

Já em contrapartida, nos compostos 5, 6 e 7 (Figura 14) observa-se um perfil de boa biodisponibilidade, porém a flexibilidade nestes compostos encontra-se superestimada, ou seja, apresentando um perfil de disponibilidade um pouco menos atraente, já que um aumento de flexibilidade molecular pode não ser desejado, uma vez que compostos grandes e flexíveis, quando comparados com a maioria dos fármacos, são de interesse para atingir alvos que não

podem ser modulados por pequenas moléculas que geralmente são compatíveis com a regra dos cinco (CARON *et al.*, 2020).

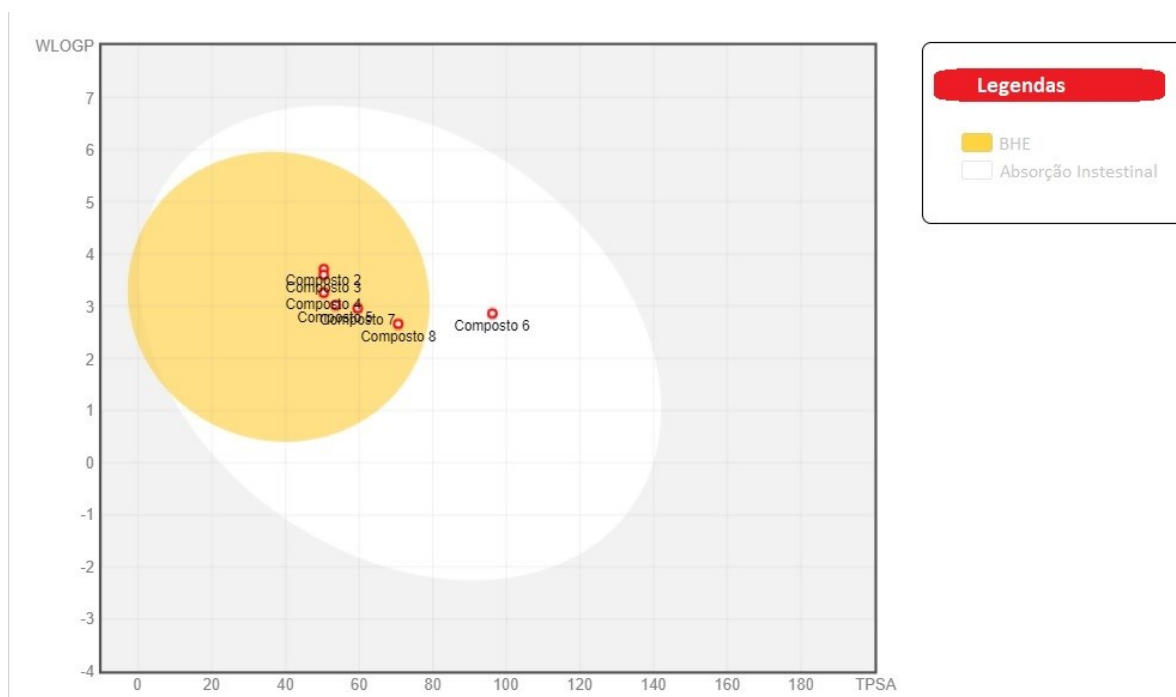
Figura 14 - Radar de biodisponibilidade dos compostos 5,6 e 7.



Legenda: LIPO (lipofilicidade)= XLOGP3 entre -0.7 e +0.5, SIZE (tamanho da molécula) = entre 150 e 500 g/mol, POLAR (polaridade)= TPSA entre 20 e 130Å<sup>2</sup>, INSOLU (insolubilidade)= LOG S < 6, INSATU (saturação)= fração de carbonos em sp<sup>3</sup> ≥ 0.25, FLEX (flexibilidade) ≤ 9 grupos rotáveis. Fonte: AUTOR (2022).

Além dos gráficos de radar a plataforma SwissADMET fornece o gráfico chamado BOILED-Egg (Figura 15) que faz uma correlação do TPSA com lipofilicidade (LogP), dentre os compostos analisados nota-se que apenas um dos compostos analisados não apresenta capacidade de ultrapassar a BHE representada pelo círculo amarelo, possuir esta característica não é muito desejado neste processo de desenvolvimento, pois essa habilidade de penetração só se faz interessante quando o alvo farmacológico está localizado no sistema nervoso central (SNC), caso contrário, o medicamento poderá acarretar no aparecimento de efeitos colaterais como cefaleia, sonolência entre outros à depender da área em que possa ocorrer alguma interação. (BORGES, 2018; PEREIRA, 2019).

Figura 15 - BOILED-Egg dos análogos.



Legenda: Círculo amarelo- moléculas que apresentam capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica; Elipse Branco- moléculas com características para serem absorvidas passivamente pelo trato gastrointestinal.  
Fonte: AUTOR (2022)

A ligação às proteínas plasmáticas (PPB, do inglês, *Plasma Protein Binding*) é uma das propriedades farmacocinéticas de grande importância no planejamento de fármacos. A ligação de fármacos às proteínas plasmáticas balanceia a capacidade de determinado fármaco sofrer difusão do sangue para o local de ação e faz com que possa ocorrer uma redução da biodisponibilidade do fármaco, visto que os que se encontram ligados a elas não possuem efeito terapêutico, apenas a forma livre. Dependendo da extensão da ligação, as formas podem variar de 1 a 99,9%. O complexo fármaco-proteína age como um reservatório na corrente sanguínea, retardando assim a chegada de fármacos aos sítios de eliminação e disponibilizando-os no local de ação quando necessário. Quando a ligação à proteína é forte (fração livre  $< 0,1$ ), normalmente ocorre uma diminuição na intensidade máxima de ação de uma dose de um fármaco, alterando assim sua resposta clínica, reciprocamente, quando a ligação é fraca, pode ocorrer um aumento na intensidade de ação (MODA, 2007; SANTANA *et al.*, 2020).

Como observado na tabela 3, em análise fornecida pela plataforma PreADMET os compostos apresentaram uma faixa entre 76% – 59% de ligação a proteínas plasmáticas, o que é desejado no desenvolvimento de diversos fármacos pois além de ter uma rápida difusão

resultando em alto nível de ligação ao local de ação farmacológica, ter uma alta depuração e também menores chances de interação com outros fármacos que possam ser administradas concomitantemente na terapêutica (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2014).

Outro parâmetro importante nos estudos de ADME é análise da interação das moléculas com a glicoproteína P. Essa proteína é membro da bomba de efluxo ATP-dependente agindo como barreira fisiológica para expulsar toxinas e xenobióticos para fora das células. A Pgp está diretamente envolvida na absorção intestinal, metabolismo e penetração na BHE em grande maioria dos fármacos, e sua inibição ou indução pode alterar drasticamente a biodisponibilidade oral de determinado medicamento diminuindo o tempo de retenção de diversos fármacos (AMIN, 2013; PEREIRA, 2019).

Como observado na tabela 3, na análise realizada pela plataforma PreADMET apenas o composto 6 demonstrou potencial interação com a Pgp, estando o restante livre dessa interação indicando, assim, apesar da capacidade aumentada dos compostos analisados atravessarem a barreira hematoencefálica, esses fármacos apresentam excelentes parâmetros de biodisponibilidade após a análise *in silico* e baixa probabilidade de efluxo.

Tabela 3 - Valores da % de ligação a proteínas plasmáticas, ação de inibição na Pgp e logKp referente a permeabilidade da pele.

Compostos	Parâmetros		
	% Ligações a proteínas plasmáticas	Inibição da Pgp	Permeabilidade na pele logKp (cm/hr)
Composto 2	76,4	Não	-2,64545
Composto 3	73,4	Não	-2,88205
Composto 4	66,2	Não	-2,76793
Composto 5	60,8	Não	-2,91371
Composto 6	68,9	Sim	-2,93387
Composto 7	61,7	Não	-3,03495
Composto 8	59,1	Não	-3,64599

Fonte: AUTOR (2022)

E por fim o PreADMET também fornece um módulo que visa prever o coeficiente de permeabilidade da pele (Kp) através de um modelo de regressão linear (logKp). O parâmetro permeabilidade cutânea indica a capacidade de determinada molécula ser absorvida pela pele, é um parâmetro importante na prospecção de fármacos com capacidade de distribuição via intradérmica, para prever possível exposição a compostos tóxicos ou mesmo a absorção



acidental do composto durante o manuseio. O valor negativo do parâmetro Permeabilidade da pele indica que o fármaco será impermeável à pele. Como observado na tabela 3, os valores foram todos negativos indicando que provavelmente é um composto com baixa possibilidade de ser utilizado via intradérmica, porém demonstra ser atóxico na exposição com a pele (POTTS; GUY, 1992; SOUZA *et al.*, 2022).

### **5.2.2 Avaliação *in silico* do metabolismo dos compostos**

A administração de medicamentos por via oral é a mais simples via de administração visto que evita problemas como a indução infecções locais ou sistêmicas causadas por administração intravenosa, intramuscular ou subcutânea, sendo, portanto, um meio eficaz e seguro para a administração de fármacos. Além da importância do estudo da absorção, a análise do metabolismo de fármacos e as enzimas específicas envolvidas nesse processo podem auxiliar no planejamento de novos fármacos, e indicar alguma probabilidade de efeitos colaterais e interações medicamentosas (GOLAN, 2009; HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2014).

No metabolismo de fármacos destacam-se as diversas isoformas do citocromo P450, também identificadas como CYP, que são conhecidas pelo metabolismo de diversos xenobióticos entre eles os fármacos. Sabendo disso, foram realizados estudos *in silico* com as isoformas CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4.

Como observado na tabela 4 na predição realizada através da plataforma PreADMET, os compostos estudados não inibem as isoformas CYP2C19 e CYP2C9, porém essas isoformas não estão diretamente relacionadas a inibição de fármacos sendo que as isoenzimas CYP2D6 e CYP3A4 são a mais comumente relacionadas no metabolismo de fármacos, cerca de 70% do metabolismo hepático de fármacos realizados pela CYP450 é dado principalmente por essas duas isoformas, e na presente análise entre os compostos pelo menos uma dessas duas isoenzima é inibida dando indicativo de um perfil um pouco indesejado de inibição dessas isoformas e com potenciais chances de interações medicamentosa, característica não desejada em patologias que exigem polifarmacologia (LEPPERT, 2011).

Tabela 4 - Resultado da predição de inibição dos compostos as isoformas CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4

<b>Compostos</b>	<b>Isoformas</b>			
	<b>CYP 2C19</b>	<b>CYP 2C9</b>	<b>CYP 2D6</b>	<b>CYP 3A4</b>
<b>Composto 2</b>	Não	Não	Não	Sim
<b>Composto 3</b>	Não	Não	Não	Sim
<b>Composto 4</b>	Não	Não	Não	Sim
<b>Composto 5</b>	Não	Não	Não	Não
<b>Composto 6</b>	Não	Não	Sim	Não
<b>Composto 7</b>	Não	Não	Sim	Sim
<b>Composto 8</b>	Não	Não	Sim	Sim

Fonte: AUTOR (2022)

Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) Doença de Chagas disponibilizado pelo Ministério da Saúde, o manejo farmacológico da doença ocorre no tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica que consiste na utilização de dois medicamentos o benzonidazol e o nifurtimox. O tratamento das complicações clínicas da doença de Chagas é direcionado à condição clínica relacionada (por exemplo, insuficiência cardíaca ou megaeosôfago), no tratamento de alterações digestivas há indicação da utilização de medicamentos como nifedipina e dinitrato de isossorbida que visa basicamente atenuar os comprometimentos clínicos. E no tratamento de complicações cardiovasculares o tratamento é semelhante àquela dos casos com doença devido a outras etiologias, utilização de inibidores da enzima conversora de angiotensina (enalapril e captopril), diuréticos (hidroclorotiazida e furosemida), beta bloqueadores (metoprolol, caverdilol e propranolol) dos bloqueadores do receptor da angiotensina (por exemplo, losartana), antagonista de aldosterona (espirolactona) e digoxina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Em consulta ao bulário eletrônico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a plataforma de interações medicamentosas do Food and Drug Administration (FDA) foram consultadas as possíveis interações com medicamentos que possam inibir ou serem substratos de CYP ou Pgp, e, os únicos fármacos diretamente relacionados a CYP e Pgp preconizados pela diretriz do ministério da saúde para doença de Chagas foram os beta bloqueadores que são substratos de CYP2D6 (metoprolol, propranolol, carvedilol e nebivolol)

e o carvedilol que é também substrato de Pgp, portanto os níveis plasmáticos de metoprolol podem ser elevados pela coadministração de compostos que fazem interações pelo CYP2D6 e na análise *in silico* foi observado que os compostos 6,7 e 8 possam ter interações com essa isoforma (ANVISA, 2022; FDA, 2020).

Entre os diversos estudos de predição a identificação do(s) sítio(s) de metabolismo (SOMs) de um composto por CYPs é importante no desenvolvimento de fármacos. A determinação dos SOMs pode ajudar a transformar os sítios em grupos funcionais mais estáveis, aumentando a estabilidade metabólica e evitar a produção de metabólitos potencialmente tóxicos. As identificações experimentais de SOM's são geralmente trabalhosas, demoradas e custosas, e, com avanço tecnológico e de interligação de redes neurais e banco de dados de compostos, muitos métodos computacionais foram desenvolvidos para prever os SOM's de substratos de CYPs. Eles geralmente podem ser classificados em abordagens baseadas em ligantes e estrutura (ZHANG *et al.*, 2021).

Existem dois importantes servidores da web disponíveis gratuitamente, que permitem prever sítios de metabolização para xenobióticos metabolizados por isoenzimas P450, a SmartCyp prevê sítios para compostos que são metabolizados por CYP3A4, CYP2C9 e CYP2D6 (RYDBERG *et al.*, 2010), e o prediction of site of metabolism (SOMP) que prevê as principais isoformas da CYP além de possíveis sítios de atuação da UGT.

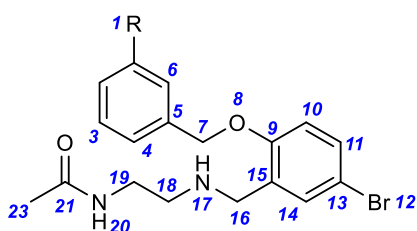
Para cada previsão, os seguintes valores são calculados: Pt é a probabilidade de que o átomo marcado seja um sítio de metabolismo da enzima apropriada, e a Pf é a probabilidade de que o átomo marcado não seja o sítio da enzima. Os átomos nos compostos são arranjados de acordo com os valores deltaP (Pt-Pf). (RUDIK *et al.*, 2015). Para a ferramenta SOMP foram consideradas na avaliação os átomos que apresentam valores de deltaP positivos, um indício de que há uma probabilidade maior daquele realmente ser o sítio de metabolização do xenobiótico, já para ferramenta SmartCYP utilizou-se os três principais sítios de metabolização gerados pelo software os quais também correspondem aos de maior probabilidade de ocorrência de metabolização.

A ferramenta SmartCYP como mencionado anteriormente apresenta os possíveis sítios de metabolização por três enzimas do citocromo P450, a CYP2C9 e a CYP2D6 e a CYP3A4. Cada isoforma possui sua “preferência” por substratos e reações de metabolização, por exemplo a CYP3A4 é responsável por reações de oxidação, a CYP2C9 preferência por substratos que contenham grupos doadores de ligação hidrogênio CYP1A2 preferência por substratos

planares, e a CYP2D6 preferência por substratos arilalquilaminas (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Para permitir uma melhor análise dos resultados obtidos serão utilizadas marcações enumerando as posições dos átomos assim como descrito na Figura 16.

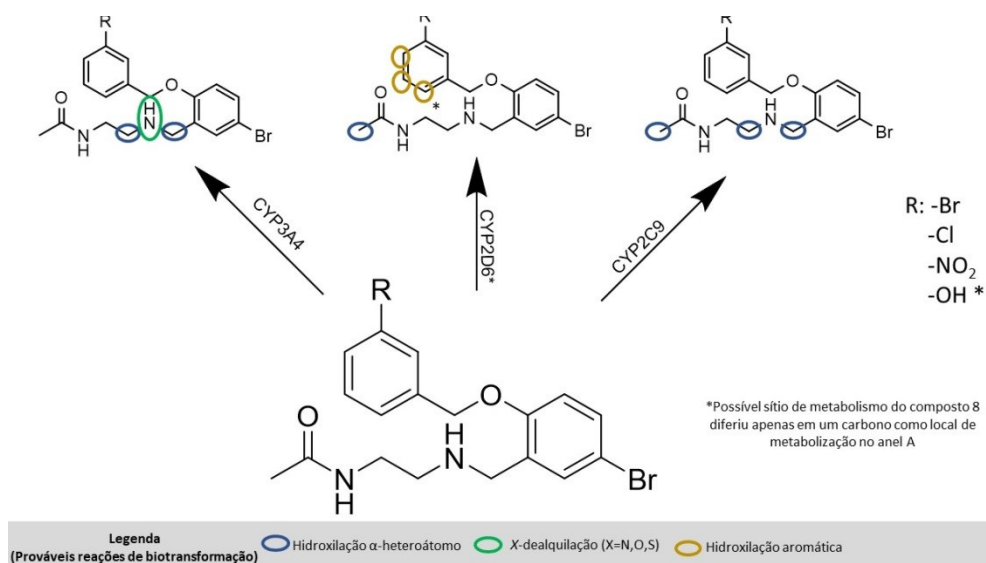
Figura 16 - Posições dos átomos para análise dos prováveis sítios de metabolização fornecidos pelas plataformas SmartCYP e SOMP.



