



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS BLUMENAU/SC
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA, PROCESSOS E
MATERIAIS AVANÇADOS

Heitor Ribeiro Abreu

**Estudos *in silico* e investigação da atividade biológica de
tiossemicarbonas como potenciais agentes tripanocidas**

Blumenau

2023

Heitor Ribeiro Abreu

Estudos *in silico* e investigação da atividade biológica de tiossemicarbazonas como potenciais agentes tripanocidas

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados da Universidade Federal de Santa Catarina, no Centro Tecnológico de Ciências Exatas e Educação, *Campus* Blumenau/SC para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Sena de Oliveira
Co-Orientadora: Profa. Dra. Lidiane Meier

Blumenau

2023

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

Abreu, Heitor Ribeiro

Estudos in silico e investigação da atividade biológica de tiossemicarbazonas como potenciais agentes tripanocidas / Heitor Ribeiro Abreu ; orientador, Aldo Sena de Oliveira, coorientador, Lidiane Meier, 2023.
89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Blumenau, Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados, Blumenau, 2023.

Inclui referências.

1. Nanociência, Processos e Materiais Avançados. 2. Tiossemicarbazonas. 3. In silico. 4. Doença de Chagas. I. Oliveira, Aldo Sena de. II. Meier, Lidiane . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados. IV. Título.

Heitor Ribeiro Abreu

Estudos *in silico* e investigação da atividade biológica de tiossemicarbazonas como potenciais agentes tripanocidas

O presente trabalho, em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 30 de Maio de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Daniela Brondani
(Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC)

Prof. Dr. Ismael Casagrande Bellettini
(Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC)

Profa. Dra. Renata Azevedo Balaguez
(Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho da dissertação que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Nanociência, Processos e Materiais Avançados.

Profa. Dra. Claudia Merlini
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Aldo Sena de Oliveira
Orientador

Blumenau

2023

Ao Professor Aldo Sena, à Professora Lidiane Meier e, principalmente a DEUS, que mesmo em dez vidas, ainda não vou entendê-lo.

RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma doença considerada tropical negligenciada, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e geralmente se manifesta em regiões mais vulneráveis e subdesenvolvidas, a exemplo do Brasil. O tratamento quimioterápico da DC é baseado em dois principais fármacos: o benznidazol (Bz), que muitas vezes é suspenso em decorrência dos graves efeitos adversos e sua baixa eficiência na fase crônica e o nifurtimox (Nfx) que atualmente está em desuso no Brasil. Nesse sentido, a busca de fármacos mais efetivos do ponto de vista terapêutico e que apresentem menores efeitos adversos se torna uma necessidade. Assim, as tiossemicarbazonas (TSCs) se apresentam como compostos interessantes no estudo de potenciais candidatos para o tratamento da DC. Neste trabalho, foi escolhido como alvo biológico a enzima cruzaina, principal protease do *T. cruzi*, que está relacionada ao seu desenvolvimento, nutrição, invasão de células do hospedeiro, como antígeno imunodominante e ativação de caspases para morte celular programada, sendo considerada fundamental para a sua sobrevivência. Para isso, 16 compostos de TSCs, já sintetizados e previamente publicados foram submetidas a análises de modelagem molecular *in silico* e a testes fenotípicos quanto à atividade tripanocida e citotóxica. Todas os compostos apresentaram IC₅₀ menores que 0,800 μM na inibição da cruzaina, com destaque para os compostos **H7**, **H10** e **H11** (IC₅₀ 0,306, 0,512 e 0,412 μM respectivamente), os quais também, obtiveram maior perfil inibitório avaliado pela docagem, devido a presença do anel benzênico adicional, que favorece o aumento da lipofilicidade, aumento da atividade metabólica e do perfil farmacocinético, característico dos inibidores da cruzaina. Da mesma forma, esses compostos **H7**, **H10** e **H11** foram os mais ativos na inibição do *T. cruzi* com valores de IC₅₀ de 1,96, 2,85 e 2,15 μM respectivamente. Os dados de modelagem molecular foram comparados aos experimentos *in vitro*, sendo a função *ChemPLP* representativa para o conjunto de dados tanto da cinética enzimática (R²= 0,9805) quanto dos ensaios fenotípicos (R²= 0,6418). Além disto, os compostos mais ativos na inibição enzimática também tiveram maior atividade tripanocida, validando a hipótese de que o mecanismo possa estar relacionado à inibição da enzima cruzaina. Nos ensaios farmacocinéticos e previsão farmacodinâmica, as TSCs tiveram resultados similares aos fármacos de referência (Bz e Nfx) e, com exceção dos compostos **H3** e **H15**, todas demonstraram bons perfis de segurança em células de fibroblatos (HFF-1); De forma geral, as TSCs apresentaram atividade *in silico* e *in vitro* promissora contra o *T. cruzi* e podem ser considerados protótipos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades antiparasitárias.

Palavras chaves: Doença de chagas, Tiossemicarbazonas, Docagem molecular, ADMET, *T. cruzi*.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is considered a neglected tropical disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), and usually manifests in more vulnerable and underdeveloped regions, such as Brazil. The chemotherapeutic treatment of CD is based on two main drugs: benznidazole (**Bz**), which is often suspended due to its serious adverse effects and low efficiency in the chronic phase, and nifurtimox (**Nfx**), which is currently out of use in Brazil. In this sense, the search for more effective drugs from the therapeutic point of view and that present fewer adverse effect becomes a necessity. Thus, thiosemicarbazones (TSCs) present themselves as interesting compounds in the study of potential candidates for the treatment of CD. In this work, we chose as biological target the enzyme cruzain, the main protease of *T. cruzi*, which is related to its development, nutrition, invasion of host cells, as an immunodominant antigen and activation of caspases for programmed cell death, being considered fundamental for its survival. To this end, 16 previously synthesized and published compounds of TSCs were subjected to *in silico* molecular modeling analysis and phenotypic tests for trypanocide and cytotoxic activity. All molecules showed IC_{50} lower than $0.800\mu\text{M}$ in the inhibition of cruzain, especially compounds **H7**, **H10** and **H11** (IC_{50} 0.306, 0.512 and $0.412\mu\text{M}$ respectively), which also obtained a higher inhibitory profile evaluated by docking, due to the presence of the additional benzene ring, which favors the increased lipophilicity, increased metabolic activity and pharmacokinetic profile, characteristic of cruzain inhibitors. Similarly, these compounds **H7**, **H10** and **H11** were the most active in inhibiting *T. cruzi* with IC_{50} values of 1.96, 2.85 and $2.15\mu\text{M}$ respectively. The molecular modeling data were compared to the *in vitro* experiments, and the ChemPLP function was representative for the data set of both enzyme kinetics ($R^2= 0.9805$) and phenotypic assays ($R^2= 0.6418$). Moreover, the compounds more active in enzyme inhibition also had higher trypanocidal activity, validating the hypothesis that the mechanism may be related to cruzain enzyme inhibition. In pharmacokinetic assays and pharmacodynamic prediction, the TSCs had similar results to the reference drugs (**Bz** and **Nfx**) and, except for compounds **H3** and **H15**, all showed good safety profiles in fibroblast cells (HFF-1); Overall, the TSCs showed promising *in silico* and *in vitro* activity against *T. cruzi* and can be considered molecular prototypes for the development of new antiparasitic drugs.

Key words: Chagas disease, thiosemicarbazones, molecular docking, ADMET, *T. cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Números de DNAs pelo mundo.....	14
Figura 2: Fármacos usados no tratamento da DC.....	15
Figura 3: Estrutura geral das TSCs.....	17
Figura 4: Números de óbitos da DC comparadas com outras doenças infecciosas e parasitárias onde a coluna x representa os anos e y a média de mortes notificadas segundo Ministério da Saúde.....	20
Figura 5: Ciclo de vida do protozoário <i>T. cruzi</i>	21
Figura 6: Principais vetores do <i>T. cruzi</i> na ordem correspondente: (A) <i>triatoma infestans</i> (B) <i>Rhodnius prolixus</i> (C) <i>Triatoma dimidiata</i>	22
Figura 7: Incidência de DC por estado no período de 2001 a 2018.....	21
Figura 8: Municípios com ocorrências de <i>Triatomíneos</i>	24
Figura 9: Estrutura 3D da protease cruzaina (PDB ID 3KKU)	25
Figura 10: Tríade catalítica da enzima cruzaina.....	26
Figura 11: Subsítios da cruzaina, PDB ID 3KKU.....	27
Figura 12: Subsítios da cruzaina com seus análogos no ligante.....	27
Figura 13: Classes de compostos testados com capacidade inibitória da cruzaina.....	28
Figura 14: Exemplos de compostos a base de TSCs utilizadas como medicamentos.....	39
Figura 15: Exemplos de complexos metálicos de TSCs bidentada e tridentada.....	40
Figura 16: esquema reacional de síntese das TSCs via reação de condensação da tiossemicarbazida com o aldeído correspondente.....	45
Figura 17: Série de TSCs avaliadas neste trabalho.....	46
Figura 18: Resultado <i>re-docking</i> 3kku com seu ligante co-cristalizado.....	49
Figura 19: Mecanismo de ação proposto para as TSCs frente a cruzaina.....	55
Figura 20: Isômero E e Z das TSCs com suas formas tautoméricas	56
Figura 21: Ancoragem da TSC H7 e suas interações.....	
Figura 22: método de fluorimetria com o substrato Z-Phe-Arg-AMC e ϵ cruzaina originando o composto fluorescente aminometilcumarina (AMC).....	61
Figura 23: Correlação linear entre os dados de inibição da cruzaina (IC ₅₀) com os scores referentes às funções de pontuação da docagem molecular via <i>software Graphpad prism 9.5.1</i>	62