Fonte: AUTOR (2021)

A simulação forneceu prováveis locais suscetíveis a sofrerem reações de metabolização, quatro desses análogos bioisostéricos (Compostos 2,3,7 e 9) analisados praticamente apresentaram os mesmos locais de metabolização e provavelmente os mesmos tipos de reações de metabolização, sendo que o composto 8 diferiu somente em uma posição (Figura 17).

Figura 17 - Prováveis sítios de interações fornecidos pela ferramenta SmartCYP para os compostos 2,3,6 e 8.

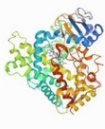
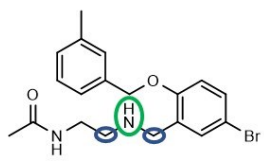
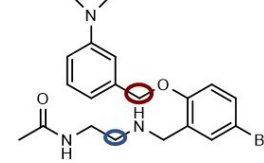
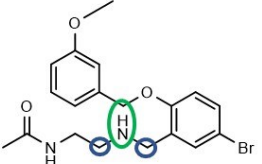

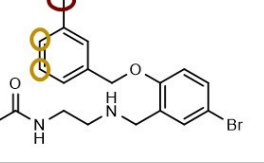
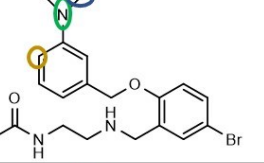
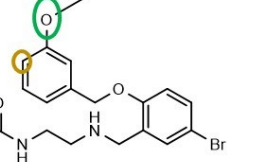

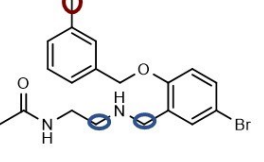
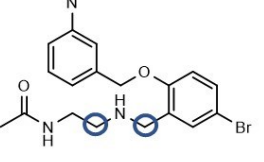
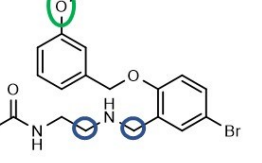



Fonte: AUTOR (2021)

Analisando os principais locais presume-se que as principais reações de biotransformação de fase I são as de hidroxilação  $\alpha$ -heteroátomo em que carbonos de  $\alpha$  heteroátomos (O,S,N) são substratos de oxidação das CYPs, e na presente análise ocorreram principalmente nos carbonos **16**, **18** e **23** (respectivamente **C16**, **C18** e **C23**); reações de hidroxilação aromática uma das reações de biotransformação mais comuns de fase I, visto que em fármacos disponíveis atualmente para terapêutica há a presença de no mínimo um anel aromático e a regioseletividade de ocorrência no anel, onde deve-se considerar fatores eletrônicos, fatores estéricos e de como há a interação do composto com a isoenzima, o anel A apresentou-se como o principal local para estas reações de oxidação aromática (BARREIRO; FRAGA, 2015).

E por fim uma provável reação de N-dealquilação no **N17**, com as hidroxilações de carbonos  $\alpha$ -heteroátomos, resultam-se na obtenção de aminoacetais (RNH-C-OR'), tioacetais (RS-C-OR') e acetais (RO-C-OR'), através de rearranjos intramoleculares, ocorrem a perda do grupamento alquila ligado ao heteroátomo. Os éteres, amins secundárias e ou amins terciárias são fragmentos bem suscetíveis a essa reação de biotransformação (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Figura 18 - Prováveis sítios de interações fornecidos pela ferramenta SmartCYP para os composto 4,5 e 7.

Isoformas CYP450	Composto 4	Composto 5	Composto 7
 <b>CYP3A4</b>			
 <b>CYP2D6</b>			
 <b>CYP2C9</b>			
<b>Legenda</b> (Prováveis reações de biotransformação)			

Fonte: AUTOR (2021)

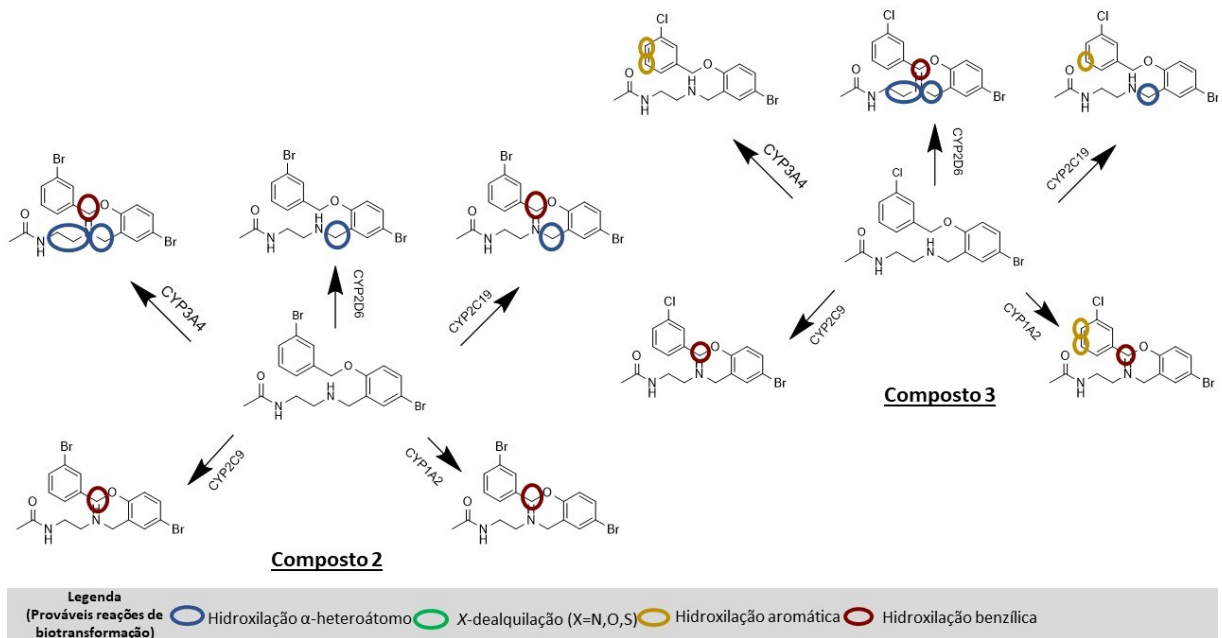
Os compostos 4 e 7 apresentaram o mesmo perfil de prováveis sítios de metabolização na análise dos resultados gerados na plataforma do SmartCYP. Nas isoformas CYP3A4 com reações de N-dealquilação (**N17**) e de hidroxilação de  $\alpha$ -heteroátomo (**C16** e **C18**) e a CYP2C9 com reações de hidroxilação benzílica no composto 4 na região da metila (posição **1** ou **R1**) e no composto 7 também em **R1**, mas neste caso uma reação de O-delaquilação, e por fim possível reação de hidroxilação de  $\alpha$ -heteroátomo (**C16** e **C18**). A hidroxilação benzílica ocorre quando há a presença de metila (s) ou carbonos benzílicos na estrutura de algum xenobiótico, resultando em labilidade metabólica resultado de uma reação oxidativa nesta região (BARREIRO; FRAGA, 2015). Na isoforma 2D6 as principais regiões de metabolização foram o anel A (reações de hidroxilação aromática) e os substituintes da região **R1** com X-dealquilações e com hidroxilação de  $\alpha$ -heteroátomo. O carbono da posição 7 foi um local susceptível de hidroxilação benzílica no composto 5 (Figura 18).

A ferramenta SOMP forneceu duas regiões distintas de metabolização para o composto 2 (Figura 19), a CYP3A4 demonstrou o mesmo perfil obtido na ferramenta anterior, com inclusão de uma região próximo da ligação éter entre os anéis no **C7**, sugerindo uma reação de hidroxilação benzílica, esta região apareceu em praticamente todas as outras isoformas, sugerindo que é uma região com alta probabilidade de sofrer processo de biotransformação. Outra região que apresentou resultados positivos de deltaP foi a região do **C16** sugerindo reações de hidroxilação de  $\alpha$ -heteroátomo ou mesmo hidroxilação benzílica. Quanto a UGT enzima da fase II, os resultados obtidos na simulação *in silico* não forneceu resultados de deltaP relevantes quanto a algum sítio de metabolização para este composto.

O composto 3 (Figura 19) apresentou perfil semelhante ao composto anterior, apresentando região próximo da ligação éter entre os anéis no **C7**, sugerindo uma reação de hidroxilação benzílica, a região do **C16** sugerindo reações de hidroxilação de  $\alpha$ -heteroátomo ou mesmo hidroxilação benzílica, no anel A probabilidade de reações de hidroxilação aromática.

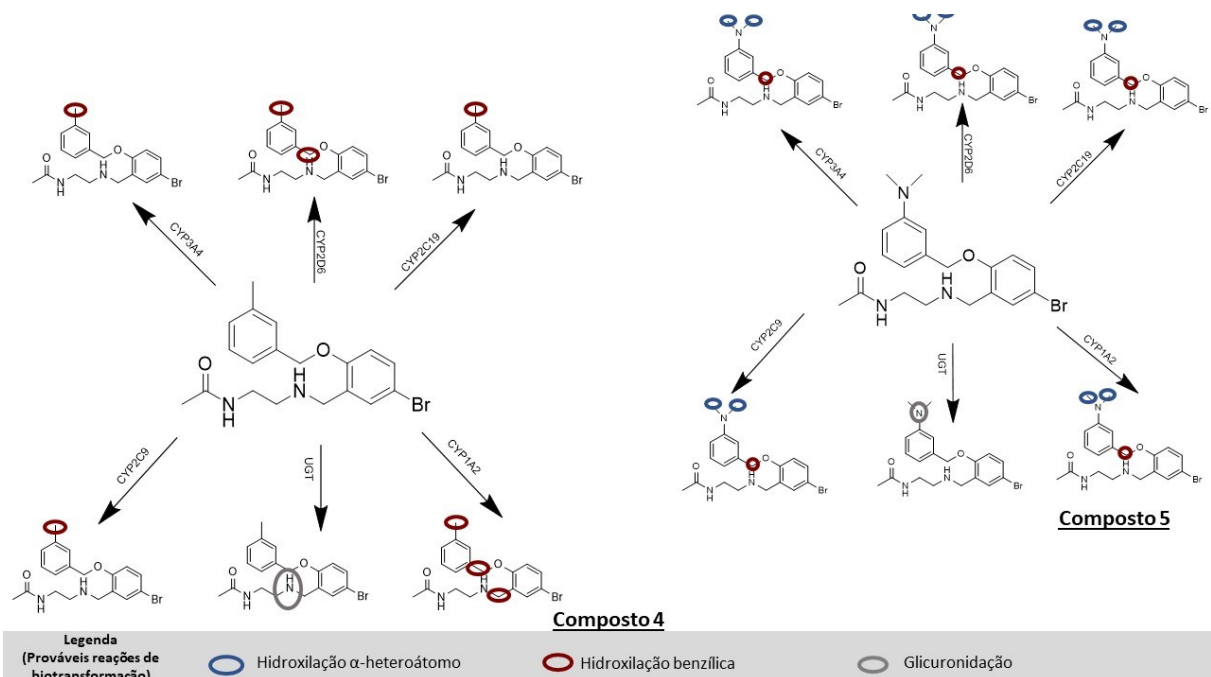
Os compostos 4 e 5 (Figura 20) apresentaram perfis semelhantes quanto aos prováveis sítios de metabolização, que foram principalmente o carbono próximo ao éter na posição 7 (**C7**), e na posição **R1** diferindo nas reações de metabolização que variam entre hidroxilação benzílica e hidroxilação de  $\alpha$ -heteroátomo. Nestes compostos o valor de deltaP apresentaram valores favoráveis para ocorrência das reações de glucuronidação, no composto 4 o mais susceptível foi a região do **N** na posição **17** e no composto 5 no **N** da dimetilamina na posição **R1**.

Figura 19 - Prováveis sítios de interações fornecidos pela ferramenta SOMP para os compostos 2 e 3.



Fonte: AUTOR (2021)

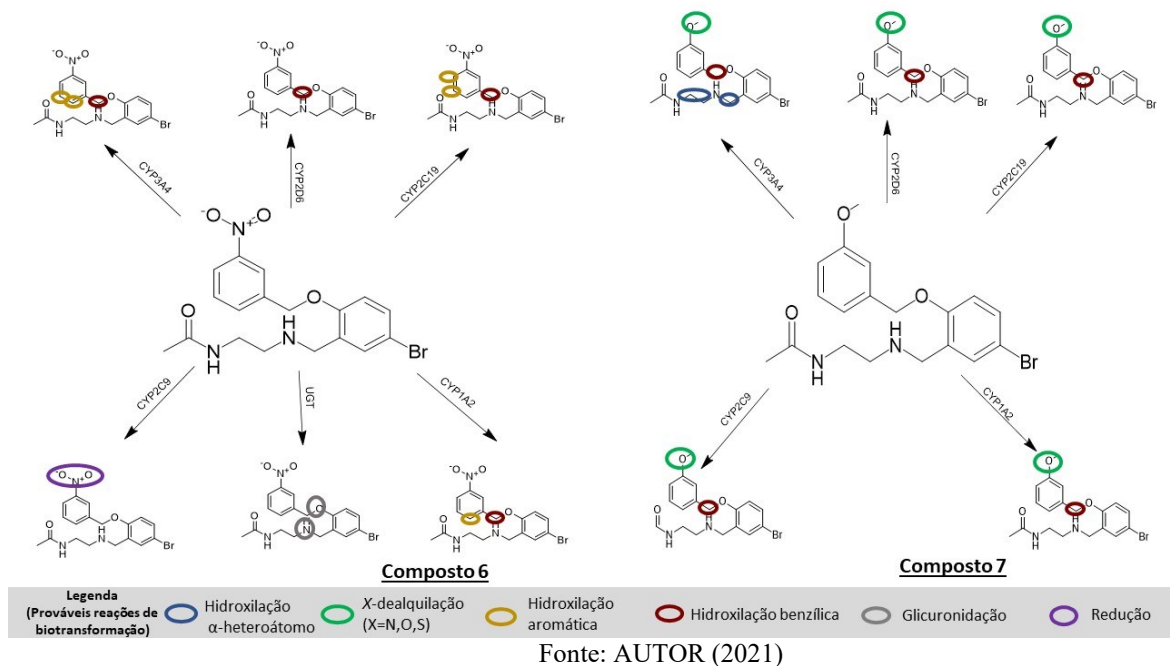
Figura 20 - Prováveis sítios de interações fornecidos pela ferramenta SOMP para os compostos 4 e 5.



Fonte: AUTOR (2021)

As reações de conjugação ocorrem em uma fase do metabolismo denominada fase II, os metabólitos formados na fase I apresentam um coeficiente de partição inferior ao fármaco original, promovendo uma maior polaridade desses metabólitos, porém muitas vezes não são suficientes apenas essa reação de fase I fazendo-se necessária para excreção desses fármacos a conjugação, esta reação ocorre através da inserção de moléculas endógenas ao substrato, através da ação de transferases, tornando esses conjugados mais hidrossolúveis. As principais reações de conjugação são a glicuronidação ou glucuronidação executada pela UGT, a sulfatação pela sulfotransferase, metilação com ação da acetiltransferase e conjugação com glutatona através da Glutaciona-S-transferase (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Figura 21 - Prováveis sítios de interações fornecidos pela ferramenta SOMP para os compostos 6 e 7.



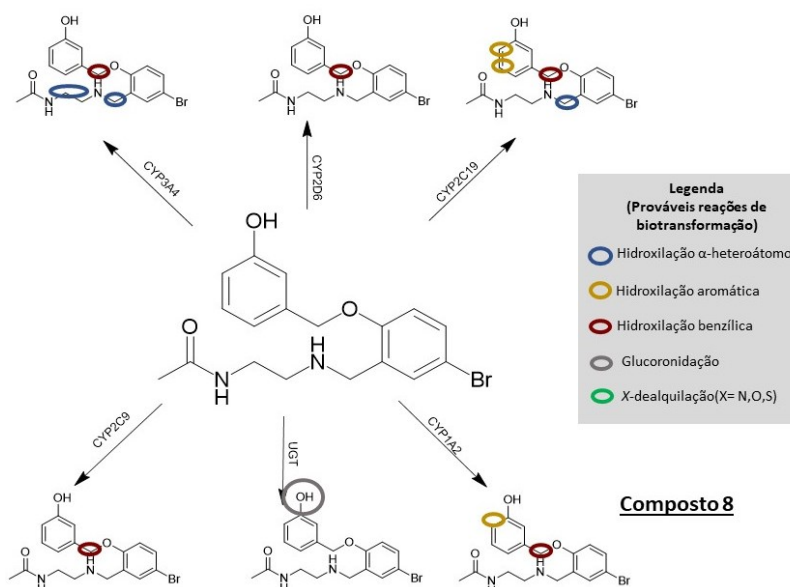
Os compostos 6 e 7 (Figura 21) apresentaram praticamente as mesmas regiões encontradas nos compostos anteriores, ressaltando que no composto 6 há uma grande possibilidade de reações de hidroxilação aromática no anel A, pois obteve deltaP relevante em praticamente todas as isoformas, além disso foi o único composto que apresentou probabilidade de sítios com ação da UGT com o oxigênio da posição 8 e com a amina da posição 17. No composto 6 e 7 apareceram prováveis sítios de reações de hidroxilação benzílica e hidroxilação de  $\alpha$ -heteroátomo principalmente no carbono da posição 7, além disto a posição R1 também se



mostrou propensa a sofrer reações no caso do composto 7 reações de O-dealquilação e no composto 6 reação de redução na posição **R1**.

As reações metabólicas de redução promovem modificação na estrutura do substrato através da adição de um hidrogênio em sistemas contendo duplas ligações, costumam catalisar reduções de grupamentos nitro ( $R-NO_2$ ). O último analisado foi o composto 8 que apresentou todas as reações observadas nos outros compostos, em locais semelhantes como reação de hidroxilação aromática no anel A, reações de hidroxilação de  $\alpha$ -heteroátomo no **C16**, **C18** e **C19** e probabilidade de glucuronidação na posição do **R1** (Figura 22).

Figura 22 - Prováveis sítios de interações fornecidos pela ferramenta SOMP para o composto 8.



Fonte: AUTOR (2021)

As ferramentas SmartCYP e SOMP possuem como foco apenas a fase de metabolização pelas enzimas microsossomais, mas conseguem prever quais são os sítios lábeis metabolicamente que estão presentes nas estruturas analisadas, tornando esse parâmetro um importante guia para otimização dos compostos estudados que apresentem propriedades indesejadas durante os testes *in vitro* (SILVA *et al.*, 2021).

Os compostos 2 a 8 de maneira geral apresentaram sítios bem semelhantes de metabolização que correspondem principalmente ao anel aromático A e a porção em que há a presença da amina e da amida ligadas ao anel B, porção esta semelhante a fração espermidina do substrato, ou seja, o metabolismo ativo nesta região não é o desejado, tornando-se necessário

a confirmação *in vivo* acerca deste comportamento do metabolismo, e se o mesmo acelera a inativação destes compostos.

As propriedades toxicológicas dos ligantes foram preditas através do software ProTox II. A precisão da predição para o perfil de toxicidade para compostos (tabela 5) variaram 67,38% a 68,07%, estes valores indicam que, para cada molécula analisada, houve uma precisão maior que 60% para cada via toxicológica predita, visto que valores entre 40-100% são considerados ideais de previsão (BNERJEE *et al.*, 2018).

Tabela 5 - Perfil toxicológico preditos pelo ProTox II para os compostos 2-8.

Com- postos	Parâmetros								
	LD <sub>50</sub>	Classe Toxi- cidade	Similaridade média	Precisão da predição	Hepato- toxicidade	Carcino- genicidade	Imuno- toxicidade	Muta- genicidade	Cito- toxicidade
2	310 mg/kg	IV	63,50%	68,07%	Inativo (Prob.: 0.84)	Inativo (Prob.: 0.63)	Ativo (Prob.: 0.89)	Inativo (Prob.: 0.67)	Inativo (Prob.: 0.67)
3	220 mg/kg	III	67,32%	68,07%	Inativo (Prob.: 0.84)	Inativo (Prob.: 0.62)	Ativo (Prob.: 0.70)	Inativo (Prob.: 0.68)	Inativo (Prob.: 0.68)
4	310 mg/kg	IV	62,88%	68,07%	Inativo (Prob.: 0.85)	Inativo (Prob.: 0.64)	Ativo (Prob.: 0.78)	Inativo (Prob.: 0.69)	Inativo (Prob.: 0.69)
5	310 mg/kg	IV	61,19%	68,07%	Inativo (Prob.: 0.87)	Inativo (Prob.: 0.61)	Ativo (Prob.: 0.96)	Inativo (Prob.: 0.62)	Inativo (Prob.: 0.51)
6	220 mg/kg	III	57,08%	67,38%	Inativo (Prob.: 0.71)	Inativo (Prob.: 0.65)	Ativo (Prob.: 0.96)	Inativo (Prob.: 0.78)	Inativo (Prob.: 0.53)
7	310 mg/kg	IV	62,85%	68,07%	Inativo (Prob.: 0.86)	Inativo (Prob.: 0.64)	Ativo (Prob.: 0.98)	Inativo (Prob.: 0.68)	Inativo (Prob.: 0.70)
8	310 mg/kg	IV	63,99%	68,07%	Inativo (Prob.: 0.84)	Inativo (Prob.: 0.66)	Ativo (Prob.: 0.95)	Inativo (Prob.: 0.71)	Inativo (Prob.: 0.68)

Legenda: Classes: I: fatal se ingerido, II: fatal se ingerido, III: tóxico se ingerido, IV: nocivo se ingerido, V: pode ser nocivo se ingerido e VI: não tóxico. Fonte: AUTOR (2022).

Além disso, a plataforma realiza uma classificação da classe de toxicidade de acordo com os valores de dose letal média (LD<sub>50</sub>), onde na classe I e II, são classificadas moléculas potencialmente fatais se ingeridas, na classe III estão as moléculas em que há possibilidade de serem tóxicas se ingeridas, classe IV são moléculas nocivas se ingeridas e na classe V estão as moléculas que podem ser prejudiciais se ingeridas e na classe VI são moléculas potencialmente atóxicas. Para a previsão de toxicidade, a plataforma conta com uma abordagem chamada de

sistemas especialistas, que considera o conhecimento desenvolvido em bancada sobre toxicidade aliada a modelos estatísticos, onde o modelo implementado no software são os algoritmos de aprendizagem de máquina (DWARL *et al.*, 2014; MARQUES, 2021).

Assim, a previsão de toxicidade, atua como uma ferramenta de alerta para os compostos que possuem alta probabilidade de serem tóxicos, porém, como sinalizado, a predição fornece um provável perfil que auxilia no direcionamento de futuros estudos *in vitro* e *in vivo*. Um exemplo é quando é feita a predição do composto benznidazol e se obtém o perfil IV de toxicidade, mas é amplamente utilizado na doença de Chagas. (PREISSNER, 2018; SEGALL; BARBERL, 2014; MARQUES, 2021).

Dentre os compostos analisados dois deles os compostos 3 e 6 foram classificados na classe III e os demais classificados como pertencentes a classe IV de toxicidade, servindo como um alerta tanto a classe quanto os valores prováveis de LD<sub>50</sub>, indicando que é necessária uma baixa dosagem para induzir a letalidade de 50% de uma população estudada. Outras características como a hepatotoxicidade, imunotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade e citotoxicidade também foram previstas.

O perfil de hepatotoxicidade e carcinogênico para as todas as moléculas indicam que nenhuma delas induz aos danos aqui avaliados, com probabilidade que variam entre 0.71 – 0.86 para hepatotoxicidade e 0.61 e 0.66 para carcinogenicidade, sendo que quanto mais próximo de 1 maior a probabilidade de não causar o dano avaliado.

Analisando a predição de imunotoxicidade indicam que todas as moléculas possuem a probabilidade de serem imunotóxicas variando apenas nos valores de probabilidade, sendo menores nos compostos 3 e 4 (0.70 e 0.78 respectivamente) e os demais acima de 0.90. E por fim para o perfil de mutagenicidade e citotoxicidade, todas indicam baixo poder de indução destes dois parâmetros analisados, probabilidade que variam entre 0.62 – 0.78 para mutagenicidade e 0.51 - 0.70 para citotoxicidade.

A toxicidade representa um grande desafio para pesquisadores no processo de descobrimento de novos candidatos à fármacos e a predição *in silico* de parâmetros importantes na toxicidade dos compostos auxiliam no processo de tomada de decisões e orienta no processo de redução deste nível, podendo realizar através de processos de modificação estrutural dos compostos a fim de reduzir seus níveis de toxicidade (SEGALL; BARBER, 2014; MARQUES, 2021).

A plataforma PreADMET fornece outros testes de relevante interesse entre eles testes de toxicidade que descrevem previsões sobre as capacidades mutagênica e carcinogênica de

certos compostos em função de sua estrutura molecular. Os resultados dos testes de toxicidade para os compostos do presente estudo são apresentados na Tabela 6. O teste de Ames avalia a capacidade de um fármaco em causar mutações no DNA (mutagenicidade) e tornou-se uma ferramenta importante no planejamento de fármacos, em estudos sobre agrotóxicos, desenvolvimento de cosméticos e amostras de produtos encontrados no meio ambiente. A capacidade da molécula em causar carcinomas em ratos e camundongos (carcinogenicidade) também foi avaliada (SEGALL; BARBER, 2014; RIM, 2020; SMITH *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2022).

Com exceção dos compostos 6 e 7 de acordo com a predição eles demonstraram capacidade mutagênica, de acordo com o teste de Ames. Apenas os compostos 7 e 8 não apresentaram atividades carcinogênicas em ratos e camundongos, os demais compostos apresentaram atividades carcinogênicas somente em camundongos apresentando resultado positivo.

Tabela 6 - Resultados dos testes de toxicidade fornecido pelo PreADMET.

Compostos	Parâmetros de toxicidade			
	Ames teste	Carcinogênico em ratos	Carcinogênico em camundongos	Inibição hErg
<b>Composto 2</b>	mutagênico	não carcinogênico	carcinogênico	risco médio
<b>Composto 3</b>	mutagênico	não carcinogênico	carcinogênico	risco médio
<b>Composto 4</b>	mutagênico	não carcinogênico	carcinogênico	risco médio
<b>Composto 5</b>	não mutagênico	não carcinogênico	carcinogênico	risco médio
<b>Composto 6</b>	mutagênico	não carcinogênico	carcinogênico	risco alto
<b>Composto 7</b>	não mutagênico	não carcinogênico	não carcinogênico	risco médio
<b>Composto 8</b>	mutagênico	não carcinogênico	não carcinogênico	risco médio

Fonte: AUTOR (2022)

A causa mais frequente de efeitos adversos cardíacos na utilização de determinados fármacos é o bloqueio do canal do gene humano relacionado ao *ether-a-go-go potassium channel* (hERG), é um canal K<sup>+</sup> (Kv) dependente de voltagem, crítico para função nervosa e cardíaca, desempenha um importante papel na repolarização do potencial de ação cardíaco e sua inibição pode causar a síndrome de QT, um efeito colateral que leva à taquicardia (ZHANG *et al.*, 2004; ASAI *et al.*, 2021; DANKER; MÖLLER, 2014 SOUZA *et al.*, 2022). Entre os compostos estudados apenas o composto 6 demonstrou nível alto de inibição de hERG os demais risco moderado, e por isso, devido a doença de Chagas ter como principal alvo a

musculatura cardíaca, o ideal seria o medicamento não possuir interações com hERG alterando o potencial cardíaco.

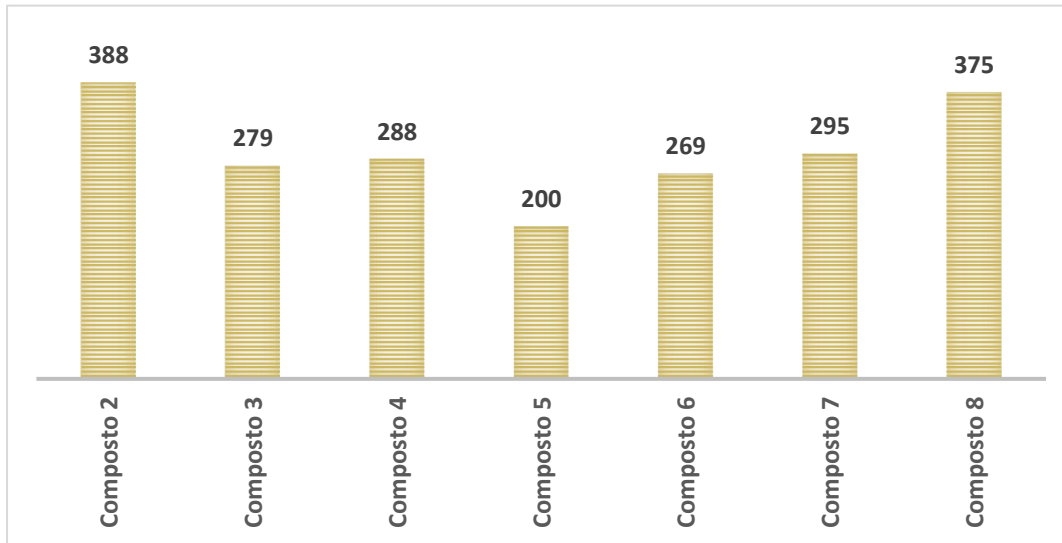
Entre as ferramentas *in silico* utilizada para prever efeitos farmacológicos de metabólitos secundários, é a plataforma “*Prediction of Activity Spectra for Substances*” ou Previsão de Espectros de Atividade para Substâncias (PASS) ferramenta que prevê a Probabilidade de Atividade (Pa) e Probabilidade de Inatividade (Pi) de uma molécula possuir uma determinada propriedade. A capacidade do composto alvo de estudo em exibir uma determinada propriedade experimentalmente é classificada como muito provável (quando  $Pa > 0,7$ ), provável (quando  $0,5 > Pa > 0,7$ ) e improvável (quando  $Pa < 0,5$ ). (GOEL *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2022). Os resultados avaliados via PASS Online sobre os análogos do presente estudo são mostrados na Tabela 7.

O PASS possibilita prever diversos efeitos farmacológicos, mecanismos de ação e toxicidade específica com base na estrutura da substância com alta reprodutibilidade, já validado por testes *in vitro* e *in vivo*, esta comparação ocorre através da estrutura química com compostos biologicamente ativos disponíveis em bancos de dados que incluem fármacos, candidatos a fármacos, compostos em processos de registro, substâncias comprovadamente tóxicas, dentre outros, em um total de aproximadamente de 260.000 descritores. (GOEL *et al.*, 2010; AMPARO, 2016).

Utilizando a ferramenta PASSonline, foi possível identificar diferentes atividades biológicas relacionadas aos compostos estudados. O número de alvos indicados pelo PASSonline, com valores de  $Pa-Pi > 0$  foram apresentados para cada derivado análogo biossístico do composto 1 estudado (Figura 23).

A utilização da plataforma PASSonline teve como objetivo identificar potenciais atividades biológicas dentre as 3500 atividades avaliadas pela ferramenta. Foram listados como relevantes os alvos com valores de  $Pa-Pi$  superiores a 0,4. Em seguida, foram identificadas as 15 potenciais atividades biológicas que se relacionam entre os compostos (Tabela 7). As principais atividades biológicas encontradas foram a antiviral, atuando como inibidor de fatores diretamente relacionado a tumores como STAT e STAT3, citoprotetor e antibacteriano sendo indicadas para a grande maioria dos compostos estudados, pelo PASSonline.

Figura 23 - Número de alvos indicados pelo PASSonline para cada composto do estudo.



Fonte: AUTOR (2022)

A grande maioria das potenciais atividades biológicas relatadas na Tabela 7, referem-se aos efeitos do fator de transcrição da família STAT (STAT1 e STAT3) elas possuem efeitos contrários, a STAT1 é um supressor de tumor e o STAT3 são oncogenes que são ativados através de citocinas e fatores de crescimento e na presente avaliação os compostos podem suprimir esses dois fatores de transcrição conjuntamente (ZHANG *et al.*, 2019). Todos os compostos propostos também apresentaram função de aumento na expressão de 3-hidroximetilglutaril-CoA sintase 2 (HMGCS2) que é a principal enzima limitante da velocidade da cetogênese, quadro muito comum em diabéticos (PUCHALSKA; CRAWFORD, 2017).

Outras funções importantes também destacadas são: as funções celulares citoprotetoras, anti-hipóxia, alterações no mecanismo de degradação de proteínas não funcionais através da proteossoma ATPase e ação sobre os canais de cálcio sensíveis a voltagem; as funções anti virais com destaque para probabilidade de atuação na replicação do HIV e efeito também na Influenza um dos principais vírus envolvido nas síndromes gripais; atuação contra micobactéria com ação anti-tuberculose.