Figura 24: Correlação linear entre os dados de inibição da cruzafina (IC ₅₀) com os scores referentes às funções de pontuação da docagem molecular via <i>software Graphpad prism 9.5.1</i>	63
Figura 25: Compostos com resultados mais promissores nos ensaios <i>in silico</i> e <i>in vitro</i>	64
Figura 26: Estruturas dos compostos H3 e H15 com o grupo nitro destacado.....	65
Figura 27: Estrutura dos compostos H5 e H8 com o grupo metóxi destacado.....	66
Figura 28: Estrutura dos compostos H4 e H12 com o substituinte cloro em destaque.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
AMC	7-amino-4-metil cumarina
Bz	Benznidazol
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC ₅₀	Concentração citotóxica mínima de 50%
CDC	Do inglês <i>Disease Control and Prevention Center</i> (Centro de Prevenção e Tratamento de Doenças)
CLogP	Do inglês <i>Octanol-water partition coefficient</i> (Coeficiente de partição octanol/água)
DC	Doenças de Chagas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNs	Doenças negligenciadas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPC	di-2-piridilcetona 4-ciclohexil-4-metil-3-tiosemicarbazona
EUA	Estados Unidos da Américas
GOLD	Do inglês <i>Genetic Optimisation for Ligand Docking</i> (Otimização Genética para docagem de Ligantes)
GPQuimMedBio	Grupo de Pesquisa em Química Medicinal e Biológica
IC ₅₀	Valor da concentração de um inibidor necessária para reduzir pela metade a atividade
LBDD	Do inglês <i>Ligand-based drug design</i> (Planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante)
LIT	(do inglês <i>Liver Infusion Triptose</i>)
MTS	brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio – Sal de tetrazólio
MMFF94	Do inglês <i>Merck Molecular Force Field</i> (Campo de Força Molecular da Merck)
nALH	Do inglês <i>Hydrogen bond acceptor numbers</i> (Números aceptores de ligação de hidrogênio)
nDLH	Do inglês <i>Hydrogen bond donor numbers</i> (Números de doadores de ligação de hidrogênio)

Nfx	Nifurtimox
OMS	Organização Mundial da Saúde
On line	Tempo real
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
PBPK	Do inglês <i>Physiologically based Pharmacokinetics</i> (farmacocinética baseada em fisiologia)
PDB	Do inglês Protein Data Bank (Banco de dados de proteína)
PLOS	Revista científica <i>Public Library of Science</i>
QSAR	<i>Quantitative Structure-activity relationship</i> (relação estrutura atividade quantitativa)
R ²	coeficiente de determinação ou uma medida estatística que representa a proporção da variância de uma variável dependente que é explicada por uma variável ou variáveis independentes em um modelo de regressão.
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Do inglês <i>Root-Mean-Square Deviation</i> (Raiz quadrada do desvio quadrático médio)
RPMI	Do inglês Roswell Park Memorial Institute (Memorial instituto Roswell Park)
RTECS	Do inglês <i>Registry of Toxic Effects of Chemical Substances</i> (Registro de Efeitos Tóxicos de Substâncias Químicas)
SAR	Do inglês <i>Structure-activity relationship</i> (Relação estrutura atividade)
SBDD	Do inglês <i>Structure-based drug relationship</i> (Planejamento de fármacos baseados na estrutura do receptor)
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanossoma cruzi</i>
TPSA	Do inglês <i>Topological Polar Surface Area</i> (Área de superfície polar topológica)
TSCs	Tiossemicarbazonas
Z-Phe-Arg-AMC	Benzoiloxicarbonil-fenilalanina-arginina-aminometilcumarina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ferramentas de cálculos de descritores moleculares	31
Tabela 2: Exemplos de base de dados gratuitas	32
Tabela 3: Alguns programas utilizados na realização da docagem molecular	35
Tabela 4: Exemplos de plataformas atualmente disponíveis para prever cálculos <i>in silico</i> ADMET	36
Tabela 5: Principais funções pontuadas em programas de predição farmacocinética.....	37
Tabela 6: Pontuação <i>re-docking</i> da molécula 3KKU (PDB).....	49
Tabela 7: Encaixe visual das TSCs e suas Interações ligante - receptor	51
Tabela 8: Pontuações obtidas na docagem para as TSCs com a proteína 3KKU (PDB).....	57
Tabela 9: Ensaios de inibição da enzima cruzaina, ensaios fenotípicos e citotoxicidades das TSCs	59
Tabela 10: Correlação entre a docagem e a inibição da cruzaina e <i>T. cruzi</i> pelas TSCs.....	60
Tabela 11: Parâmetros de toxicidade obtidos pelo <i>software Osiris</i> [®]	68
Tabela 12: Perfil farmacocinético das TSCs a partir da plataforma <i>Molinspirations</i> [®]	70
Tabela 13: Perfil farmacodinâmico das TSCs pela plataforma <i>Mollisintpiration</i> [®]	72

SUMÁRIO

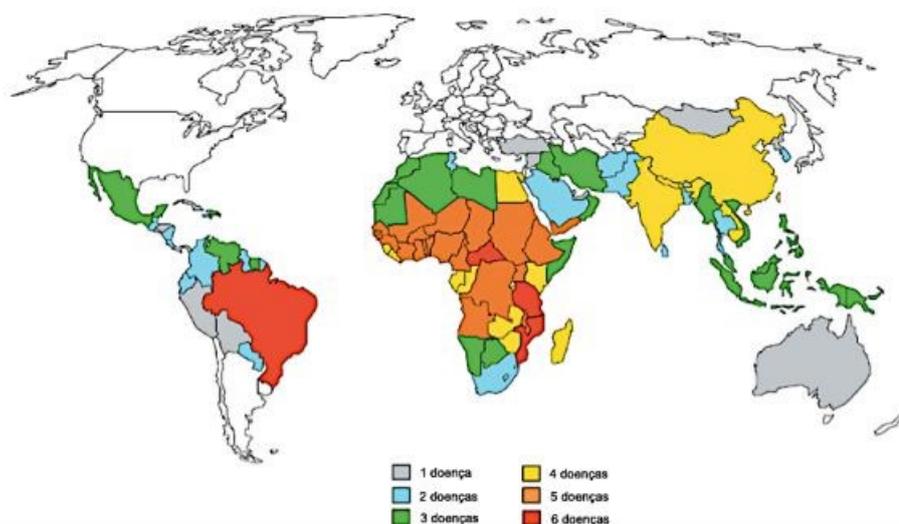
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	18
2.1 GERAL.....	18
2.2 ESPECÍFICOS.....	18
3. REVISAO DE LITERATURA	19
3.1 A doença de Chagas.....	19
3.2 Protease cruzaina: um potencial alvo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
3.3 As técnicas <i>in silico</i>	29
3.3.1 Docagem molecular.....	33
3.3.2 Modelagem farmacocinética baseada em fisiologia (PBPK).....	36
3.4 As tiossemicarbazonas.....	38
4. PARTE EXPERIMENTAL	40
4.1 Materiais e métodos utilizados nos estudos <i>in silicos</i>	40
4.2 Estudo <i>in silico</i>	41
4.3 Ensaio <i>in vitro</i> contra a enzima cruzaina.....	42
4.4 Ensaio <i>in vitro</i> com o <i>T. cruzi</i>	43
4.5 Ensaio de Citotoxicidade em Fibroblastos Humanos HFF1.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Testes <i>in silicos</i>	45
5.1.1 Preparação para a docagem molecular.....	45
5.1.2 <i>Re-docking</i> molecular.....	47
5.1.3 Docagem das TSCs.....	50
5.2 A inibição da cruzaina, ensaios fenotípicos e citotoxicidade das TSCs.....	59
5.3 Perfil farmacocinético, toxicidade e farmacodinâmica <i>in silico</i>	67
6.0 CONCLUSÃO	73
7.0 BIBLIOGRAFIAS	74

1. INTRODUÇÃO

É notável que a globalização e o desenvolvimento tecnológico trouxeram diversos meios que dão um novo norteamento ao modo de viver do homem moderno, com novos sentidos, novas ressignificações e novas interpretações no que concerne a saberes e conhecimento. Nesse sentido, a modernização das cidades nos trouxe um advento de inúmeras facilidades e melhores condições de vida, bem como o desenvolvimento de metodologias práticas no que se refere a saúde humana. Apesar disso, as doenças endêmicas ainda coexistem entre nós, sendo pauta importantes em ações no que se refere à saúde global (ANTUNES, BUSATO, LUTINSKI, 2021).

Neste contexto surgem as doenças tropicais negligenciadas, caracterizadas como um conjunto de doenças ocasionadas por parasitas e agentes infecciosos, que atingem principalmente os países e regiões localizados nos trópicos como a África, Ásia e América Latina (Figura 1). Estas doenças apresentam alto grau de mortalidade, e, na maioria das vezes incapacitam ou estigmatizam o paciente, interferindo diretamente na sua qualidade de vida, principalmente dos mais pobres. Estima-se, que mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo esteja contaminada com algum tipo de doença negligenciada (DN) (RIBEIRO et al., 2022).

Figura 1: Números de DN's pelo mundo.



Fonte: Adaptada de SILVA (2018).

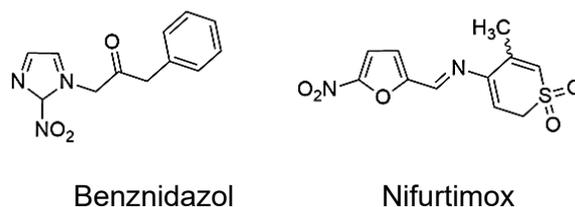
São exemplos de DNs, a tuberculose, a dengue, a leishmaniose e a doença de Chagas (DC). Em relação a DC, estima-se que haja cerca de 12 milhões de pessoas contaminadas em todo o mundo e cerca de 1.156.821 apenas no Brasil, sendo que esse número pode ser muito maior devido às subnotificações (OLIVEIRA, 2019). Regiões como o norte de Minas Gerais, vale do Jequitinhonha e regiões norte e nordeste são consideradas endêmicas para DC (BRITO et al.,2021; FERREIRA et al., 2018).

Apesar de todo o impacto social, as discussões acerca da DC ainda se mostram incipientes quando somadas à falta de iniciativas tanto privadas como públicas, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de fármacos mais eficazes e com menos efeitos adversos. Além da falta de um tratamento eficaz, os países enfrentam problemas decorrentes do surgimento de novos vetores e do aumento de casos decorrentes da transfusão sanguínea, inferindo a necessidade de desenvolvimento de novas moléculas cuja ação seja substancial na inibição do *Trypanossoma cruzi* (*T. cruzi*) protozoário causador da DC (FILHO, 2017).

A DC foi descrita pela primeira vez há mais de um século pelo médico e pesquisador Carlos Chagas, que descreveu a origem, o ciclo e a morfologia, bem como seu principal causador, o protozoário *T. cruzi* (DIAS et al., 2016), cujo vetor é o inseto triatomíneo, hematófago (que se alimentam de sangue), também conhecido como “barbeiro” (SILVA, AVIZ, MONTEIRO, 2020).

O tratamento da DC é limitado ao uso de dois fármacos, introduzidos entre os anos 1960-1970: o nifurtimox (Nfx) e o benznidazol (Bz) (Figura 2).

Figura 2: Fármacos utilizados no tratamento da DC.