Tabela 7 - Potenciais atividades biológicas identificadas, pelo PASSonline para cada composto.

Atividades biológicas - PASSonline	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
	Pa	Pa	Pa	Pa	Pa	Pa	Pa
<b>Inibidor do fator de transcrição STAT3</b>	0,631	0,613	0,641	0,485	0,658	0,648	0,603
<b>Intensificador de expressão HMGCS2</b>	0,626	0,656	0,576	0,545	0,682	0,562	0,580
<b>Inibidor do fator de transcrição STAT</b>	0,572	0,551	0,577	0,428	0,585	0,574	0,551
<b>Inibidor de amidase micotiol S-conjugada</b>	0,513	0,439	0,462	0,418	0,428	0,491	0,504
<b>Anti hipóxico</b>	0,502	0,426	0,478	0,449	0,563	0,409	0,491
<b>Inibidor de proteassoma ATPase</b>	0,519	0,428	0,480	0,430	0,401	0,428	0,529
<b>Citoprotetor</b>	0,573	n	0,554	n	n	0,579	0,609
<b>Antagonista do Neuropeptídeo Y2</b>	0,511	0,586	0,526	n	n	0,510	0,436
<b>Inibidor de calpaína</b>	0,409	0,413	0,401	n	0,463	0,401	n
<b>Inibidor de fixação do HIV</b>	0,438	0,401	n	n	0,400	n	n
<b>Inibidor de pepsina de <i>Rhodotorula</i> spp.</b>	0,510	n	0,400	n	0,617	0,424	0,401
<b>Antiviral (Influenza)</b>	0,444	n	n	0,400	0,456	0,410	0,474
<b>Anti-tuberculose</b>	0,400	n	n	n	0,515	n	0,419
<b>Ativador do canal de cálcio (sensível à voltagem)</b>	0,453	0,491	0,419	n	n	n	0,454
<b>Anti micobacteria</b>	n	n	n	n	0,511	0,400	0,410

Legenda: n – valores de Pa < Pi; C2 – Composto 2; C3 – Composto 3; C4 – Composto 4; C5 – Composto 5; C6 – Composto 6; C7 – Composto 7; C8 – Composto 8. Fonte: AUTOR (2022)

E por fim outra função a ser destacada é atuação no neuropeptídeo Y2, O NPY é um neuropeptídeo distribuído heterogeneamente e desencadeia seus efeitos fisiológicos e bioquímicos por uma ação em seis subtipos diferentes de receptores (Y1-Y6). O NPY estimula a ingestão de alimentos, inibe o gasto energético e aumenta o peso corporal pela ativação dos receptores Y1 e Y5 no hipotálamo, gerando estudos que tentaram desenvolver ligantes de receptores de neuropeptídeos Y2, Y4 e Y5 como potenciais agentes anti-obesidade (DOURISH *et al.*, 2008; MITTAPALLI; ROBERTS, 2014).

Considerando que o presente estudo tem como intenção a avaliação da atividade antiprotozoário dos compostos, principalmente frente a organismos como tripanossoma, leishmania, plasmódio e ameba. A ferramenta PASSonline também apontou apesar da menor probabilidade um potencial de atividade antiprotozoário para a maioria dos compostos

estudados principalmente frente à tripanossoma e plasmódio, o composto 6 foi o composto que mostrou probabilidade de atividade em diversos protozoários (Tabela 8).

Tabela 8 - Predição de atividades antiparasitárias fornecidas pelo PASSOnline dos compostos 2 - 8.

Atividades anti parasitárias - PASSonline	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
	Pa	Pa	Pa	Pa	Pa	Pa	Pa
Anti protozoário (em geral)	0,165	0,186	n	n	0,234	0,175	0,174
Anti protozoario (Plasmodium)	0,2	0,241	0,177	0,198	0,181	0,218	0,198
Anti protozoario (Toxoplasma)	0,156	0,165	0,176	0,156	n	0,205	0,163
Anti protozoario (Trypanosoma)	0,301	0,231	0,223	0,23	0,401	0,271	0,319
Anti protozoario (Amoeba)	0,244	0,245	0,231	0,239	0,302	n	0,242
Anti protozoario (Coccidial)	n	n	n	n	0,243	n	n
Anti protozoario (Trichomonas)	n	n	n	n	0,204	n	n

Legenda: n – valores de Pa < Pi; C2 – Composto 2; C3 – Composto 3; C4 – Composto 4; C5 – Composto 5; C6 – Composto 6; C7 – Composto 7; C8 – Composto 8. Fonte: AUTOR (2022)

### 5.2.3 Docking molecular

No estudo de *docking molecular* torna-se necessário a execução de uma etapa inicial de validação, que determina os parâmetros que serão empregados no software utilizado para os estudos. A etapa validação do método é realizada utilizando a mesma estrutura presente no complexo cristalográfico, e, esta etapa é também comumente chamada de *re-docking* (reancoramento). Para validação, foram construídas as estruturas planar e tridimensional do composto bis(gama-glutamil-cisteinil-glicinil)espermidina cristalografado junto a enzima, e a estrutura construída para análise foi submetida ao processo de *docking molecular*, onde os parâmetros do software GOLD foram testados e modificados a fim de obter um RMSD menor de 2Å que é indicado na literatura como um valor ideal para os estudos de docagem (VERDONK *et al.*, 2003).

Os estudos de validação foram feitos no software GOLD, utilizando as mesmas variáveis do trabalho anterior de Zimmermann (2018): tamanho do GRID (corresponde ao espaço de interação permitido entre o ligante e o composto alvo), GA runs (Genetic

algorithms runs - determina o número de poses que serão criadas) e a função score. A partir do GRID definido de 9Å foi determinado quatro números de GA runs para validação



mantendo a mesma função score CHEMPLP. O Quadro 4 apresenta os resultados de RMSD obtidos nessa etapa de validação.

Quadro 4 - Resultados obtidos na etapa de validação do processo de docagem. Ligante: composto bis(gamma-glutamil-cisteinil-glicinil)espermidina.

GRID	GA RUNS	SCORING FUNCTION	RMSD
9 Å	10	CHEMPLP	1,13
9 Å	20	CHEMPLP	1,34
9 Å	100	CHEMPLP	1,09
9 Å	400	CHEMPLP	0,95

Fonte: AUTOR (2021)

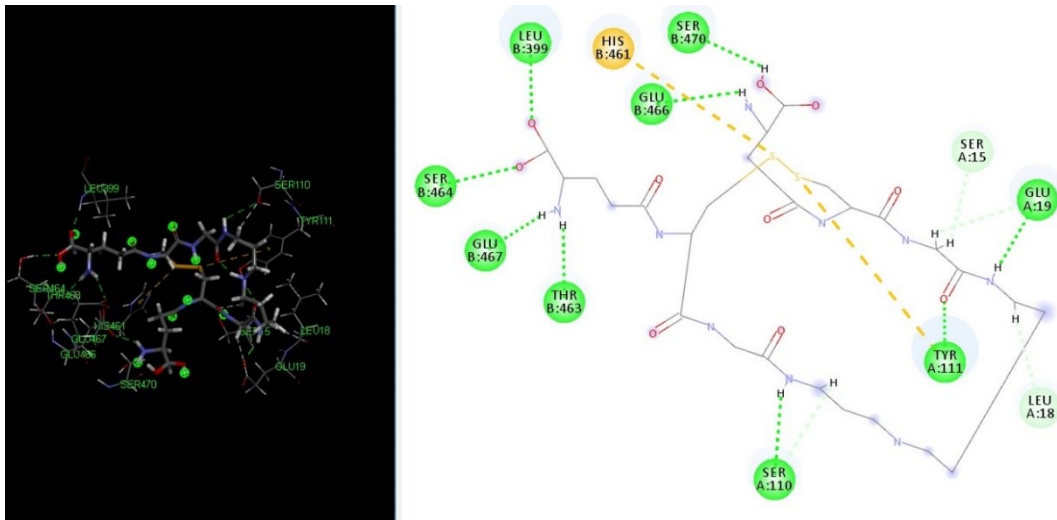
A estrutura cristalográfica obtida no PDB (1BZL) possui o substrato bis(gamma-glutamil-cisteinil-glicinil)espermidina. Essa molécula interage com os seguintes resíduos de aminoácidos: Ser15A, Leu18A, Trp22A, Val54A, Val59A, Lys62A, Tyr111A, Met114A, Phe396A, Leu399B, His461B, Pro462B, Thr463B, Ser464B, Glu466B, Glu467B (BOND *et al.*, 1999). No processo de validação do *docking*, o composto desenhado apresentou praticamente as mesmas interações encontradas no substrato bis-espermidina cristalografado na estrutura. Apenas os resíduos Val54A, Val59A não apresentaram interação no processo de *re-docking*, e os resíduos Ser110A e Ser470B mostraram interação no processo de validação e não apresentam interação na estrutura obtida no PDB (Figura 24). Juntamente com o RMSD de 0,9511, sendo assim as interações encontradas foram utilizadas para validação do método.

Após a etapa de validação do *docking* e definição dos parâmetros mais adequados a serem utilizados, foi realizado então o *docking* dos compostos 2-8. Os 7 compostos foram submetidos ao processo no software GOLD, utilizando os seguintes parâmetros: GRID 9Å, GA runs de 400 e *Scoring Function* CHEMPLP.

O PLP e ChemPLP são funções de pontuação empíricas otimizadas para uma predição de melhor posicionamento da molécula na interação com seu alvo, estas posições geradas no cálculo das pontuações também são conhecidas como poses. O ChemPLP é a função de pontuação padrão no GOLD 5.2, ele utiliza para modelagem as interações de hidrogênio, interações de van der Waals e os potenciais de repulsão, e a partir destes potenciais modelar a complementaridade estérica entre a proteína e o ligante (SAPUNDZHI *et al.*, 2019). Cada pose gerada na análise gerou seu respectivo score de pontuação, e os dados no Quadro 5 apresentam

os melhores scores gerados nas poses de cada composto analisado durante o processo de docagem.

Figura 24 - Interações entre os resíduos de aminoácidos do receptor tripanotona redutase com o modelo de bis(gamma-glutamil-cisteinil-glicinil)espermidina construído para a validação da docagem.



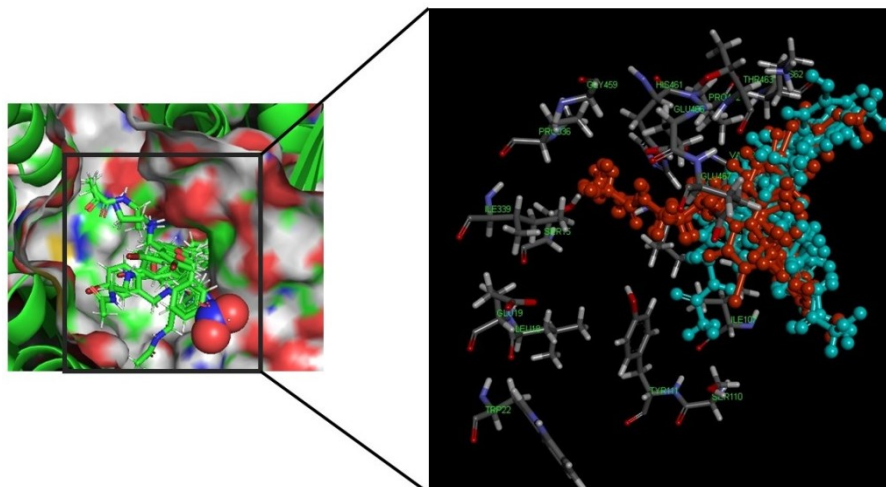
Fonte: AUTOR (2021)

Quadro 5 - Ranking de melhores scores de cada derivado biossintético obtidos no estudo de docagem molecular pelo software GOLD.

<u>Derivados Composto 1</u>	
<u>Compostos</u>	<u>SCORE</u>
<i>Composto 2</i>	72.30
<i>Composto 3</i>	69.64
<i>Composto 4</i>	69.37
<i>Composto 5</i>	73.45
<i>Composto 6</i>	66.90
<i>Composto 7</i>	73.41
<i>Composto 8</i>	69.44

Fonte: AUTOR (2021)

Figura 25 -. Disposição dos análogos biossintéticos no sítio ativo da tripanotona redutase.

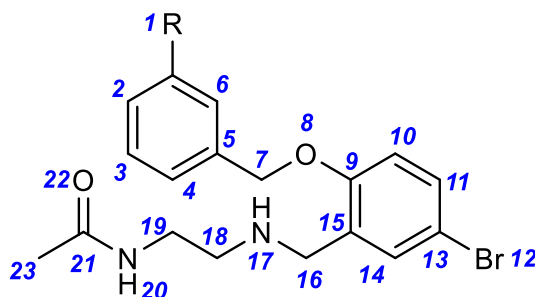


Legenda: vermelho (Compostos: 3, 6 e 7) e Azul (Compostos: 2, 4, 5 e 8). Fonte: AUTOR (2021)

Os compostos 3, 6 e 7 apresentaram perfis de interações semelhantes pois ambos apresentaram interações de hidrogênio com os aminoácidos Glu467B e Glu466B que estão na mesma região do sítio ativo (Figura 25). Já os demais com os substituintes -Br, -CH<sub>3</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e -OH (2,4,5 e 8 respectivamente) apresentaram-se de maneira diferente no sítio ativo fazendo interações de van der Waals com os resíduos Val59A, Leu399B, Met400B, His461B (Tabela 9).

Os sete derivados foram analisados de forma individual, tendo suas interações comparadas com as obtidas no *re-docking* e com o sítio ativo do receptor. Foram analisadas as interações de todos os compostos seguindo a ordem dos átomos (Figura 26).

Figura 26 - Posições dos átomos para análise dos resultados das interações obtidas através do *docking molecular* e das reações de metabolismo



Fonte: AUTOR (2021)

Tabela 9 - Principais interações encontradas para os derivados ancorados na TR.

Molécula	Aminoácido	Átomo do ligante	Categoria	Tipo	Distância (Å)	Score
Composto 2	TYR111A	O22	Interação de Hidrogênio	Interação de Hidrogênio convencional	1,86	72.30
	THR463	H7		Interação de Hidrogênio	2,64	
	LYS62A	Anel A		Interação Carbono Hidrogênio	3,19	
	MET400B	Anel A	Hidrofóbica	Pi-enxofre	5,91	
	LYS62A	Br1		Alquil	4,01	
	LEU399B	Br1		Alquil	4,27	
	MET400B	Br1		Alquil	4,58	
	PRO398B	Anel A	Hidrofóbica	Pi-Alquil	5,33	
	LEU399B	Anel A			4,72	
	LEU399B	Anel B			4,53	
VAL54A VAL59A LEU63A THR66A ILE107A SER110A PHE396B THR397B HIS461B PRO462B THR463B SER464B	Ligante		Van Der Waals	-		
Composto 3	GLU467B	H17	Interação de Hidrogênio	Interação de Hidrogênio convencional	2,19	69.64
	GLU466B	H17		Interação de Hidrogênio convencional	1,84	
	GLU466B	H20		Interação de Hidrogênio convencional	1,99	
	GLU467B	H19		Interação Carbono Hidrogênio	2,68	
	THR463B	Anel B	Hidrofóbica	Pi-amida	4,27	
	LEU399B	Anel B		Alquil	5,37	
	LY62A THR335A PRO336A ILE339A PHE396B THR397B PRO398B LYS402B HIS461B PRO462B SER464B	Ligante			Van der Waals	

Continua

<b>Continuação</b>							
<b>Molécula</b>	<b>Aminoácido</b>	<b>Átomo do ligante</b>	<b>Categoria</b>	<b>Tipo</b>	<b>Distância (Å)</b>	<b>Score</b>	
<b>Composto 4</b>	LEU399B	O8	Interação de Hidrogênio	Interação de Hidrogênio convencional	2,21	69.37	
	THR397B	H17			1,95		
	PRO398B	O8			2,65		
	THR463B	H17		Interação Carbono Hidrogênio	2,90		
	MET400B	Anel B		3,07			
	LEU399B	Anel B		Pi-sigma	2,73		
	MET400B	Anel A		Pi-enxofre	5,41		
	VAL59A	Br12		4,34			
	LEU399B	Br12		Alquil	4,91		
	PRO398B	C1		4,63			
	MET400B	C1		3,91			
	HIS461B	Br12		Hidrofóbica	Pi-Alquil		5,21
	PRO398B	Anel A					5,07
	LEU399B	Anel A					5,05
	LYS62A ALA103A ASN106A ILE107A PHE396B HIS401B LYS402B ASP432B PRO462B SER464B	Ligante					-
<b>Composto 5</b>	THR397B	H20	Interação de Hidrogênio	Interação de Hidrogênio Convencional	1,99	73.45	
	THR397B	H18			Interação Carbono Hidrogênio		2,51
	LEU399B	Anel A			2,68		
	VAL54A	Br12		4,23			
	VAL59A	Br12		4,77			
	ILE107	Br12		3,91			
	PRO398	C1		4,64			
	MET400B	C1		Hidrofóbica	Alquil		4,30
	LYS62A	C1'		4,39			
	LEU399B	C1'		4,13			
	MET400B	C1'		5,15			

**Continua**

						<b>Continuação</b>
	PRO398B	Anel A				5,25
	LEU399B	Anel A			Pi-Alquil	4,84
	VAL59A	Anel B				4,65
	LEU399B	Anel B				4,91
	THR66A TYR111A PHE396B HIS401B LYS402B HIS461B PRO462B THR463B SER464B GLU466B GLU467B	Ligante			Van der Waals	-
<b>Molécula</b>	<b>Aminoácido</b>	<b>Átomo do ligante</b>	<b>Categoria</b>	<b>Tipo</b>	<b>Distância (Å)</b>	<b>Score</b>
<b>Composto 6</b>	THR397B	O1				2,01
	LYS402B	O1'		Interação de		2,04
	GLU467B	H17		Hidrogênio		1,95
	GLU466B	H17		Convencional		2,07
	GLU466B	H20				2,05
	PHE396B	O1'		Interação Carbono		2,90
	GLU467B	H18		Hidrogênio		2,98
	LEU399B	Anel B		Pi-Alquil		5,11
	PRO462B	Br12		Alquil		4,84
	LEU399B	Br12	Hidrofóbica	Pi-Alquil		4,87
	LYS62A THR335A PRO336A ILE339A PRO398B THR463B SER464B SER470B	Ligante			Van der Walls	-
<b>Composto 7</b>	GLU467B	H17		Interação de		1,95
	GLU466B	H20		Hidrogênio		2,11
	GLU466B	H17		Convencional		1,98
	GLU467B	H18		Interação Carbono		3,03
	LEU399B	Anel A		Hidrogênio		2,96
	THR463B	Anel A		Pi-Amida		4,50
	PRO398B	C1		Alquil		4,21
	MET400B	C1				4,61
	LEU399B	Anel A	Hidrofóbica			4,51
		LYS62A THR335A PRO336A ILE339A PHE396B THR397B HIS461B PRO462B SER464B SER470B	Ligante			Van der Walls
						<b>Continua</b>

Continuação						
Molécula	Aminoácido	Átomo do ligante	Categoria	Tipo	Distância (Å)	Score
	LEU399B	O7			2,71	
	SER464B	O1	Interação de Hidrogênio	Interação de Hidrogênio	1,85	69,44
	THR397B	H17			1,75	
	GLU436B	H1		Convencional	1,94	
	THR397B	H20			1,97	
	MET400B	Anel A			Pi-enxofre	
<b>Composto 8</b>	HIS461B	Br12		Alquil	5,43	
	LEU399B	Anel B	Hidrofóbica			4,72
	VAL59A LYS62A					
	PHE396B PRO398B					
	LYS402B PRO462B					
	THR463B	Ligante		Van der Waals		

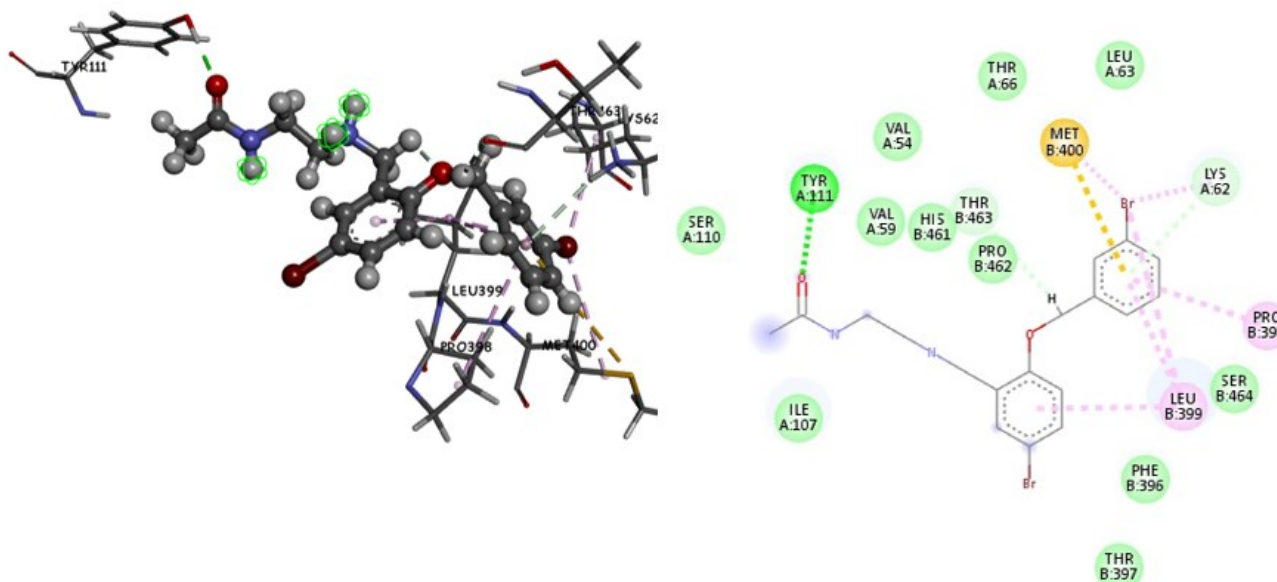
Fonte: AUTOR (2021)

**Composto 2:** este derivado faz interações com 4 aminoácidos do sítio ativo da enzima, o oxigênio da amida (posição 22) faz interação de hidrogênio com a Tyr111 em uma distância de 1,86 Å, este tipo de interação apresenta tipicamente a distância entre 1,7 e 2,4Å (FOKOUÉ *et al.*, 2020; BAKER; HUBBARD, 1984). O anel A faz uma interação de hidrogênio com a Lys62A a uma distância de 3,19 Å, esta interação é denotada como ligações de carbono hidrogênio (também chamada ligação de hidrogênio- $\pi$  ou ligação alquila-arila), que ocorre quando uma ligação C-H de um grupo alquila é polarizada na presença de um anel com sistema  $\pi$ , é uma interação do tipo dipolo-dipolo induzido fraca, e geralmente o grupo C-H está perpendicular ao sistema  $\pi$  (FOKOUÉ *et al.*, 2020). Este tipo de interação não é comumente reportado na literatura, porém alguns estudos têm ilustrado que mesmo o carbono sendo relativamente menos eletronegativo que o oxigênio e o nitrogênio por exemplo, estes átomos de carbono são capazes de formar interações de hidrogênio fracas (HOROWITZ *et al.*, 2012; STEINER *et al.*, 1998).

O carbono da posição 7 faz outra interação de hidrogênio- $\pi$  com a Thr463B a uma distância de 2,67 Å. Adicionais a essas interações com os aminoácidos do sítio ativo, há com outros aminoácidos da enzima, anel A faz interações de hidrogênio- $\pi$  com os aminoácidos Lys62A, o bromo ocupa uma cavidade formada por aminoácidos apolares e é capaz de realizar interações hidrofóbicas com os resíduos destes aminoácidos da cavidade, neste estudo ele

apresentou interações deste tipo com a Pro398B, Leu399B e Met400B. E por fim o anel A faz interação do tipo  $\pi$ -enxofre com o aminoácido Met400B (Figura 27).

Figura 27 - Interações obtidas no processo de *docking* com o composto 2.



Fonte: AUTOR (2021)

Outras interações importantes de nota são as de van der Waals, são forças residuais atrativas ou repulsivas entre átomos que não estão ligados por ligações covalentes ou através forças eletrostáticas entre íons ou entre íons e espécies neutras (FOKOUÉ *et al.*, 2020; IUPAC, 2019). O composto 1 apresentou este tipo de interação com os seguintes resíduos de aminoácidos: Val 54A, Val59A, Leu63A, Thr66A, Ile107A, Ser110A, Phe396B, Thr397B His461B, Pro462B, Thr463B, Ser464B, dentre estes resíduos nove estes presentes no sítio ativo (BOND *et al.*, 1999).

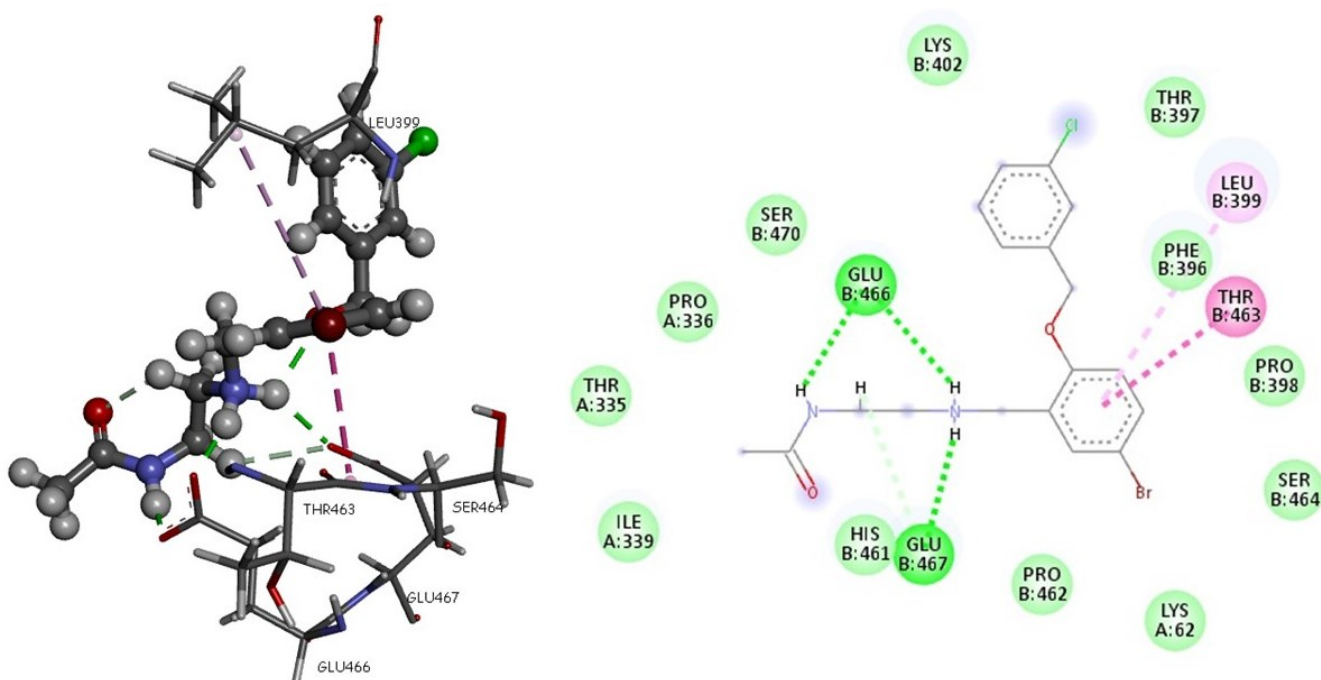
**Composto 3:** este derivado faz interações com apenas 3 aminoácidos do sítio ativo da enzima, mas com interações consideradas relevantes, principalmente de hidrogênio semelhantes a encontrada no substrato utilizado no *re-docking*. A amina secundária (posição 17) faz interações de hidrogênio com a Glu466B a uma distância de 1,85 Å e com a Glu467B a uma distância de 2,19 Å, esta porção da estrutura apresenta grupamentos funcionais semelhantes a bis glutationil espermidina presente no substrato enzimático.

O nitrogênio da amida (posição 20) faz outra interação com a Glu466B a uma distância de 2,00 Å e o carbono anterior a amida (posição 19) também faz interação de hidrogênio- $\pi$  com



a Glu467B a uma distância de 2,48 Å. O anel B faz interações de hidrogênio- $\pi$  com a Leu399B e hidrofóbicas com a Thr463B aminoácido presente no sítio ativo e com a Leu399B único resíduo não pertencente ao sítio de atividade (Figura 28).

Figura 28 - Interações obtidas no processo de *docking* com o composto 3.



Fonte: AUTOR (2021)

As interações de van der Waals ocorreram com os resíduos Ly62A, Thr335A, Pro336A, Thr335A, Ile339A, Phe396B, Thr397B, Pro398B, Lys402B, His461B, Pro462B, Ser464B entre eles cinco pertencentes ao sítio ativo.

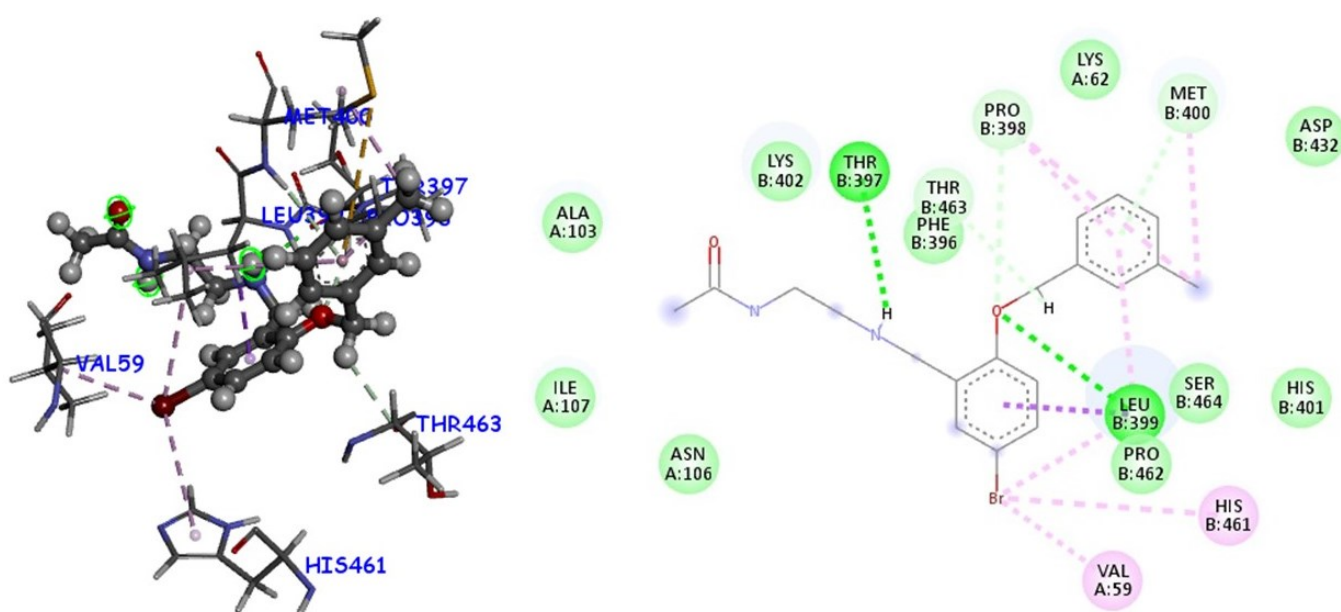
**Composto 4:** este derivado faz interações com 3 aminoácidos do sítio ativo da enzima, o carbono da posição 7 faz interação de hidrogênio- $\pi$  com a Thr463B (resíduo do sítio ativo) a uma distância de 2,90 Å, o oxigênio da ligação éter (posição 8) faz interação de hidrogênio com os resíduos Leu399B e hidrogênio- $\pi$  com a Pro398B (2,21 Å e 2,61 Å respectivamente) porém estes não fazem parte do sítio ativo. A amina secundária (posição 17) também faz uma interação de hidrogênio, mas com o resíduo Thr397B a uma distância de 1,96 Å.

Os aminoácidos mais apolares tendem a formar cavidades e fazerem interações hidrofóbicas, e o anel A interage através de interações hidrofóbicas com a Leu399B e de interação de hidrogênio- $\pi$  com a Met400B esta interação à uma distância de 3,07 Å. A metila

do anel A (posição 1) faz interações hidrofóbicas com os resíduos Pro398B e Met400B, e o bromo do anel B (posição 12) faz interações hidrofóbicas com a Val59A e a Leu399B a distâncias que variam de 2,80 – 4,90 Å (Figura 29).

As interações de van der Waals ocorreram com os resíduos Lys62A, Ala103A, Asn106A, Ile107A, Phe396B, His401B, Lys402B, Asp432B, Pro462B, Ser464B três deles pertencentes ao sítio ativo.

Figura 29 - Interações obtidas no processo de *docking* com o composto 4.