Contudo, o uso destes dois fármacos é limitado em virtude dos seus efeitos adversos. Com o uso do Bz, cerca de 30% a 80% dos pacientes apresentam reações de hipersensibilidade, polineurite, depressão da medula óssea, formigamento, erupções cutâneas, fraqueza muscular, entre outras; desses, em média 30%

suspendem o tratamento. Além disso, este fármaco não é recomendado para mulheres grávidas, devido às evidências teratogênicas de seu mecanismo de ação (PONTES et al., 2010; DIAS et al., 2016). Já ao Nfx possui efeitos adversos similares ao Bz, mas com agravamentos no sistema digestivo, perda de peso e acometimento de efeitos psíquicos (DIAS et al., 2016), além de efeitos genotóxicos, o que acarretou seu desuso em vários países, incluindo o Brasil (DAVANÇO, 2015).

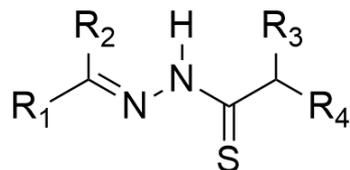
Portanto, apesar de ambos terem mostrado eficácia relevante no tratamento, são utilizados com cautela, devido a seus inúmeros e graves efeitos adversos (ANDRICOPOULO; FERREIRA, 2020), fazendo com que novas pesquisas e novos alvos sejam estudados, de forma a desenvolver fármacos mais assertivos e menos tóxicos.

Nesse contexto, alvos bastante conhecidos e validados para o tratamento da DC são as proteases. A cruzaina (E.C 3.4.22.51) é a principal cisteíno-protease de *T. cruzi* e está entre os alvos mais explorados no desenvolvimento de candidatos a novos fármacos para a DC. A cruzaina é expressa durante todo ciclo de vida do parasita, sendo importante para o desenvolvimento, sobrevivência e diferenciação do protozoário, além de ser responsável por sua nutrição, evasão do sistema imune e invasão de novos tecidos (SAJID et al., 2011).

Estudos bioquímicos e farmacológicos, demonstraram a habilidade de inibidores da cruzaina em reduzir significativamente a carga parasitária em diversos modelos *in vivo* da doença. Adicionalmente, estudos de biologia molecular têm demonstrado que parasitas geneticamente modificados para expressar níveis reduzidos da enzima perdem sua capacidade de invadir as células do hospedeiro (NASCIMENTO, 2022; FERREIRA et al., 2014).

Como potenciais candidatos a fármacos no tratamento da DC surgem as tiossemicarbazonas (TSCs) (Figura 3), com diversas atividades terapêuticas como: antibacterianas, antifúngicas, antidiabético, antitumoral, antiproliferativo, anticâncer, anticorrosão e anti-inflamatório (MENDES, 2019; PRAJAPATI, PATEL, 2019).

Figura 3: Estrutura geral das TSCs.



Legenda: R₁, R₂, R₃, R₄ = H, alquil, aril

As TSCs são uma classe de ligantes doadores de nitrogênio e enxofre. Sua funcionalidade, diversidade estrutural e aplicações biológicas as tornam excelentes candidatas ao desenvolvimento de fármacos anti-chagásicos (PRAJAPATI, PATEL, 2019), apresentando resultados promissores e não citotóxicos para células de mamíferos quanto à inibição da cruzaina (KANSO et al., 2021; JAWARI et al., 2022; DEVI, KUMAR, TAXAK, 2022; GABER, 2021).

Nesse sentido, a pesquisa e o desenvolvimento (P&D) de novos fármacos envolvem, além do conhecimento de diferentes áreas, como biologia e química, que vão desde simples identificação, conhecimento de atividade biológica e mecanismo de ação (OLIVEIRA, 2019), custos elevados e tempos operacionais longos, podendo variar entre 10 a 14 anos, e ainda assim, muitos são abandonados ou descartados devido a problemas relacionados a sua farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade (GONÇALVES, 2011; VIEGAS-JUNIOR, 2007).

Diante do exposto, o presente trabalho envolve o estudo *in silico* de uma série de TSCs como potenciais candidatos frente a inibição da cruzaina, para os quais foram investigados o perfil farmacocinético, o perfil toxicológico e a docagem molecular (do inglês *molecular docking*) associada ao desenvolvimento de modelos farmacofóricos para a identificação das características estruturais essenciais para o estabelecimento de interações intermoleculares com a cruzaina. Além destes, foram realizados experimentos *in vitro* envolvendo a cinética enzimática, ensaios fenotípicos e avaliação da citotoxicidade.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar os aspectos farmacocinéticos, farmacodinâmicos, a toxicidade (*in silico*) e atividade tripanocida de uma série de TSCs.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar as propriedades farmacocinéticas (Absorção, Distribuição Metabolismo e Excreção - ADME) e toxicidade por meio de estudos *in silico*;
- Realizar estudos de cinética enzimática para avaliar o perfil inibitório da série de TSCs frente à enzima cruzafina;
- Realizar estudos de docagem molecular para compreender as interações intermoleculares relevantes na inibição enzimática;
- Investigar o perfil citotóxico da série de TSCs utilizando fibroblastos humanos;
- Avaliar o perfil tripanocida da série de TSCs utilizando ensaios fenotípicos.

3. REVISAO DE LITERATURA

3.1 A doença de Chagas

A decorrência das DNs diz respeito às desigualdades sociais e a falta de proposição de novos tratamentos. A indústria farmacêutica tem pouco ou nenhum interesse no desenvolvimento de novos tratamentos por motivos comerciais, visto o público dessas doenças serem de baixa renda e a maioria encontrar-se em países subdesenvolvidos (SILVA et al., 2021).

Diversas medidas têm sido tomadas para minimizar a incidência das DNs em todo o mundo. Dentre elas estão aquelas relacionadas à criação de políticas públicas que melhorem as condições básicas nas regiões mais vulneráveis, como o acesso à água potável, ao esgoto e ao saneamento básico, o acesso à educação e o combate aos fatores responsáveis pelo surgimento da doença (BISELLI et al., 2022; WHO, 2013).

Neste panorama, doenças como Zika, Dengue, Febre Amarela, Chagas, Raiva, Leishmaniose e Chikungunya se agravam e debilitam inúmeras pessoas ano a ano em países da América Latina e na África por exemplo (HOMMA, FREIRE, POSSAS, 2020), sendo que atualmente a DC é a que mais mata entre as doenças infecto parasitárias e atinge principalmente pessoas acima dos 45 anos, em que se destacam as complicações relacionadas à fase crônica da doença (ARAUJO; SABROZA; SILVA, 2017).

Estima-se que cerca de 70 milhões de pessoas estejam em risco iminente de contaminação pela DC e especula-se que anualmente mais de 12.000 pessoas vão a óbito devido às complicações derivadas da doença. Mesmo sendo mais presente em países da América latina, diversos países desenvolvidos passaram a monitorar a doença em virtude dos fenômenos da globalização, que aumenta fortemente os fluxos migratórios em todo o mundo (PERES et al., 2018). Esses influxos são responsáveis pela disseminação principalmente em regiões da Europa, Oceania e Ásia (OLIVEIRA, 2020).

Se comparado a outras doenças, no Brasil a DC manteve cerca de 52.000 mortes entre os anos de 2007 e 2017, representando uma média de 4.000 mortes por ano advindas principalmente de complicações cardíacas, superando a média de

óbitos atribuídos à tuberculose e a hepatites virais (4.616 e 2.815 respectivamente) (Figura 4) (BRASIL, 2020).

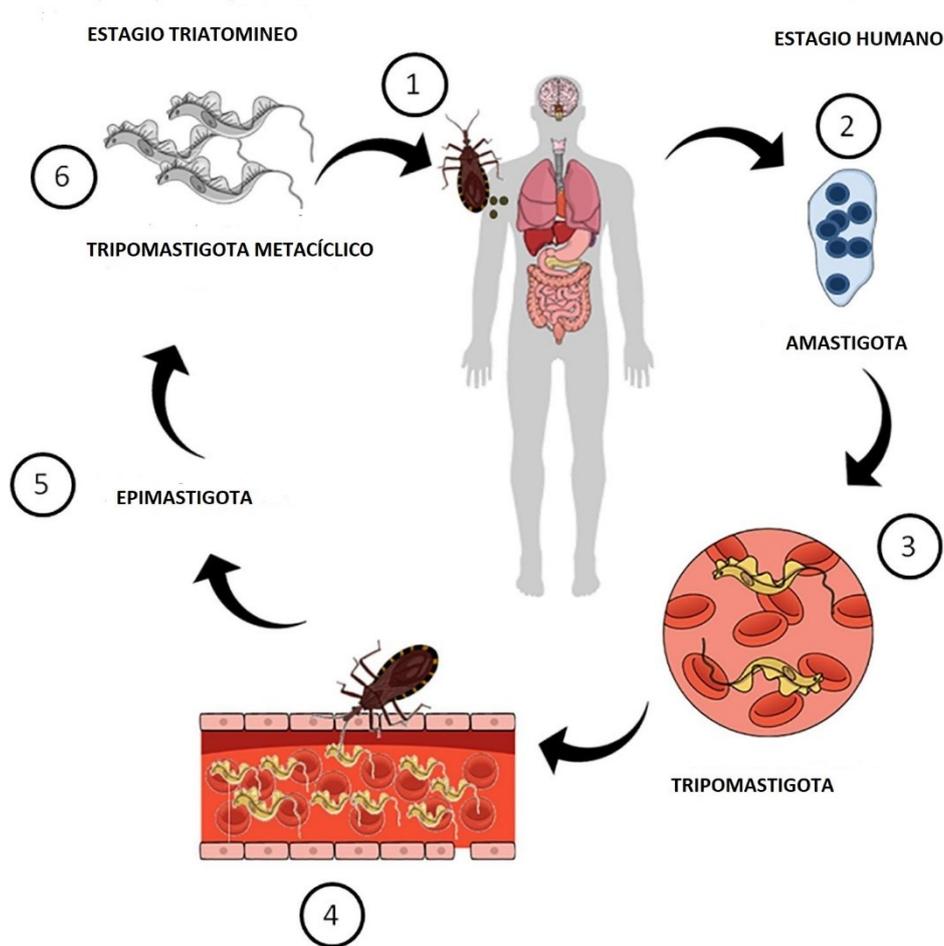
Figura 4: Números de óbitos da DC comparadas com outras doenças infecciosas e parasitárias em que o eixo x representa os anos e eixo y a média de mortes notificadas segundo Ministério da Saúde.



Fonte: BRASIL, 2020.