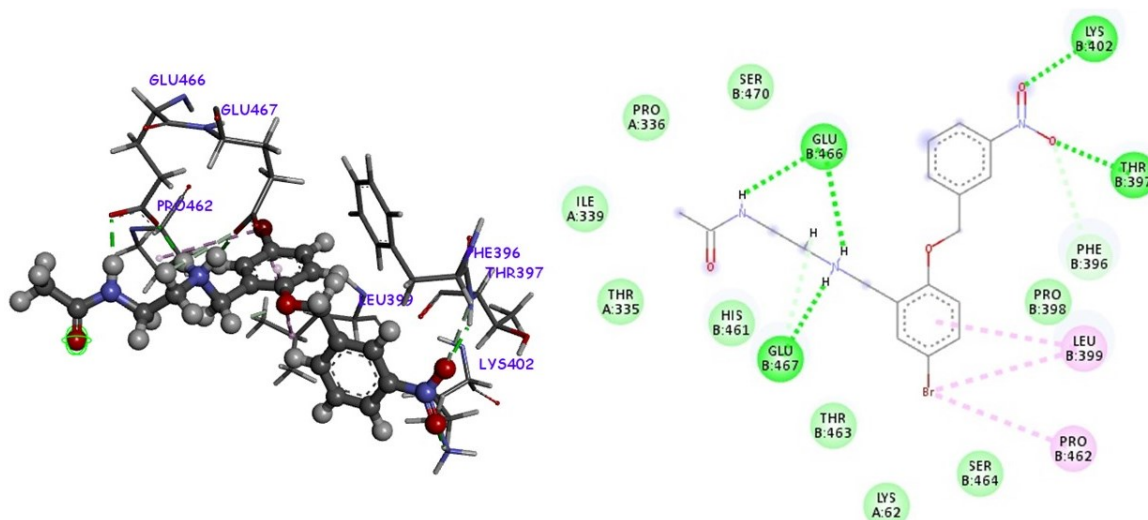
Fonte: AUTOR (2021)

**Composto 5:** este derivado faz interações com 4 aminoácidos do sítio ativo da enzima, estas interações são principalmente interações hidrofóbicas, as metilas da amina (posição 1) fazem interações com a Lys62A pertencente ao sítio ativo, e adicionalmente com Pro398B, Leu399B e Met400B que não são pertencentes ao sítio ativo com distâncias que variam 4,13 – 5,24 Å, o anel A faz interação hidrofóbica com a Pro398B e o anel B com a Val59A (este último pertencente ao sítio ativo) e a Leu399B. O átomo de bromo do anel B faz interações hidrofóbicas com Val54A, Val59A e Ile107A (ambas pertencente ao sítio ativo).

A metila e a amida (posições 19 e 20) fazem interações de hidrogênio com a Thr397B do sítio ativo e a Leu399A (não pertence ao sítio de atividade) faz interação de hidrogênio- $\pi$  com os carbonos do anel A (Figura 30). E por fim as interações de van der Waals ocorrem com os resíduos Thr66A, Tyr111A, Phe396B, His401B, Lys402B, His461B, Pro462B, Thr463B, Ser464B, Glu466B, Glu467B sete deles pertencentes ao sítio ativo.



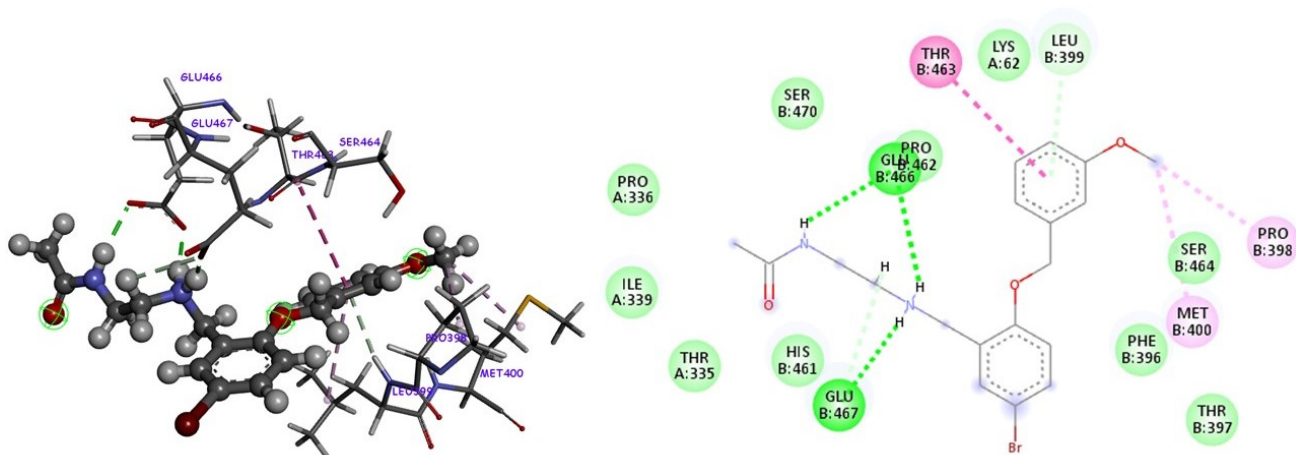
Figura 31 - Interações obtidas no processo de *docking* com o composto 6.



Fonte: AUTOR (2021)

**Composto 7:** este derivado faz interações com 4 aminoácidos do sítio ativo da enzima, com perfil semelhante a encontrada no *docking* do derivado cloro e nitro (Compostos 2 e 6 respectivamente), a amina secundária (posição 17) faz interações de hidrogênio com a Glu466B e Glu467B nas distâncias de 1,98 Å e 1,95 Å respectivamente, o nitrogênio da amida (posição 20) faz interação e hidrogênio com a Glu466B a uma distância de 2,10 Å. A Leu399A também apresenta interação de hidrogênio- $\pi$  com o Anel A.

Figura 32 - Interações obtidas no processo de *docking* com o composto 7.

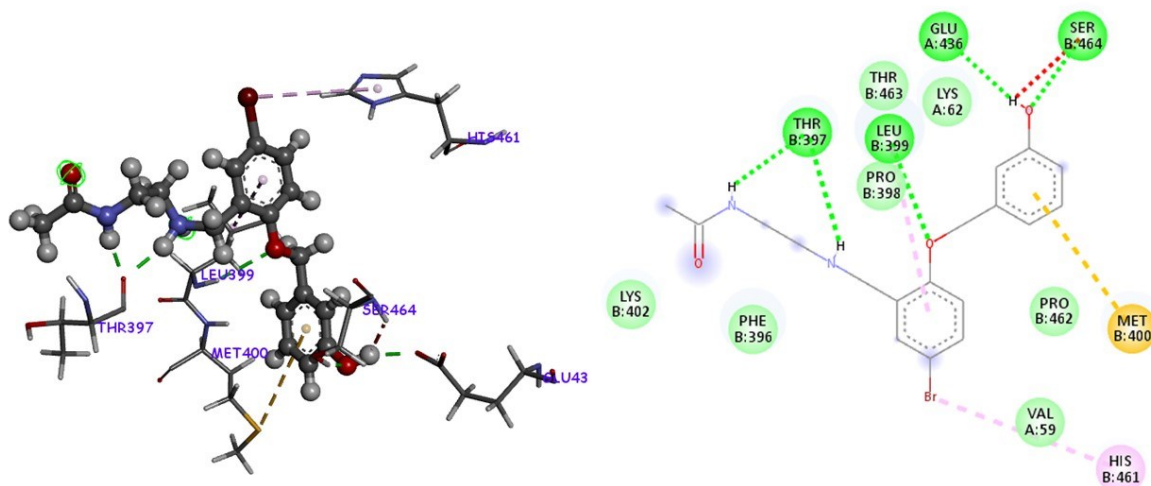


Fonte: AUTOR (2021)

O anel A adicionalmente faz interação do tipo  $\pi$  amida com a Thr463B (pertencente ao sítio ativo), interações hidrofóbicas com a Pro398B e Met400B estas duas não pertencentes ao sítio de atividade e, de van der Waals com os resíduos Lys62A, Thr335A, Pro336A, Ile339A, Phe396B, Thr397B, His461B, Pro462B, Ser464B, Ser470B cinco deles pertencentes ao sítio ativo enzimático (Figura 32).

**Composto 8:** este derivado faz interações com apenas 1 aminoácido do sítio ativo, com a His461B através de uma interação hidrofóbica com o bromo do anel B. As demais interações são com aminoácidos não pertencentes ao sítio ativo, são do tipo  $\pi$  com a Met400B e do tipo  $\pi$ -amida com a Ser464B.

Figura 33 - Interações obtidas no processo de *docking* com o composto 8.



Fonte: AUTOR (2021)

O oxigênio da hidroxila (posição 1) faz interações de hidrogênio com Glu436B e Ser464B, o oxigênio da ligação éter (posição 8) também faz interação de hidrogênio com Leu399B, o nitrogênio da amida (posição 20) e da amina secundária (posição 17) fazem interações de hidrogênio com a Thr397B (Figura 33). E por fim as interações de van der Waals ocorrem entre o composto e os resíduos Val59A, Lys62A, Phe396B, Pro398B, Lys402B, Pro462B, Thr463B quatro deles pertencentes ao sítio ativo enzimático.

No trabalho anterior de Zimmermann, 2018 o composto 1 teve como substituinte no anel A um átomo de flúor, e obteve como resultado de *docking*, os resultados considerados mais relevantes foram: interações de forma hidrofóbica com os aminoácidos Ile107A e Leu399B e através de uma interação de hidrogênio entre a carbonila da amida e o aminoácido Tyr111A a

2,65 Å, se assemelhando em algumas interações encontradas no presente trabalho, principalmente no que corresponde as interações de característica hidrofóbicas.

Analisando os resultados obtidos no *docking* os compostos 3, 6 e 7 foram os que apresentaram além das interações mais interessantes no sítio ativo o melhor posicionamento dentro do sítio de atividade do possível alvo, e, as poses obtidas mostraram que eles se encaixam melhores no sítio ativo de maneira a proporcionar melhores interações com os aminoácidos do sítio ativo. Os substituintes destes compostos são eletronegativos o que pode explicar a conformação obtida no *docking*, já que essa semelhança eletrônica também pode obter um efeito estérico similar nessas moléculas (WERMUTH, 2015). A única exceção no presente estudo foi do composto 2 que apesar de ser eletronegativo teve sua conformação semelhante as outras estruturas com efeitos eletrônicos distintos aos seus.

## 6 CONCLUSÃO

- Foram planejados 7 compostos derivados do composto 1.
- Através da junção de diversas técnicas computacionais *in silico* os compostos foram analisados quanto as suas características de biodisponibilidade, metabolismo e toxicidade e apresentaram características promissoras quanto a biodisponibilidade, mas de alerta quanto a toxicidade e metabolismo, sendo necessária a confirmação *in vitro* e *in vivo* dos parâmetros críticos obtidos.
- Por meio de estudos de *docking molecular*, foi possível propor uma hipótese de interação entre esses derivados amidas e o sítio ativo da enzima, a qual parece envolver duas regiões estruturais destes derivados no sítio ativo da enzima;
- A validação do estudo de docking utilizando a estrutura cristalográfica disponibilizada no banco de dados PDB (Protein Data Bank) – 1BZL e o substrato co-cristalizado elaborado para os estudos *in silico* apresentou um RMSD dentro do valor preconizado na literatura.
- Os análogos **3,6 e 7** interagem provavelmente em uma porção um pouco mais hidrofílica da enzima tripanotiona redutase realizando interações de hidrogênio bem semelhantes ao substrato natural da enzima tripanotiona redutase;
- Foram avaliados os principais resíduos de interação entre os 7 derivados acetamidas e a tripanotiona redutase com destaque para os resíduos Lys62A, Tyr111A, Thr463B, Glu466B e Glu467B que compõem o sítio ativo fazendo interações com a maioria dos compostos;
- De forma geral, de acordo com o *docking molecular*, esses análogos atuam supostamente em regiões do sítio ativo da enzima já bem estabelecidas, principalmente em porções hidrofóbicas em que há também interação do substrato natural da enzima ou inibidores, como inibidores tricíclicos;
- Os resultados obtidos por ambas as estratégias de identificação de compostos ativos contribuíram para o direcionamento na identificação de novos e promissores compostos antitripanossomatídeos.

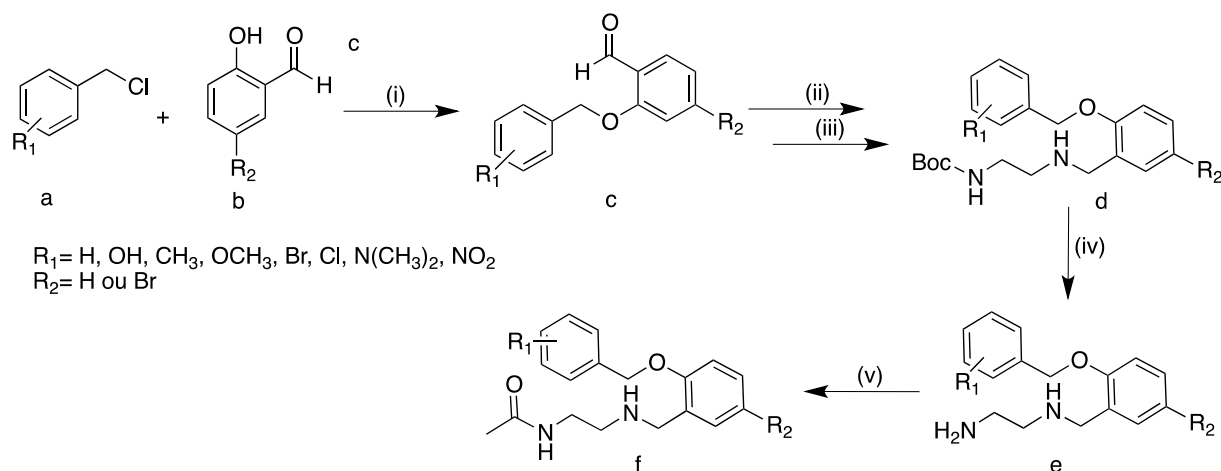
## 7 PERSPECTIVAS

O enriquecimento e evolução da química computacional contribuem para a pesquisa e desenvolvimento de novos compostos com potencial e candidato a fármaco. Abordagens *in silico*, por exemplo, representam uma redução de tempo, custos financeiros e operacionais, além de apresentar metodologias que podem interferir diretamente na síntese e avaliação da atividade de novos compostos. Essas abordagens permitiram um conhecimento maior acerca de as estruturas propostas no presente trabalho que possuem promissora atividade inibidora da tripanotona redutase.

O composto 1, previamente sintetizado pelo nosso grupo de pesquisa, apresentou atividade *in vitro* contra a forma amastigota de *Trypanosoma cruzi*, no entanto, há a necessidade de explorar melhor sua estrutura com a finalidade de aumentar sua potência e possuir melhores características de biodisponibilidade.

A avaliação *in silico* dos bioisómeros mostrou que esses compostos interagem com resíduos de aminoácidos importantes para ação enzimática, portanto a próxima etapa no desenvolvimento desses compostos será a síntese e posterior teste de atividade e citotoxicidade *in vitro* e como avaliado também será importante a realização de testes de metabolismo para avaliação dos metabólitos formados.

Figura 34 - Rota sintética proposta para obtenção de análogos bioisómeros do protótipo acetamida 1.



(i)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MW (30 min, 70 oC e 150 W); (ii) *tert*-butil (2-aminoetil)carbamato,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , peneira molecular, 30 min;  
 (iii)  $\text{NaBH}_4$ , MeOH, 30 min; (iv) TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1h; (v) CDI, THF, AcOH

Fonte: AUTOR (2020)



Visando o planejamento racional dos derivados do composto 1, os compostos que obtiveram resultados mais promissores no estudo *in silico* principalmente no *docking*, serão sintetizados seguindo a metodologia já descrita (Figura 34) sendo que o material de partida para as reações já pode ser obtido comercialmente. As estruturas dos compostos sintetizados serão elucidadas utilizando espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectrometria de massas.

Posteriormente, os compostos serão submetidos primeiramente aos ensaios biológicos de atividade inibitória da enzima tripanotiona redutase e atividade tripanocida *in vitro*. Embora a avaliação biológica de ação no parasita ainda seja uma importante etapa no desenvolvimento de novas moléculas, a contribuição da química computacional é fundamental para o desenvolvimento racional de novos compostos, economizando tempo, custos e evitar a exposição e uso de produtos químicos alinhando-se aos conceitos de química verde.

## REFERÊNCIAS

A ARNOTT, J; PLANEY, S. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. **Expert Opinion On Drug Discovery**, [S.L.], v. 7, n. 10, p. 863-875, 19 set. 2012. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2012.714363>.

ALI, J. *et al.* In Silico Prediction of Aqueous Solubility Using Simple QSPR Models: the importance of phenol and phenol-like moieties. **Journal Of Chemical Information And Modeling**, [S.L.], v. 52, n. 11, p. 2950-2957, 2 nov. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ci300447c>.

ALLINGER, N. L. *et al.* Conformational Analysis. CIV. Structures, Energies, and Electronic Absorption Spectra of the n-Paracyclophanes<sup>1</sup>. **Journal Of The American Chemical Society**, Georgia, p. 5100-5104, jul. 1975.

ALMEIDA, MZ. Plantas Mediciniais [online]. 3rd ed. Salvador: EDUFBA, 2011, 221 p. ISBN 978-. 85-232-1216-2

ALQAHTANI, S. In silicoADME-Tox modeling: progress and prospects. **Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 1147-1158, 13 out. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17425255.2017.1389897>.