O modo de transmissão da DC acontece de acordo com a região afetada. Nas regiões endêmicas a principal forma de transmissão ocorre por intermédio de insetos vetores triatomíneos que através das fezes espalham a forma *Tripomastigota* metacíclica ocasionando a infecção no hospedeiro (Figura 5) (DUARTE-SILVA, et al., 2020). Em regiões não endêmicas a transfusão de sangue é a forma que mais contribui para o exacerbamento da doença. Somado a isso, a penúria ambiental, as mudanças climáticas, o agronegócio e a precariedade do sistema de saneamento básico em determinadas regiões aumentam a transmissão do *T. cruzi* (DIAS et al., 2015).

Figura 5: Ciclo de vida do protozoário *T. cruzi*.



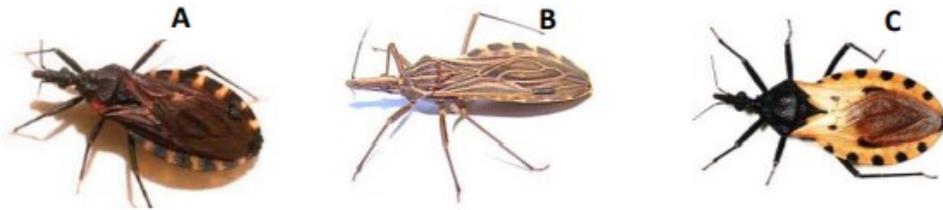
Fonte: Adaptada de DUARTE-SILVA et al., 2020.

Ao se observar o ciclo do protozoário (Figura 5), a forma tripomastigota metacíclica (1) presente nas fezes do triatomíneo, entra no organismo humano através de mucosas, membranas, mordidas e/ou agressão mecânica, onde se convertem na forma amastigota (2) que se multiplicam dentro da célula. Essa forma amastigota, então se transforma em tripomastigota (3) causando a lise da célula dentro da corrente sanguínea. A partir disto, os insetos Triatomíneos (4) são infectados ao picar mamíferos contaminados com a forma Tripomastigota que no intestino do inseto se transforma em Epimastigota (5), onde novamente se transforma em tripomastigota metacíclica (6), que é liberado nas fezes do inseto reiniciando novamente o ciclo.

O barbeiro (Figura 6) é considerado um dos principais vetores do *T. cruzi*. Entretanto, com o combate e ações dinamizadas a este vetor, e conseqüentemente com o aumento da população, mudanças sociais, higienização e melhorias sanitárias, fizeram com que outros vetores passassem a ganhar importância e inferir diretamente

na propagação da doença. No Brasil destacam-se espécies como: *T. pseudomaculata*, *T. rubrovaria*, *R. neglectus*, *R. nasutus*, *P. lutzi*, *P. geniculatus*, entre outras (GALVAO, 2014).

Figura 6: Principais vetores do *T. cruzi* na ordem correspondente: (A) *triatoma infestans* (B) *Rhodnius prolixus* (C) *Triatoma dimidiata*.

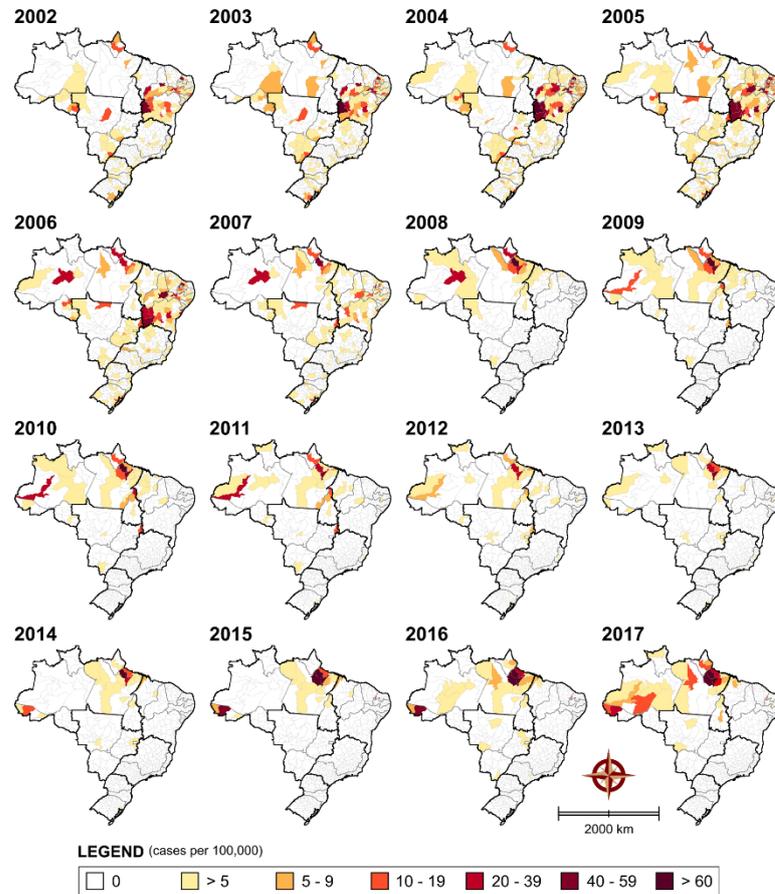


Fonte: Adaptada de GUERRA (2019).

O *T. cruzi* apresenta uma família diversa e complexa com mais de 130 espécies (GUARNERI; LORENZO, 2017) sendo o homem um de seus principais hospedeiros. É importante esclarecer que o parasita não irrompe a pele ou tecido intacto, pois suas principais vias de contaminação são as mucosas, lesões e úlceras. A facilidade em adquirir potencialidade de infecção do parasita está diretamente ligada ao sucesso de adaptação e desenvolvimento intestinal da cepa em relação às particularidades de cada vetor e ao ambiente habitável (AZAMBUJA; GARCIA, 2017).

Em solo brasileiro, houve uma tendência heterogênea na distribuição da DC entre os anos de 2001 e 2018 com aumento significativo de casos no estado do Pará, principalmente em microrregiões como Furo de Breves onde a taxa de incidência foi de 170,78 casos em cada 100.000 habitantes. Em 2014, em movimento similar, regiões do estado do Acre registraram média de 44,75 casos em cada 100.000 habitantes. Contudo, zonas antes consideradas endêmicas tiveram redução no número de notificação, a exemplo do estado da Bahia, Rio grande do Norte, Piauí e Pernambuco (Figura 7) (SANTOS et al., 2020; BRASIL, 2020).

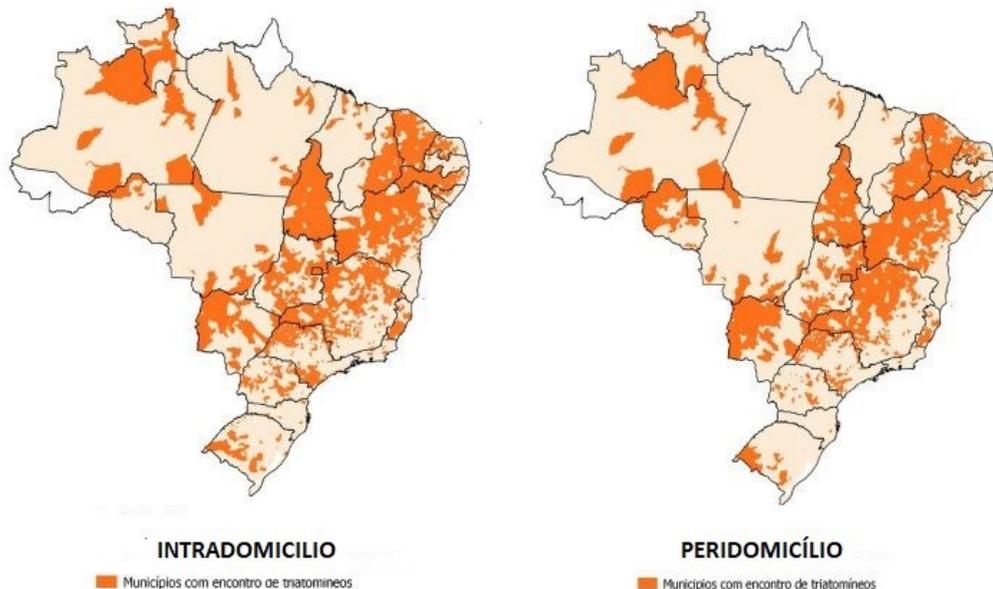
Figura 7: Incidência de DC por estado no período de 2001 a 2018.



Fonte: Adaptado de SANTOS et al., (2020).

A mesma pesquisa enfatiza o número alarmante de vetores encontrados tanto dentro, quanto nas adjacências dos domicílios (Figura 8), denotando a necessidade de uma resposta assertiva no que se refere a ações de combate a vetores.

Figura 8: Municípios com ocorrências de *Triatomíneos*.



Fonte: Adaptada de Brasil (2020).

A DC envolve comumente duas fases: a aguda e a crônica. A fase aguda é considerada leve e a pessoa infectada pode ser assintomática ou apresentar sinais moderados, como febre prolongada, dor de cabeça, fraqueza intensa e inchaço no rosto e pernas. Do ponto de vista laboratorial, esta fase também é chamada de parasitemia patente, pois o parasita é facilmente localizado por meio de exames de sangue do paciente (BRENER, 1962). Já a fase crônica pode ser marcada desde quadros assintomáticos até sintomáticos com complicações no sistema cardiovascular e digestivo, causando muitas vezes lesões irreversíveis e até mesmo fatais (ALEXANDRE; TESTON; ZANUSSO, 2014).

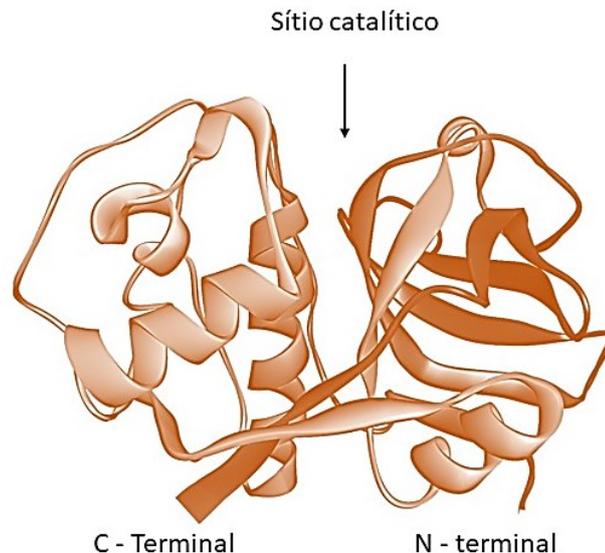
Em síntese, a situação da DC no Brasil ainda é preocupante, principalmente no que concerne à identificação da doença, pois muitas vezes o paciente convive anos sem desenvolver qualquer sintoma. Estudos epidemiológicos afirmam que a DC tem diferentes perfis clínicos: enquanto alguns são assintomáticos, outros apresentam cardiopatias, lesões digestivas e distúrbios neurológicos. Entretanto, os assintomáticos, podem desenvolver sintomatologia clínica posterior (ZINGALES, 2018), o que denota uma necessidade de um aprofundamento nas pesquisas especialmente no que concerne ao desenvolvimento de tratamentos mais eficientes e mais toleráveis.

3.2 Protease cruzaina: um potencial alvo biológico do *Trypanosoma cruzi*

Também chamadas de enzimas proteolíticas, as proteases são responsáveis pela degradação das ligações peptídicas (ligações covalentes), e também por ser um dos principais mecanismos de invasão e evasão celular no sistema imune do hospedeiro (GUERRA, 2019; PAULI, 2016).

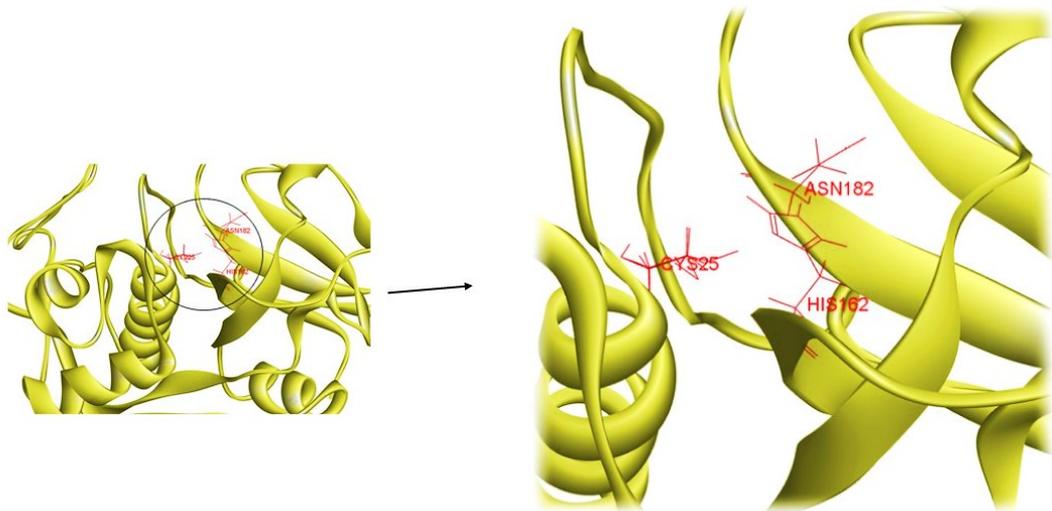
As proteases são formadas por três aminoácidos principais: a cisteína (Cys), histidina (His) e glutamina (Gln), sendo as duas primeiras estabilizadas por ligação iônica pela glutamina (WIGGERS, 2011). No *T. cruzi* a protease mais conhecida e principal via de estudos para novos agentes terapêuticos é a cruzaina e seu número segundo a comissão de classificação de enzimas é EC 3.4.22.51. A cruzaina pertence à família Papaína, sendo sua estrutura formada por dois domínios hélices-alfa e por fita-beta antiparalelas (Figura 9) (OLIVEIRA, 2019). A área ativa da cruzaina fica entre os dois domínios, onde ficam resíduos de aminoácidos **Cys 25**, **His162** e **Asn182**, conhecidos como a tríade catalítica (Figura 10) (PAULI, 2016; AVELAR, 2014; OLIVEIRA, 2019).

Figura 9: Estrutura 3D da protease Cruzaina (PDB ID 3KKU).



Legenda: A imagem foi preparada no programa *Discoverey Studio*[®].

Figura 10: Tríade catalítica da enzima cruzaina.

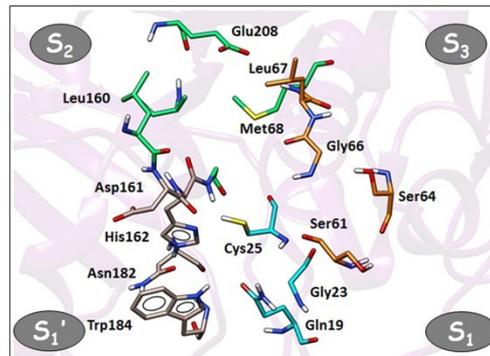


Legenda: A imagem foi preparada no programa *Discovery Studio*®.

A cruzaina foi identificada em todas as formas de vida do *T. cruzi* e está relacionada ao seu desenvolvimento e nutrição, à invasão de células do hospedeiro, como antígeno imunodominante e ativação de caspases para morte celular programada, sendo considerada fundamental para a sua sobrevivência (HERRERA-MAYORGA, 2019; FONSECA, 2011).

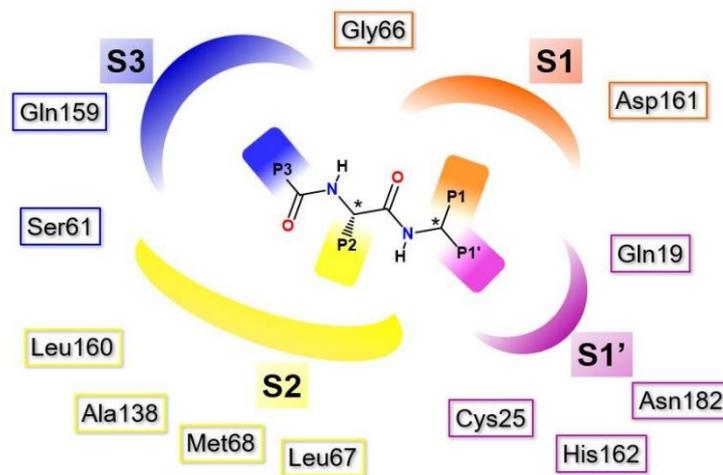
Além disso, este sítio ativo da cruzaina é subdividido em 4 subsítios: S1, S2, S3 e S1' (Figura 11). A mesma classificação é utilizada para caracterizar as regiões dos inibidores que interagem na região correspondente com os subsítios da cruzaina (P1, P2, P3, P1') (Figura 12). Cada subsítio da cruzaina mantém características únicas em relação a sua interação com os inibidores. O subsítio S1 é capaz de acomodar ligantes volumosos e dependendo da substituição, pode aumentar a atividade inibitória aproximando a porção eletrofílica ao enxofre da cisteína. Resíduos de aminoácidos capaz de ligar ao substrato P1 são: **Gln19, Gly23, Ser24, Asp161 e His162** (LAMEIRO, 2020).

Figura 11: Subsítios da enzima cruzaina, PDB ID 3KKU.



Fonte: Adaptado Oliveira (2019).

Figura 12: Subsítios da cruzaina com seus análogos no ligante.



Fonte: Adaptada Lameiro (2020).

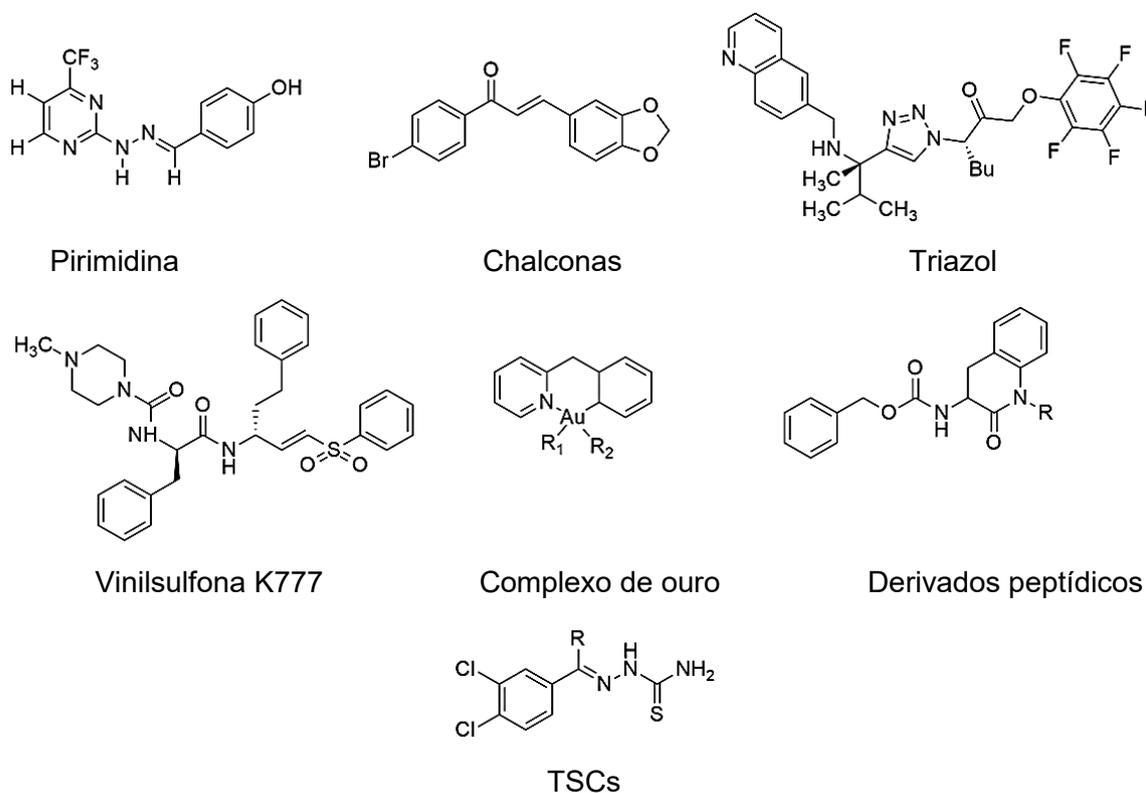
O subsítio S2 é o principal responsável pela ligação entre a enzima com o substrato e possui as estruturas **Met68**, **Ala138**, **Leu160** e **Gly163**. Além do caráter hidrofóbico, ocasionado pelos resíduos mencionados, este subsítio possui em sua extremidade o resíduo **Glu208** com carga negativa, que interage com grupamentos contendo carga positiva (OLIVEIRA, 2019). E ainda, possui característica ácida, confere flexibilidade e, é o principal responsável por diferenciar a cruzaina de outras proteases inclusive as humanas (PAULI, 2016).

O subsítio S3 é o menos explorado nos estudos de relação estrutura atividade (SAR - do inglês *Structure-activity relationship*). Além acomodar grupos volumosos, essa região torna se importante, devido a sua possibilidade em modular propriedades físico-químicas e biológicas. Por fim, o subsítio S1' além do seu caráter polar, permitindo-lhe fazer interações do tipo ligações de hidrogênio com os ligantes, possuem a capacidade de acomodar grupos volumosos, principalmente os aromáticos (PEÑA, 2022; LAMEIRO, 2020).