ALTCHEH, J. *et al.* Population Pharmacokinetic Study of Benznidazole in Pediatric Chagas Disease Suggests Efficacy despite Lower Plasma Concentrations than in Adults. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 2907-2917, 22 maio 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002907>.

AMARAL, A. T. *et al.* A evolução da Química Medicinal no Brasil: avanços nos 40 anos da sociedade brasileira de química. **Química Nova**, [S.L.], p. 694-700, 3 jul. 2017. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170075>.

AMES, B. N. *et al.* Carcinogens as Frameshift Mutagens: metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 69, n. 11, p. 3128-3132, nov. 1972. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.69.11.3128>.

AMIN, M. L. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. **Drug Target Insights**, [S.L.], v. 7, p. 27-34, jan. 2013. Aboutscience Srl. <http://dx.doi.org/10.4137/dti.s12519>.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. . **Bulário Eletrônico**. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/>. Acesso em: 27 jun. 2022.

ASAI, T. *et al.* Cryo-EM Structure of K<sup>+</sup>-Bound hERG Channel Complexed with the Blocker Astemizole. **Structure**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 203-212, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2020.12.007>.

ASSIS, T.S.M. de *et al.* The direct costs of treating human visceral leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 50, n. 4, p. 478-482, ago. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0133-2017>.

AVADA (ed.) PreADMET. [S. l.], jan. 2021. Disponível em: <https://preadmet.qsarhub.com/>. Acesso em: 21 fev. 2022.

BAELL, J.; WALTERS, M. A. Chemistry: chemical con artists foil drug discovery. **Nature**, [S.L.], v. 513, n. 7519, p. 481-483, set. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/513481a>.

BAILEY, S. *et al.* Substrate interactions between trypanothione reductase and N1-glutathionylspermidine disulphide at 0.28-nm resolution. **European Journal Of Biochemistry**, [S.L.], v. 213, n. 1, p. 67-75, abr. 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17734.x>.

BAKER, E.N.; HUBBARD, R.e.. Hydrogen bonding in globular proteins. **Progress In Biophysics And Molecular Biology**, [S.L.], v. 44, n. 2, p. 97-179, 1984. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0079-6107\(84\)90007-5](http://dx.doi.org/10.1016/0079-6107(84)90007-5).

BANERJEE, P. *et al.* ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 257-263, 30 abr. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky318>.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos**. 3a Edição ed. São Paulo: Artmed, 2015.

BATTISTA, T. *et al.* Targeting Trypanothione Reductase, a Key Enzyme in the Redox Trypanosomatid Metabolism, to Develop New Drugs against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 8, p. 1924, 21 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25081924>.

BAZIN, M. *et al.* In vitro identification of imidazo[1,2-a]pyrazine-based antileishmanial agents and evaluation of L. major casein kinase 1 inhibition. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 210, p. 1-16, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112956>.

BENSON, T J *et al.* Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase. Phenothiazines and related tricyclics as lead structures. **Biochemical Journal**, [S.L.], v. 286, n. 1, p. 9-11, 15 ago. 1992. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj2860009>.

BERNARDES, L.S.C.; ZANI, C.L.; CARVALHO, I.. Trypanosomatidae Diseases: from the current therapy to the efficacious role of trypanothione reductase in drug discovery. **Current Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 20, n. 21, p. 2673-2696, 1 maio 2013. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/092986731132021000>.

BHAGAT, R. T. ; BUTLE, S. R. Drug Repurposing: a review. **Journal Of Pharmaceutical Research International**, [S.L.], p. 161-169, 14 jun. 2021. Sciencedomain International. <http://dx.doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i31b31704>.

BIOVIA (ed.). Discovery Studio. Versão 20.1 [S. 1.], 1 jan. 2021. Disponível em: <http://www.3dsbiovia.com/products/collaborative-science>. Acesso em: 21 mar. 2021.

BOLOGNESI, M. L.; CAVALLI, A. Multitarget Drug Discovery and Polypharmacology. **Chemmedchem**, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 1190-1192, 9 abr. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201600161>.

BOLZ, S. N. *et al.* Toward an Understanding of Pan-Assay Interference Compounds and Promiscuity: a structural perspective on binding modes. **Journal Of Chemical Information And Modeling**, [S.L.], v. 61, n. 5, p. 2248-2262, 26 abr. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01227>.

BOND, C. S. *et al.* **Crystal structure of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors.** Structure, [s.l.], v. 7, n. 1, p.81-89, jan. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126\(99\)80011-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126(99)80011-2).

BORGES, N. H. P. B. **Análise in silico das propriedaeds farmacológicas e toxicologicas dos organosselênios e ensaios in vitro de atividæds antibacteriana e moduladora da resistênciã a drogas em Staphylococcus aureus.** 2018. Tese (Doutorado em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

BRASIL. Secretária de vigilância em saúde. Ministério da Saúde (org.). **Boletim Epidemiológico.** Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 136 p. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2021.

BRIGHTMAN, F. A. *et al.* Application of a generic physiologically based pharmacokinetic model to the estimation of xenobiotic levels in rat plasma. **Drug Metabolism And Disposition**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 84-93, 12 out. 2005. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.105.004804>.

BUDDE, H. *et al.* Enzymes of the thiol-dependent hydroperoxide metabolism in pathogens as potential drug targets. **Biofactors**, [S.L.], v. 17, n. 1-4, p. 83-92, 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.5520170109>.

BURZA, S.; CROFT, S; L; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, [S.L.], v. 392, n. 10151, p. 951-970, set. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31204-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31204-2).

CAPPEL, D. *et al.* Impact of Different Automated Binding Pose Generation Approaches on Relative Binding Free Energy Simulations. **Journal Of Chemical Information And Modeling**, [S.L.], v. 60, n. 3, p. 1432-1444, 28 jan. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01118>.

CARON, G. *et al.* Flexibility in early drug discovery: focus on the beyond-rule-of-5 chemical space. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 621-627, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2020.01.012>.

CCDC (Cambridge) (org.). **What is the difference between the GoldScore, ChemScore, ASP and ChemPLP scoring functions provided with GOLD?** 2020. Elaborada por The Cambridge Crystallographic Data Centre. Disponível em: <https://www.ccdc.cam.ac.uk/support-and-resources/support/case/?caseid=5d1a2fc0-c93a-49c3-a8e2-f95c472dcff0>. Acesso em: 19 abr. 2022.

CDC. Center For Disease Control And Prevention. U.S. Department Of Health & Human Services (org.). **American Trypanosomiasis**. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>. Acesso em: 16 fev. 2021.

CHAN, C. *et al.* Phenothiazine Inhibitors of Trypanothione Reductase as Potential Antitrypanosomal and Antileishmanial Drugs. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 148-156, 1 jan. 1998. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm960814j>.

CHANDRASEKARAN, B.; AGRAWAL, N.; KAUSHIK, S. p. Pharmacophore Development. **Encyclopedia Of Bioinformatics And Computational Biology**, [S.L.], p. 677-687, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20276-8>.

CHARIFSON, P. S.; WALTERS, W. P. Filtering databases and chemical libraries. **Journal Of Computer-Aided Molecular Design**, [S.L.], v. 16, n. 5/6, p. 311-323, 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1020829519597>.

CHEMAXON (ed.). Marvin Sketch [S. l.], 1 jan. 2020. Disponível em:<https://chemaxon.com/products/marvin-js>. Acesso em: 21 dez. 2020.

CHOU, K. An Unprecedented Revolution in Medicinal Chemistry Driven by the Progress of Biological Science. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 17, n. 21, p. 2337-2358, 21 jul. 2017. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1568026617666170414145508>.

COELHO, L. W. *et al.* Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica. **Química Nova**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 396-404, jun. 1999. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40421999000300018>.

COLOTTI, G. *et al.* Structural insights into the enzymes of the trypanothione pathway: targets for antileishmaniasis drugs. **Future Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 5, n. 15, p. 1861-1875, out. 2013. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc.13.146>.

COLOTTI, G. *et al.* Structure-guided approach to identify a novel class of anti-leishmaniasis diaryl sulfide compounds targeting the trypanothione metabolism. **Amino Acids**, [S.L.], v. 52, n. 2, p. 247-259, 29 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-019-02731-4>.

COSTA, A. S.; MARTINS, J. P. A.; MELO, E. B. SMILES-based 2D-QSAR and similarity search for identification of potential new scaffolds for development of SARS-CoV-2 MPRO inhibitors. **Structural Chemistry**, [S.L.], p. 1-16, 6 jul. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11224-022-02008-9>.

CRAMER, C. J. **Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models**. 2. Ed. [s.l.], Wiley, 2002.

DAINA, A. *et al.* SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-13, 3 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep42717>.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **Chemmedchem**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 1117-1121, 24 maio 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201600182>.

DANKER, T.; MÖLLER, C. Early identification of hERG liability in drug discovery programs by automated patch clamp. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 5, p. 1-13, 2 set. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2014.00203>.

DE RYCKER, M. *et al.* Challenges and recent progress in drug discovery for tropical diseases. **Nature**, v. 559, n. 7715, p. 498–506, 25 jul. 2018.

DELANEY, J. S.. ESOL: ∴ estimating aqueous solubility directly from molecular structure. **Journal Of Chemical Information And Computer Sciences**, [S.L.], v. 44, n. 3, p. 1000-1005, 13 mar. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ci034243x>.



DESAI, P. V.; RAUB, T. J.; BLANCO, M.. How hydrogen bonds impact P-glycoprotein transport and permeability. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 22, n. 21, p. 6540-6548, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.059>.

DOLABELA, M. F. *et al.* Estudo in silico das atividades de triterpenos e iridoides isolados de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson. **Revista Fitos**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 227, 29 out. 2018. Fiocruz - Instituto de Tecnologia em Farmacos. <http://dx.doi.org/10.17648/2446-4775.2018.602>.

DOURISH, C. T. *et al.* Anti-obesity Drugs: from animal models to clinical efficacy. **Animal And Translational Models For Cns Drug Discovery**, [S.L.], p. 271-315, 2008. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-373861-5.00028-x>

DREWS, J.. Drug Discovery: a historical perspective. **Science**, [S.L.], v. 287, n. 5460, p. 1960-1964, 17 mar. 2000. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.287.5460.1960>

DRWAL, M. N. *et al.* ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 53-58, 16 maio 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku401>.

DRWAL, M. N.; GRIFFITH, Renate. Combination of ligand- and structure-based methods in virtual screening. **Drug Discovery Today: Technologies**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 395-401, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2013.02.002>.

ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A.. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics Of North America**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 119-134, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>.

ENGELS, D.; ZHOU, X. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. **Infectious Diseases Of Poverty**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-9, 28 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40249-020-0630-9>.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. (org.). **Drug Development and Drug Interactions**: table of substrates, inhibitors and inducers. Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers#table3-2>. Acesso em: 27 jun. 2022.

FERREIRA, A. *et al.* In Silico Pharmacokinetic Study of Vancomycin Using PBPK Modeling and Therapeutic Drug Monitoring. *Current Drug Metabolism*, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 150-162, 24 mar. 2021. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1389200221999210101232417>.

FIGUEIREDO, T. A. **A seleção de medicamentos estratégicos para a produção nacional e a saúde coletiva**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2016. 30 p. Disponível em: <https://saudeamanha.fiocruz.br/wp-content/uploads/2017/03/saude-amanha-TD-21.pdf>. Acesso em: 06 fev. 2021.

FILIMONOV, D. A. *et al.* Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. **Chemistry Of Heterocyclic Compounds**, [S.L.], v. 50, n. 3, p. 444-457, 28 maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1>.

FISCHER, A. *et al.* 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, 22 fev. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02227>.

FOKOUÉ, H. *et al.* Há algo novo no reconhecimento molecular aplicado à química medicinal? **Química Nova**, [S.L.], p. 78-89, fev. 2020. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170474>.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J.. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. **Journal Of Combinatorial Chemistry**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 55-68, 18 dez. 1998. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cc9800071>.

GOEL, R. K. *et al.* PASS-assisted exploration of new therapeutic potential of natural products. **Medicinal Chemistry Research**, [S.L.], v. 20, n. 9, p. 1509-1514, 6 ago. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-010-9398-y>.

GOLAN, D. E. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GÜNER, O. F.; BOWEN, J. P. Setting the Record Straight: the origin of the pharmacophore concept. **Journal Of Chemical Information And Modeling**, [S.L.], v. 54, n. 5, p. 1269-1283, 18 abr. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ci5000533>.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. **Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman & Gilman**. 2. ed. Califórnia: Amgh, 2014. 1216 p. Tradução de Almir Lourenço da Fonseca Augusto Langelo, Beatriz Araújo do Rosário, Carlos Henrique de Araújo Cosendey, Denise Costa Rodrigues, Maria Elisabete Costa Moreira, Patricia Lydie Voeux.

HOFFER, L. *et al.* Chemistry-driven Hit-to-lead Optimization Guided by Structure-based Approaches. **Molecular Informatics**, [S.L.], v. 37, n. 9-10, p. 1800059, 27 jul. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/minf.201800059>.

HOFFMANN, R.; ANJOS, M. C. R.. Construção histórica do uso de plantas medicinais e sua interferência na socialização do saber popular. **Guaju**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 142-163, 18 dez. 2018. Universidade Federal do Parana. <http://dx.doi.org/10.5380/guaju.v4i2.58151>.

HUGHES, J. *et al.* Principles of early drug discovery. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 162, n. 6, p. 1239-1249, 22 fev. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>.

HUNTER, W. N. *et al.* Active site of trypanothione reductase. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 227, n. 1, p. 322-333, set. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90701-k](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(92)90701-k).

ILARI, A. *et al.* Polyamine-trypanothione pathway: an update. **Future Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 61-77, jan. 2017. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc-2016-0180>.

ILARI, A. *et al.* Toward a Drug Against All Kinetoplastids: from leishbox to specific and potent trypanothione reductase inhibitors. **Molecular Pharmaceutics**, [S.L.], v. 15, n. 8, p. 3069-3078, 13 jun. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00185>.

IMMING, P. *et al.* Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 5, n. 10, p. 821-834, 1 out. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2132>.

INSTITUTE OF BIOMEDICAL CHEMISTRY (IBMC). Predictive services. Russian Scientific Foundation, 2022. Disponível em: <http://www.way2drug.com>. Acesso em: 20 set. 2020.

IRVINE, J. D. *et al.* MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: a tool for membrane permeability screening. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 88, n. 1, p. 28-33, jan. 1999. American Geophysical Union (AGU). <http://dx.doi.org/10.1021/js9803205>

ISYAKU, Y. *et al.* Computational studies of a series of 2-substituted phenyl-2-oxo-, 2-hydroxyl- and 2-acyloxyethylsulfonamides as potent anti-fungal agents. **Heliyon**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 1-5, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03724>.

IUPAC. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, 2019. Disponível em: <<https://goldbook.iupac.org>>. Acesso em: 18 de Abril de 2022.

JACOBY, E. M. *et al.* Crystal structure of the Trypanosoma cruzi trypanothione reductase·mepacrine complex. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 73-80, jan. 1996. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0134\(199601\)24:13.0.co;2-p](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-0134(199601)24:13.0.co;2-p).

JAIN, N.; YALKOWSKY, S. H.. Estimation of the aqueous solubility I: application to organic nonelectrolytes. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 90, n. 2, p. 234-252, fev. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1002/1520-6017\(200102\)90:23.0.co;2-v](http://dx.doi.org/10.1002/1520-6017(200102)90:23.0.co;2-v).

JAMEI, M. *et al.* The Simcyp® Population-based ADME Simulator. **Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 211-223, fev. 2009. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/17425250802691074>.

JOHNSON, K. A.; GOODY, R. S.. The Original Michaelis Constant: translation of the 1913 michaelis-menten paper. **Biochemistry**, [S.L.], v. 50, n. 39, p. 8264-8269, 9 set. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi201284u>.

JONES, G. *et al.* 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, abr. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>.

KALYAANAMOORTHY, S. *et al.* Structure-based drug design to augment hit discovery. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 16, n. 17-18, p. 831-839, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2011.07.006>.

KARPLUS, P. A.; SCHULZ, G. E.. Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2Å resolution. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 210, n. 1, p. 163-180, nov. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90298-2](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(89)90298-2).

KATSUNO, K. *et al.* Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 14, n. 11, p. 751-758, 5 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4683>.

KELDER, J. *et al.* Polar Molecular Surface as a Dominating Determinant for Oral Absorption and Brain Penetration of Drugs. **Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 16, n. 10, p. 1514-1519, 1999. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1015040217741>.

KUEPFER, L. *et al.* Applied Concepts in PBPK Modeling: how to build a pbpk/pd model. **Cpt: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, [S.L.], v. 5, n. 10, p. 516-531, out. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/psp4.12134>.

KULKARNI, A.t; HAN, Y.; HOPFINGER, A. J.. Predicting Caco-2 Cell Permeation Coefficients of Organic Molecules Using Membrane-Interaction QSAR Analysis. **Journal Of Chemical Information And Computer Sciences**, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 331-342, 9 fev. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ci010108d>.

LAGAROS, N. D.; PAPADRAKAKIS, M. Neural network based prediction schemes of the non-linear seismic response of 3D buildings. **Advances In Engineering Software**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 92-115, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.advengsoft.2011.05.033>.

LEESON, P. D.; DAVIS, A. M.. Time-Related Differences in the Physical Property Profiles of Oral Drugs. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 47, n. 25, p. 6338-6348, 2 nov. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm049717d>.

LEESON, P. D.; ST-GALLAY, S. A.; WENLOCK, M. C.. Impact of ion class and time on oral drug molecular properties. **Med. Chem. Commun.**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 91-105, 2011. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c0md00157k>.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição, 2014. Ed

LEPPERT, W. CYP2D6 in the Metabolism of Opioids for Mild to Moderate Pain. **Pharmacology**, [S.L.], v. 87, n. 5-6, p. 274-285, 2011. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000326085>.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal Of Pharmacological And Toxicological Methods**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 235-249, jul. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1056-8719\(00\)00107-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1056-8719(00)00107-6).

LIPINSKI, C. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: s0169-409x(96)00423-1. the article was originally published in advanced drug delivery reviews 23 (1997) 3:25. 1. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 46, n. 1-3, p. 3-26, mar. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0).

LONDON, F. *et al.* The general theory of molecular forces. **Transactions Of The Faraday Society**, [S.L.], v. 33, p. 8-26, 1937. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/tf937330008b>.

LUPATINI, E. de O. *et al.* Medicamentos e pesquisa translacional: etapas, atores e políticas de saúde no contexto brasileiro. **Saúde em Debate**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 181-199, nov. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-11042019s214>.

LYU, J. *et al.* Ultra-large library docking for discovering new chemotypes. **Nature**, [S.L.], v. 566, n. 7743, p. 224-229, fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-0917-9>.

MACALINO, S. *et al.* Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives Of Pharmacal Research**, [s.l.], v. 38, n. 9, p.1686-1701, 2015.

MACCARI, G. *et al.* A fast virtual screening approach to identify structurally diverse inhibitors of trypanothione reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 21, n. 18, p. 5255-5258, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.07.036>.

MARQUES, R. B. Busca por alcaloides presentes em *Caliphuria subedentata* como potenciais candidatos a fármacos para a Doença de Alzheimer. **Usp**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-82, 2021. Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA). <http://dx.doi.org/10.11606/d.17.2021.tde-06122021-121359>.

MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, Márcia M. C.. QSAR modeling: um novo pacote computacional open source para gerar e validar modelos qsar. **Química Nova**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 554-560, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422013000400013>.

MCGOVERN, S. L. *et al.* A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 45, n. 8, p. 1712-1722, 9 mar. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm010533y>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. 2018. Disponível em: [http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Relatorio\\_PCDT\\_Doenca\\_de\\_Chagas.pdf](http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Relatorio_PCDT_Doenca_de_Chagas.pdf). Acesso em: 24 jun. 2022.

MITTAPALLI, G. K.; ROBERTS, E. Ligands of the neuropeptide Y Y2 receptor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 430-441, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.11.061>.



MODA, T. L.. **Desenvolvimento de Modelos In Silico de Propriedades de ADME Para a Triagem de Novos Candidatos a Fármacos**. 2007. 97 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Física, Usp, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

MONTEFIORI, M. *et al.* SMARTCyp. University of Copenhagen, 2006. Disponível em: <https://smartcyp.sund.ku.dk/about>. Acesso em: 20 set. 2021.

NISHIO, M. *et al.* CH- $\pi$  hydrogen bonds in biological macromolecules. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, [S.L.], v. 16, n. 25, p. 12648-12683, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c4cp00099d>.

OPEN MOLECULES (ed.). Osiris Property Explorer [S. 1.], jan. 2016. Disponível em: <https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>. Acesso em: 21 out. 2020.

OPREA, T. I. *et al.* Property distribution of drug-related chemical databases. **Journal Of Computer-Aided Molecular Design**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 251-264, 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1008130001697>.

PATRICK, G. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. Sixth Edit ed. Oxford: Oxford, 2017.

PEREIRA, P. M.L. *et al.* In vitro evaluation of antitrypanosomal activity and molecular docking of benzoylthioureas. **Parasitology International**, [S.L.], v. 80, p. 1-7, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2020.102225>.

PEREIRA, A. L. da C.. **Síntese, elucidação estrutural e estudos in silico de novos compostos 2-amino-tiofênicos imídicos candidatos a fármacos antifúngicos, antileishmanicida e antitumorais**. 2019. 164 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

PERKIN ELMER (ed.). ChemDraw. ChemDraw. Versão 16.0 [S. 1.], 1 jan. 2017. Disponível em: <http://www.perkinelmer.com/category/chemdraw>. Acesso em: 21 nov. 2021.

PETITO, E. S. *et al.* Molecular Modeling Approaches for the Prediction of Selected Pharmacokinetic Properties. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 18, n. 26, p. 2230-2238, 24 jan. 2019. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1568026619666181220105726>.

PETUKH, M.; STEFL, S.; ALEXOV, E.. The Role of Protonation States in Ligand-Receptor Recognition and Binding. **Current Pharmaceutical Design**, [S.L.], v. 19, n. 23, p. 4182-4190, 1 maio 2013. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612811319230004>.

POTTS, R. O.; GUY, R. H.. Predicting Skin Permeability. **Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 09, n. 5, p. 663-669, 1992. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1015810312465>.

PREISSNER, R. *et al.* ProTox-II: Prediction Of Toxicity Of Chemicals. Charite University of Medicinen, 2018. Disponível em: [https://tox-new.charite.de/protox\\_II/index.php?site=home](https://tox-new.charite.de/protox_II/index.php?site=home). Acesso em: 20 mai. 2022.

PROUDFOOT, J. R.. The evolution of synthetic oral drug properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 1087-1090, fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.12.024>.

PUCHALSKA, P.; CRAWFORD, P. A.. Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. **Cell Metabolism**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 262-284, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.022>.

RAREY, M. Molecular Design. Concepts and Applications. By Gisbert Schneider and Karl-Heinz Baringhaus. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 48, n. 10, p. 1718-1719, 23 fev. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.20090004>

RIM, K. In silico prediction of toxicity and its applications for chemicals at work. **Toxicology And Environmental Health Sciences**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 191-202, 14 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13530-020-00056-4>.

RIPPHAUSEN, P. *et al.* Quo Vadis, Virtual Screening? A Comprehensive Survey of Prospective Applications. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 53, n. 24, p. 8461-8467, 7 out. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm101020z>.

RUDI, A. *et al.* SOMP: web server for in silico prediction of sites of metabolism for drug-like compounds. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 31, n. 12, p. 2046-2048, 11 fev. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btv087>.

RYDBERG, P. *et al.* The SMARTCyp cytochrome P450 metabolism prediction server. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 26, n. 23, p. 2988-2989, 14 out. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq584>.

SAGER, J. E. *et al.* Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulation Approaches: a systematic review of published models, applications, and model verification. **Drug Metabolism And Disposition**, [S.L.], v. 43, n. 11, p. 1823-1837, 21 ago. 2015. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.115.065920>.

SANDER, T. *et al.* 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ci500588j>.

SANTANA, L. E. G. de S. *et al.* Análise in silico da farmacocinética, da farmacodinâmica e da toxicidade de dois compostos isolados da Moringa oleifera. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 9, n. 11, p. 1-18, 4 dez. 2020. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i11.10469>.

SANTOS, E. F. *et al.* Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: a nationwide spatiotemporal analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 1-16, 3 ago. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008445>.

SANTOS, R. *et al.* A comprehensive map of molecular drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 19-34, 2 dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2016.230>.

SCHMIDT, A. *et al.* Enzymes of the Trypanothione Metabolism as Targets for Antitrypanosomal Drug Development. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 2, n. 11, p. 1239-1259, 1 nov. 2002. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1568026023393048>.

SCHNEIDER, G. *et al.* Virtual Screening for Bioactive Molecules by Evolutionary De Novo Design. **Angewandte Chemie**, [S.L.], v. 39, n. 22, p. 4130-4133, 17 nov. 2000. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/1521-3773\(20001117\)39:223.0.co;2-e](http://dx.doi.org/10.1002/1521-3773(20001117)39:223.0.co;2-e).

SCHNEIDER, G. Virtual screening: an endless staircase?. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 273-276, abr. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3139>.

SCHUELER, F. W. . **Chemobiodynamics and Drug Design**: McGraw-Hill Book Company, 1960. 638 p. Disponível em: <https://www.amazon.com/Chemobiodynamics-Drug-Design-F-Schueler/dp/B0000CKTVT>. Acesso em: 10 maio 22.

SCHUHMACHER, A. *et al.* A Review of the Pharmaceutical R&D Efficiency: costs, timelines, and probabilities. **Value Creation In The Pharmaceutical Industry**, [S.L.], p. 60-79, 15 jan. 2016. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <http://dx.doi.org/10.1002/9783527693405.ch4>.

SEGALL, M. D.; BARBER, Chris. Addressing toxicity risk when designing and selecting compounds in early drug discovery. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 688-693, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.01.006>.

SHARMA, C.; CHOWDHARY, A. Molecular bases of antifungal resistance in filamentous fungi. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 50, n. 5, p. 607-616, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.06.018>.

SHARMA, D *et. al.* Solubility enhancement–eminent role in poorly soluble drugs. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v.2, n. 2, p. 220-224, 2009.

SHULTZ, M. D.. Two Decades under the Influence of the Rule of Five and the Changing Properties of Approved Oral Drugs. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 62, n. 4, p. 1701-1714, 13 set. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00686>.

SILVA, E. da P. **Síntese de βfenil estudos in vitro da semicarbazonas derivadas de isatina e atividade antibacteriana**. 2020. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.

SILVA, S. M. da *et al.* Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes (Vol. 02 - Fungos). **Latin American Publicações**, [S.L.], p. 1-262, 2021. Latin American Publicações. <http://dx.doi.org/10.47174/lap2020.ed.0000058>.

SIMEONI, M. *et al.* Predictive Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of Tumor Growth Kinetics in Xenograft Models after Administration of Anticancer Agents. **Cancer Research**, [S.L.], v. 64, n. 3, p. 1094-1101, 1 fev. 2004. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2524>.

SMITH, C. J. *et al.* Bruce Nathan Ames - Paradigm shifts inside the cancer research revolution. **Mutation Research/Reviews In Mutation Research**, [S.L.], v. 787, p. 108363, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108363>.

SOUZA, J. de; FREITAS, Zaida Maria F.; STORPIRTIS, Sílvia. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S.L.], v. 43, n. 4, p. 515-527, dez. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322007000400004>.

SOUZA, J. L. *et al.* In silico study of alkaloids derived from *Catharanthus roseus* in the active site of *Trypanosoma cruzi* by molecular docking. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 1-15, 4 abr. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28114>.

STEWART, J. J. P.. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the nndo approximations and re-optimization of parameters. **Journal Of Molecular Modeling**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-32, 28 nov. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x>.

STUMPFE, D.; GILBERG, E.; BAJORATH, J. Series of screening compounds with high hit rates for the exploration of multi-target activities and assay interference. **Future Science Oa**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 279-286, mar. 2018. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.4155/fsoa-2017-0137>.

SUETH-SANTIAGO, V. *et al.* Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 57, 2017.

SULLIVAN, F. X. *et al.* Mutational Analysis of Parasite Trypanothione Reductase: acquisition of glutathione reductase activity in a triple mutant. **Biochemistry**, [s. l.], v. 30, n. 11, p. 2761-2767, 1991.

SWINNEY, D. C.; ANTHONY, J. How were new medicines discovered? **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 507-519, 24 jun. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3480>

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS (SIB) (ed.). 1 jan. 2022. Disponível em: <https://chemaxon.com/products/marvin-js>. Acesso em: 21 mai. 2022.

TEAGUE, S. J. *et al.* The Design of Leadlike Combinatorial Libraries. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 38, n. 24, p. 3743-3748, 16 dez. 1999. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1521-3773\(19991216\)38:243.0.co;2-u](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1521-3773(19991216)38:243.0.co;2-u).

THOMAS, S. Clinical relevance of predictive physiologically based pharmacokinetic methods. **Expert Opin. Drug Discov**, Uk, v. 7, n. 3, p. 725-732, 2008.

THORLUND, K. *et al.* A real-time dashboard of clinical trials for COVID-19. **The Lancet Digital Health**, [S.L.], v. 2, n. 6, p. 286-287, jun. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2589-7500\(20\)30086-8](http://dx.doi.org/10.1016/s2589-7500(20)30086-8).

TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M.. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal For Parasitology**, [S.L.], v. 31, n. 5-6, p. 472-481, maio 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00153-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00153-9).

UPTON, R; MOULD, D. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development: part 3-introduction to pharmacodynamic modeling methods. **Cpt: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 88, jan. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/psp.2013.71>.

VAN NORMAN, G. A. Drugs, Devices, and the FDA: Part 1. **Jacc: Basic to Translational Science**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.170-179, 2016.

VARMA, M. V. S. *et al.* Physicochemical Space for Optimum Oral Bioavailability: contribution of human intestinal absorption and first-pass elimination. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 53, n. 3, p. 1098-1108, 13 jan. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm901371v>.

VEBER, D. F. *et al.* Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, jun. 2002.

VERDONK, M. L. *et al.* Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 609-623, 1 ago. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.10465>.

VERLI, H. (org.). *Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular*. Porto Alegre: 1 ed. 2014.

VUORINEN, A.; SCHUSTER, D. **Methods for generating and applying pharmacophore models as virtual screening filters and for bioactivity profiling**. *Methods*, [s.l.], v. 71, p.113-134, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.10.013>.

WALTERS, W. P.; A MURCKO, M. Prediction of 'drug-likeness'. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 255-271, mar. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00003-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00003-0).

WANG, Z. *et al.* Combined strategies in structure-based virtual screening. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 3149-3159, 2020. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c9cp06303j>.

WENG, H.; CHEN, H.; WANG, M.. Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. **Infectious Diseases Of Poverty**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-9, 18 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40249-018-0444-1>.

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**, 4a. ed., Elsevier, 2015.

WHO (org.). **Chagas disease**: also known as american trypanosomiasis. 2020. World Health Organization. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 13 fev. 2021.

WHO (org.). **Leishmaniasis**. 2020. World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 16 fev. 2021.

WHO. Priority Medicines for Europe and the World Update Report, 2013. Disponível em: [www.who.int/medicines/areas/priority\\_medicines/en/](http://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/en/). Acesso em: 06 fev 2021.



WILLIAMS, M. A. *et al.* Hydrogen Bonds in Protein-Ligand Complexes. **Protein-Ligand Interactions**, [S.L.], p. 1-25, 15 mar. 2008. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <http://dx.doi.org/10.1002/9783527610754>.

WON, J. *et al.* Can the COVID-19 Pandemic Disrupt the Current Drug Development Practices? **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 11, p. 5457, 21 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22115457>.

YAMASHITA, S. *et al.* Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 195-204, maio 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0928-0987\(00\)00076-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0928-0987(00)00076-2)

YANG, Z. *et al.* 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, 13 jan. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01476>.

YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man: fact or myth. **Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 763-766, 1997. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1012102522787>.

ZHANG, H. *et al.* STAT3beta, a distinct isoform from STAT3. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [S.L.], v. 110, p. 130-139, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2019.02.006>.

ZHANG, M. *et al.* Gating Charges in the Activation and Inactivation Processes of the hERG Channel. **Journal Of General Physiology**, [S.L.], v. 124, n. 6, p. 703-718, 15 nov. 2004. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.200409119>.

ZHANG, M. *et al.* Theoretical modeling of the hydrated serotonin in solution: insight into intermolecular hydrogen bonding dynamics and spectral shift in the electronic excited states. **Journal Of Molecular Liquids**, [S.L.], v. 288, p. 111093, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111093>.

ZHANG, X. *et al.* Assessment of CYP2C9 Structural Models for Site of Metabolism Prediction. **Chemmedchem**, [S.L.], v. 16, n. 11, p. 1755-1764, 18 mar. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.202000964>.

ZHANG, Z.; TANG, W. Drug metabolism in drug discovery and development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 721-732, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2018.04.003>.

ZHANG, Z; ZHU, M.; TANG, W. Metabolite Identification and Profiling in Drug Design: current practice and future directions. **Current Pharmaceutical Design**, [S.L.], v. 15, n. 19, p. 2220-2235, 1 jul. 2009. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/138161209788682460>.

ZIMMERMANN, L. A.. **Síntese de Compostos Potencialmente Antitripanossomatídeos e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade com Base em Ensaios In Vitro, acoplados a estudos In Silico**. 2018. 247 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.