Nesse sentido, a facilidade da cruzaina em bloquear o ciclo de vida do parasita *T. cruzi* é um dos fatores que justificam seu uso como alvo nas pesquisas. Além disso, sua capacidade e importância foi validada em pesquisas tanto *in silico* quanto *in vitro* para o desenvolvimento de protótipos para o tratamento da DC (SAJID et al., 2011).

Diversas classes de compostos orgânicos foram testadas e aprovadas por suas capacidades inibitórias frente a cruzaina como **pirimidinas, chalconas, triazois, vinilsulfonas, complexo de ouro, derivados peptídicos, TSCs**, entre outros (Figura 13) (REYES, 2019; ARRUDA et al., 2020; ESPINDOLA, 2015; FONSECA, 2011).

Figura 13: Classes de compostos testados com capacidade inibitória da cruzaina.



Entretanto, apesar de apresentarem resultados promissores, a desvantagem toxicológica de algumas moléculas resultou na necessidade de pesquisa e testes mais aprimorados em relação a cruzaina. É o caso por exemplo da vinilsulfona K777, que apresentou uma potente inibição da cruzaina no *T. cruzi*, mas mostrou um baixo perfil de segurança em camundongos e caninos (FERREIRA, 2019; HERRERA-MAYORGA, 2019).

Além disso, grande parte desses compostos são suscetíveis à hidrólise, rápido metabolismo e baixa disponibilidade, o que traz à necessidade de investigação de compostos mais estáveis em meio biológico (LAMEIRO, 2020; WIGGERS, 2011).

3.3 As técnicas *in silico*

Estudos afirmam que entre os anos de 1975 e 1999, os dados referentes à P&D de novos fármacos para o tratamento da DC representaram apenas 0,9% de todos os medicamentos produzidos e aprovados no mesmo período. A previsão de rentabilidade baixa é um dos principais fatores que impulsionam a falta de interesse das indústrias farmacêuticas na pesquisa de medicamentos em relação a DC, uma vez que o principal alvo são pessoas de baixa renda (MONTEIRO, 2019).

Desta forma, na P&D de um novo candidato a fármaco, diversas técnicas são utilizadas para a otimização do tempo e custos (ANDRICOPOULO; FERREIRA, 2020). Nesse sentido, técnicas de modelagem molecular alavancaram de forma considerável o desenvolvimento de programas estratégicos para triagem *in silico*, uma ferramenta computacional que apresenta exatidão e reprodutibilidade elevadas e permitindo a otimização do tempo e dos custos operacionais, uma vez que envolvem custos menores que os métodos convencionais. Além disto dispensam experimentos utilizando animais (SRINIVAS et al., 2014; MAFUD et al., 2016; GONÇALVES, 2011) e se mostra uma alternativa prática e consolidada na identificação de compostos com afinidade de ligação (LIMA, 2007).

Estas técnicas, são capazes de gerar dados matemáticos que possibilitam o estudo das propriedades farmacológicas e toxicológicas dos compostos, além de relacionar aspectos moleculares, parâmetros geométricos, eletrônicos, propriedades, comportamentos, compostos bioativos e sua possível atividade biológica (SCANDELA, 2021).

Os primeiros modelos tecnológicos para aferir parâmetros relacionados a farmacocinéticas e farmacodinâmica surgiram a partir de 1961 (PAPPALARDO et al., 2019), mas ganharam visibilidade a partir da década de 70, e seu apogeu ocorreu no início do século XXI, quando os mecanismos tecnológicos e a vasta quantidade de dados biológicos disponíveis foram capazes de prever com aferição e compatibilidade os parâmetros funcionais do corpo humano (AGAMAH et al., 2020).

Nesse interim, não só os núcleos de pesquisas, mas agências de regulações governamentais, passaram a considerar pesquisas e evidências científicas a partir de dados e previsões tecnológicas originadas de técnicas de modelagem e simulação computacionais conhecidas como técnicas *in silico* (VICECONTI et al., 2020).

As técnicas *in silico* são parâmetros computacionais com a finalidade de confirmar ou gerar novos dados acerca de pesquisas, desenvolvimento de moléculas e, de uma forma geral visar a redução do uso de animais e aumentar a segurança em humanos (VICECONTI et al., 2020; ALMEIDA et al., 2010; AGAMAH et al., 2020). São responsáveis por antecipar o conhecimento das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas essenciais para a apresentação de um novo composto. De forma a entender o que o “organismo faz com o fármaco”, são avaliados os processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) (PEREIRA, 2007), além de identificar similaridade e dissimilaridades que melhor expliquem a doença de modo a enriquecer o escopo de análise e classificação de modo a aumentar as prerrogativas no que se refere a descoberta de novas drogas (AGAMAH et al., 2020).

Inúmeras técnicas computacionais são utilizadas nos testes *in silico* com a finalidade de aprimorar e aumentar a previsão e confiabilidade dos resultados, dentre elas tem-se as ferramentas de predição do metabolismo do complexo citocromo p450 e seus metabolitos, de predição dos aspectos cinéticos relativos ao ADMET e ferramentas relacionadas à solubilidade, lipofilicidade, aspectos enzimáticos, entre outros (AGAMAH et al., 2020; KAZMI et al., 2019).

As técnicas *in silico* fazem uso do que comumente se chama de descritores moleculares que são caracterizados por um conjunto de dados experimentais análogos aos diferentes tipos de atividades biológicas com suas propriedades químicas e físicas, ou seja, são uma representação simbólica de uma estrutura molecular na qual suas informações são codificadas matematicamente (ALVES et al., 2018). São bastante utilizados para a elucidações dos estudos de SAR.

Há uma gama de *softwares* e plataforma *on-line* comercialmente disponíveis e amplamente utilizados nas P&D de moléculas que calculam descritores moleculares (Tabela 1). Alguns desses programas são utilizados de forma remota (quando o *software* funciona sem estar conectado à rede) e outros podem ser utilizados no formato *on line* (conectado à rede - Tempo real).

Tabela 1: Ferramenta de cálculo de descritores moleculares.

Software	Sistema operacional utilizado	Nº de descritores	Licença	Disponível
<i>ADMET Predictor</i>	<i>Windows</i>	297	Comercial	http://www.simulations-plus.com/software/admet-property-prediction-qsar/
<i>Codessa</i>	<i>Windows</i>	>1400	Comercial	http://www.codessa-pro.com/
<i>Dragão 7.0</i>	<i>Windows/Unix/Linux</i>	5270	Comercial	https://chm.kodesolutions.net/products/dragon.php
<i>MOE</i>	<i>Windows/Unix/Linux</i>	>400	Comercial	http://www.chemcomp.com/MOE-Cheminformatics_and_QSAR.htm
<i>Pre-ADMET</i>	<i>Windows</i>	955	Comercial	https://preadmet.qsarhub.com/
<i>Abra Babel</i>	<i>Windows/linu x</i>	<20	Livre	http://openbabel.org
<i>MOPAC</i>	<i>Windows/linu x</i>	24	Livre	http://openmopac.net/
<i>EPI Suite</i>	<i>Windows</i>	13	Livre	https://www.epa.gov/tsc-a-screening-tools

Fonte: Adaptado de KAZMI et al., (2019).

O emprego de um banco de dados é uma prática fundamental para caracterizar, desenvolver e avaliar modelos químicos que se assemelham tanto na estrutura quanto na atividade de um composto dentro das técnicas *in silico*. Atualmente, existem mais de 900 bancos de dados identificados e validados disponíveis, sendo que muitos deles são de acesso livre, como o *PubChem*, *Chemspider*, *ChemIDplus*, o *CompTox*, entre outros (Tabela 2).

Tabela 2: Exemplos de bases de dados gratuitas.

Base de Dados	DISPONÍVEL
PubChem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
ChEMBL	https://www.ebi.ac.uk/chembl/
Chemspider	http://www.chemspider.com/
Protein Data Bank	https://www.rcsb.org/
Drug Bank	https://go.drugbank.com/
Zinc	https://zinc.docking.org/

Fonte: Adaptada: REIS, (2020).

As técnicas *in silico* são divididas em duas principais abordagens: a **modelagem molecular** e a **modelagem de dados**. Através da **modelagem molecular** é possível discutir conceitos de polaridade, isomeria, aspectos conformacionais e eletrônicos de determinados compostos. Esta abordagem utiliza modernos programas, como *Materials Modeling 2.0*[®], *Gridmarkets*[®], *Gold*[®], entre outros, capazes de construir, visualizar, analisar, armazenar e interpretar estruturas complexas, provenientes de diferentes reações químicas, além de dar informações referentes à sua atividade biológica (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Os principais métodos utilizados para realizar a modelagem molecular é a triagem virtual e a docagem molecular. A primeira se caracteriza como uma técnica de bioinformática baseada no reconhecimento molecular de uma molécula por um determinado receptor, associando uma base ampla de enzimas e proteínas. Inicia-se pela triagem de fragmentos, modelagem computacional e informações obtidas de literatura com alternância entre hipóteses indutivas e dedutivas, que finalizam na identificação de compostos químicos com atividade biológica, seguidas da escolha do composto líder (composto químico com maiores perfis de acoplamento com o

receptor). Logo em seguida a estrutura química deste composto é utilizada para novas modificações estruturais na tentativa de buscar novos compostos com o máximo de benefícios terapêuticos e o mínimo de danos tóxicos (MAK; PICHKA, 2019). A triagem é bastante utilizada como prática que antecede os cálculos de docagem molecular (SILVEIRA, 2023), caracterizada como uma técnica que verifica e analisa as interações que podem ocorrer entre um ligante e um receptor da forma mais estável possível. Além disso, são parâmetros básicos para elucidar os estudos de SAR, os estudos quantitativos da relação estrutura atividade (QSAR - do inglês *Quantitative Structure-Activity Relationship*) e os estudos que relacionam análises farmacocinéticas com a fisiologia (PBPK, do inglês *Physiologically Based Pharmacokinetics*) (KISHIMA, 2021; OLIVEIRA, 2019).

Outra técnica muito útil para a P&D de fármacos é a modificação molecular ou bioisosterismo. Esta técnica, considerada de sucesso para o lançamento de novos protótipos no mercado, é utilizada na síntese de novas moléculas e consiste na troca de grupamento ou subunidades estruturais que apresentam características físicas, químicas, cinéticas e dinâmicas semelhantes que resultem na capacidade de melhorar a função biológica como agonista ou antagonista e até mesmo de diminuir os efeitos tóxicos e inapropriados (JAYASHREE, NIKHIL, PAUL, 2022). O *software MB-Isoster* é um exemplo de programa computacional capaz de buscar por novas moléculas a partir de modificações bioisostéricas em um composto líder (ELIAS, 2018).

3.3.1 Docagem molecular

O desenvolvimento de medicamentos baseados em computador (CADD - do inglês *computer-based drug design*) é capaz de gerar uma economia de milhões de dólares, tempo e recursos humanos e são divididos em duas principais estratégias: desenvolvimento de fármacos baseado em estruturas (SBDD, do inglês *structure-based drug design*) e desenvolvimento de fármacos baseado em ligantes (LBDD, do inglês *Ligand-based drug design*). Enquanto o SBDD se baseia no conhecimento prévio dos receptores, o LBDD foca no conhecimento das estruturas e grupos farmacofóricos dos ligantes (MATORE, ROY, SINGH, 2022).

A docagem é uma das principais estratégias do planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD), quando a estrutura do alvo é conhecida, e

consiste na predição bioativa de uma molécula (ligante) no sítio ativo de uma macromolécula (receptor) (JUNIOR, 2021; GUIDO, ANDRICOPULO, OLIVA, 2010).

Além disso, a docagem molecular é uma das técnicas de modelagem mais utilizadas para elucidar aspectos e características referentes à energia presente na interação ligante-receptor e prever a preferência molecular na ligação com determinado alvo. Além disso, essa técnica abre caminho para importantes estudos que relacionam a estrutura atividade dos compostos testados (KISHIMA, 2021; OLIVEIRA, 2016; CERA; PANCOTE, 2004).

As interações moleculares geradas pelo docagem apresentam a afinidade que grupos de moléculas possuem em relação a receptores e enzimas biológicas, (interação ligante-receptor), de forma a identificar as moléculas que possuem a maior afinidade na interação (SILVA, 2022), de modo a relacionar os processos catalíticos, descobrimento de novas enzimas, substratos, produtos ou inibidores que ajudem a compor bases estratégicas no desenvolvimento racional de fármacos (REIS; CORREIA; MOMESSO, 2016; SCANDELAI, 2021).

Dentro da modelagem molecular, a docagem, realiza suas funções em duas etapas básicas: *i*) manipulação posicional, conformacional e configuracionais do ligante no alvo e, *ii*) através dos algoritmos da docagem, que atribuem uma nota segundo a função *score* (pontuação matemática) do programa, baseado no grau de afinidade de ligação (CARVALHO, 2011).

O cálculo de docagem se baseia na energia de ligação molecular entre os compostos candidatos e o alvo, ou seja, os resultados obtidos demonstram através de dados computacionais valores de energia aproximados de cada ligante para com o alvo escolhido, sendo que, quanto menor a energia para a ligação de determinada molécula ao sítio alvo, maior é a probabilidade dessa molécula apresentar melhor atividade biológica (BARROS, 2015). Nos procedimentos convencionais, a análise e o cálculo dessa dinâmica molecular é mais complexa e tem um custo computacional maior, o que faz com que a docagem molecular apareça como uma ferramenta importante em otimizar todo esse processo com uma ampla possibilidade de análise e com um número elevados de moléculas (CARVALHO, 2011).

Segundo REIS (2020), no processo de docagem, as moléculas são classificadas levando em consideração a melhor configuração ou posição na interação do ligante - receptor, sendo que as que apresentam as melhores poses e encaixe, e consequentemente os maiores *score* são as mais promissoras para o alvo em

questão. Esta pontuação é previamente estabelecida no algoritmo utilizado, que gera uma lista decrescente de possíveis moléculas.

Atualmente existem inúmeros algoritmos que fazem uma análise detalhada do ancoramento do ligante ao alvo e são baseados em três tipos: A docagem baseada em modelos, o global e a docagem local. A primeira opção prevê a ligação com o alvo baseado em estruturas de complexos semelhantes, chamados de modelos. Esse tipo de análise é, na maioria das vezes, substituído pelo global e/ou local em virtude da grande quantidade de modelos disponíveis nessas opções. Um programa que possui algoritmos baseado nesse tipo de estudo é o *GalaxyPepDock* (WENG et al., 2020).

Na docagem global o algoritmo faz uma varredura em toda a superfície da proteína para localizar o melhor encaixe. Nesse interim, pode-se citar programas como *pepATTRACT*[®] e *MDockPeP*[®]. Na docagem local, o algoritmo faz uma seleção das melhores pose da ligação em torno do sítio de ligação previamente definido pelo operador. Programas como *AutoDock*[®], *Vina*[®], *Gold*[®] e *Surflex-Dock*[®] retratam bem esse método de análise (Tabela 3) (WENG et al., 2020; VRIES et al., 2017).

Tabela 3: Alguns programas utilizados para a realização da docagem molecular.

Docagem Global	Docagem Local
<i>ZDOCK</i>	<i>Vina</i>
<i>HAWDOCK</i>	<i>Dinc</i>
<i>MDOCKPEP</i>	<i>Gold</i>
<i>FRODOCK</i>	<i>MdockPeP</i>
<i>CABS-DOCK</i>	<i>ADCP</i>
<i>HPEDOCK</i>	<i>Surflex</i>

Fonte adaptada Weng et al., 2020.

Dentro da docagem molecular é comum também a análise de um grupo de moléculas dentro de um sítio ativo ocupado anteriormente por outra molécula. Neste processo as moléculas candidatas necessitam reproduzir a orientação do ligante que está dentro do sítio ativo selecionado classificando-os por pontuações matemáticas. Quanto maior o valor da pontuação, melhor é a interação do ligante com o receptor (MUNIZ, 2018).

3.3.2 Modelagem farmacocinética baseada em fisiologia (PBPK)

A importância em prever o movimento dos fármacos em sistemas fisiológicos é uma das premissas mais importantes ao se pesquisar novas moléculas. Além disso, as técnicas *in silico* contribuem de forma significativa para o aprimoramento e desenvolvimento das pesquisas principalmente no que se refere às técnicas que preveem o movimento fisiológico de drogas como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET). Dessa forma, o modelo PBPK utiliza bases da matemática para relacionar as propriedades físico-químicas e fisiológicas (como gastrintestinal), com os ensaios *in vitro* e com os dados farmacocinéticos *in vivo* de forma a simular um meio mais próximo do plasma e do tecido biológico (KISHIMA, 2021).

Sendo assim, é importante conhecer cada etapa no processo cinético dos fármacos em meio fisiológico, pois estes contribuem diretamente no processo de farmacodinâmica farmacológica. Fatores como absorção intestinal, permeabilidade no sistema nervoso central (SNC), barreira hematoencefálica, volume de distribuição e, hepatotoxicidade, são parâmetros que podem interferir na aprovação ou não de um candidato a fármaco (LAKHERA et al., 2021).

Muitas são as plataformas de operação *on line*, para a predição dos perfis farmacocinéticos *in silico* ADMET, sendo algumas delas apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Exemplos de plataformas atualmente disponíveis para prever cálculos *in silico* ADMET.

Nome	Disponível
SwissADME®	http://www.swissadme.ch/
Osiris®	https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/
ADMETLab®	https://admetmesh.scbdd.com/
pkCSM®	https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/
GastroPlus®	https://www.simulations-plus.com/resource/gastroplus-admet-predictor-module/

Algumas das funções utilizadas nas plataformas de cálculos ADMET envolve parâmetros relacionados a lipofilicidade, absorção intestinal e risco cancerígeno. Na

Tabela 5 constam alguns dos critérios especificados que inferem nas funções de cinéticas fisiológicas, necessárias ao desenvolvimento de fármacos e que são essenciais para os estudos *in silico* e *in vitro*.

Tabela 5: Principais funções pontuadas em programas de predição farmacocinética.

Função	Parâmetro
Absorção	Permeabilidade Caco-2 - Absorção intestinal - Log P
Distribuição	Permeabilidade BBB - Volume de distribuição estacionário (VD _{ss}) - Permeabilidade SNC
Metabolismo	Inibidores citocromo P450 - Substrato CYP2D6/3A4
Excreção	Substrato renal OCT2 - Depuração total
Toxicidade	Rato LD50 - Toxicidade AMES - Dose máxima tolerada recomendada (MRTD) - Hepatotoxicidade

Fonte: Adaptada de PIRES, BLUNDELL, ASCHER, 2015.

Enquanto a docagem procura elucidar os processos relacionados aos modos de ligação e as energias envolvidas no complexo ligante receptor, ferramentas como o *SwissADME*[®], o *Swiss Institute of Bioinformatics*[®] e o *Molinspiration* visam estabelecer relações entre a estrutura dos compostos e sua atividade biológica (MADDEN et al., 2020).

Nesse sentido, um dos parâmetros utilizados nesses estudos e amplamente difundida na química medicinal é a regra dos cinco de *Lipinski* que define aspectos relevantes sobre a farmacocinética de um composto. São eles:

- Massa molar ≤ 500 daltons (Da), relacionada com a facilidade em atravessar as barreiras fisiológicas. Valores acima de 500 Da tendem a ter dificuldade em atravessar membranas;
- Coeficiente de partição octanol/água calculado (cLogP) ≤ 5 . Corresponde à medida quantitativa da lipofilicidade de um composto);
- Número de aceptores de ligação de hidrogênio (nALH) ≤ 10 ;
- Número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH) ≤ 5 . O excesso/baixo número de aceptores ou doadores de ligação de

hidrogênio prejudica a permeabilidade através das membranas biológicas (LIPINSKI; MECKERROW, 2017; DIAS, 2018).

Assim, para um determinado composto a má absorção e a baixa permeabilidade é ocasionado quando a molécula possui mais de 5 doadores de hidrogênio, mais de 10 aceptores de ligação de hidrogênio, LogP maior que 5 e massa molar maior que 500 Da (SANTOS, GONSALVES, ARAÚJO, 2017). Apesar de haver exceções à esta regra, grande parte das pesquisas, principalmente as que se refere ao P&D de fármacos, a utilizam nas etapas iniciais dos estudos *in silico* (MADDEN et al., 2020).

Outros descritores foram inseridos à regra de *Lipinski* como a superfície polar topológica da molécula (TPSA), que se relaciona à formação de ligação de hidrogênio, à permeabilidade da mucosa e estabilidade no trato gastrintestinal (RODRIGUES et al., 2021).

Esses dados são bastante utilizados para compor os estudos de SAR, onde através de dados matemáticos são previstos a atividade biológica da molécula (BUENO, 2013) sendo que tanto o docagem como os testes PBPK ajudam a predizer e correlacionar os aspectos fisiológicos dos candidatos a fármacos.

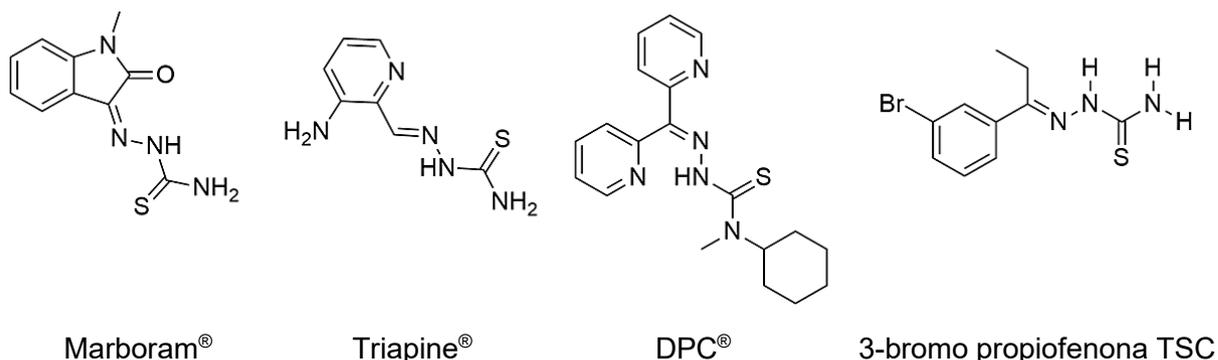
3.4 As tiossemicarbazonas

As TSCs são constantemente citadas em pesquisas para diversos tipos de tratamento como antibacteriano (POLO-CERON, 2019), antiviral (ARSLAN et al., 2021), antiprotozoário (IBÁÑEZ-ESCRIBANO et al., 2022), antifúngicos (BAJAJ, BUCHANAN, GRAPPERHAUS, 2021) e, principalmente como antitumoral (SHAKYA, YADAV, 2020) (Figura 14), sendo comprovado seu efeito inibidor das catepsinas L e B, responsáveis pela progressão tumoral, angiogênese e metástase (SIQUEIRA et al., 2019). Além disto, possuem potente atividade contra a *Leishmania amazonensis* e importante atividade imunomodulatórias que envolvem a resistência à infecção parasitária (TENRAZ, 2018; SILVA, LATORRE, GALATI, 2010).

As TSCs, são moléculas com custo de síntese relativamente baixo e rendimento alto e devido à sua estrutura química é possível obter um grande número de derivados (NWEZE, MBAOJI, LI, 2021); além disso, muitos são os medicamentos à base das TSCs como metisazona (Marboran®), utilizado no tratamento da varíola, a

3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiosemicarbazona (Triapine®) um antitumoral, e a di-2-piridilcetona 4-ciclohexil-4-metil-3-tiosemicarbazona (DpC) está em ensaios para o tratamento do câncer (Figura 14) (GABER et al., 2021).

Figura 14: Exemplos de compostos a base de TSCs utilizados como medicamentos.



Fonte: adaptada (GABER et al., 2021).

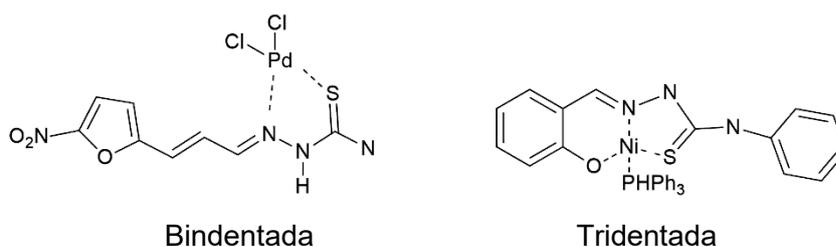
Du et al (2002), demonstraram que o composto 3'-bromopropiofenonatiosemicarbazona (Figura 14) inibiu a enzima cruzaina com uma IC_{50} (valor da concentração de um inibidor necessária para reduzir pela metade a atividade enzimática) de 100 nM e, até mesmo em testes *in vitro* conseguiu curar celular infectadas com *T. cruzi*, sem apresentar efeitos tóxicos em células normais. Após esse resultado, diversas moléculas de TSCs foram sintetizadas, e diversos protótipos foram testados com efeitos tripanocida satisfatórios.

Foi verificado que os compostos a base de aril semicarbazonas apresentaram um potencial de inibição da cruzaina menor que as TSC denotando a importância da função C=S em relação à C=O das semicarbazonas, em preferência à ligação com a cruzaina (MARTINS et al., 2023; ESPINDOLA, 2015; AVELAR, 2014).

Essa potente ação das TSCs frente a cruzaina, está relacionada ao ataque nucleofílico do resíduo Cys25 ao carbono eletrofílico da tiocarbonila, seguida da protonação do enxofre pelo resíduo His159, originando um derivado tetraédrico. Nesse sentido, as TSCs também são capazes de atuar como agentes quelantes no sítio ativo da cruzaina, uma vez que podem existir na forma de tautômeros, que são compostos com mesma fórmula química, com funções diferentes e em equilíbrio na mesma solução, que são capazes de ordenar metais como moléculas neutras

bidentadas na forma de tiona, ou após desprotonação, como ligantes aniônicos, na forma de tiol. A porção tiossemicarbazida, além de conferir à molécula esse caráter quelante, a inserção de aldeídos ou cetonas adequadas com átomos doadores, podem tornar esses ligantes multidentados (Figura 15) (ESPINDOLA, 2015).

Figura 15: Exemplos de complexos metálicos de TSCs bidentada e tridentada.



Fonte: Adaptada ESPINDOLA, 2015.

Caputto *et al* (2011), também afirma através de ensaios de docagem molecular que o acoplamento das TSCs no sítio ativo da cruzaina é resultado de diversas interações com diferentes resíduos presentes no alvo como: resíduos Trp 177, Gln19, His 159 e Ser176.

Essa complexação de ligantes bioativos com metais são importantes na química medicinal, uma vez que tendem a promover um aumento da atividade biológica, modificando os perfis farmacodinâmico, farmacocinético e possibilidade de aumento de atividades e modos de ação (CARDOSO, 2008; GABER *et al.*, 2021).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e métodos utilizados nos estudos *in silico*

A estratégia utilizada neste trabalho foi baseada na metodologia SBDD, levando em consideração estudos preliminares do Grupo de Pesquisa em Química Medicinal e Biológica – GPQuiMedBio. Dessa forma nos estudos *in silico*s foram baseados nos seguintes materiais:

- ✓ O desenho e a visualização bidimensional e tridimensional das moléculas foram realizados no *software* ACD/ChemSketch®

- (<https://acdlabs.com/resources/free-chemistry-software-apps/chemsketch-freeware/>);
- ✓ A edição e a otimização das moléculas foram realizadas utilizando o programa *Avogadro*[®] (<https://avogadro.cc/>);
 - ✓ A predição das interações ligante – alvo através do mecanismo de docagem molecular foi obtida pelo *software* acadêmico *Gold*[®] - *Genetic Optimisation for Ligand Docking* (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>) (REDDY et al., 2020);
 - ✓ Para a Análise e a visualização dos resultados da docagem foi utilizado o *softwares* *Discovery Studio*[®] (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>) e *Pymol*[®] (<https://pymol.org/2/>);
 - ✓ Para medir os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos dos compostos candidatos a fármacos foi utilizado a plataforma *Molinspirations*[®] (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) e *software* *Osiris*[®] (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peol/>);
 - ✓ O *software* *GraphPad Prism 9.5.1*[®] foi utilizado para elucidar os dados de correlações teóricos e experimentais através da elaboração do gráfico de regressão linear (<https://www.graphpad.com/features>).

4.2 Estudo *in silico*

Inicialmente foram desenhadas as estruturas bi e tridimensionais de 16 moléculas de TSCs (ligantes), cujo compostos foram sintetizados por colaboradores. Para isto, foi utilizado o programa *ACD/ChemSketch*[®] e, em seguida as moléculas foram submetidas ao programa *Avogadro*[®] para otimização e preparo para a docagem molecular.

A estrutura da cruzaina 3KKU, escolhida para realizar esta pesquisa foi retirada da lista de proteínas da plataforma *Protein data bank (PDB)*. A escolha da 3KKU se deve à sua alta resolução (1,28Å) e ao fato de não apresentar ligação covalente com a proteína.

Os cálculos de docagem molecular foram realizados pelo programa *Gold*[®] v.2022.1, disponibilizado gratuitamente pela base de estruturas cristalinas da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (bdec.dotlib.com.br/inicio_csds/application/hermes). No total, quatro diferentes

funções de pontuação (**ASP**, **ChemScore**, **GoldScore** e **ChemPLP**) foram empregadas nos cálculos da interação enzima-substrato. Os ligantes foram tratados como flexíveis e a estrutura da proteína como rígida. A determinação do sítio ativo foi feita a partir do centro geométrico do ligante co-cristalizado, gerando uma grade esférica de raio de 6 Å. De forma a reduzir o custo computacional, as águas remanescentes da enzima foram excluídas. As funções de pontuação que apresentaram os menores valores de *RMSD* (do inglês *Root Mean Square deviation*), para a estrutura do ligante co-cristalizado foram selecionadas.

O processo de validação do cálculo aplicado, foi realizado por meio dos estudos de *re-docking*, avaliando o valor de *RMSD* da pose do ligante co-cristalizado que apresentou o menor valor de *score* e o seu alinhamento entre as poses geradas. A análise e observação dos resultados obtidos, foi realizada com auxílio do *software Discovery Studio*[®].

Após a realização do docking foram realizados os testes ADMET *in silico* com as moléculas candidatas e as de referência, Nfx e Bz. Estes testes foram realizados utilizando plataformas online: *Osiris*[®] e *Molinspirations*[®].

4.3 Ensaio *in vitro* contra a enzima cruzaina

O substrato benzoiloxycarbonil-fenilalanina-arginina-aminometilcumarina (Z-Phe-Arg-AMC), ao ser clivado pela cruzaina gera o grupo fluorescente 7-amino-4-metilcumarina, possibilitando que a atividade catalítica desta enzima possa ser medida por fluorescência. No monitoramento da fluorescência das TSCs, foram utilizados os comprimentos de onda de 460 nm para emissão e de 355 nm para excitação. Para a realização dos ensaios enzimáticos, foram utilizadas soluções contendo 1,0 nmol L⁻¹, 5,0 µmol L⁻¹ de substrato, 5 mmol L⁻¹ de DTT, 0,01% de Triton X-100 em um meio tamponado em pH 5,5 por uma solução de NaOAc 0,1 mol L⁻¹. As leituras fluorimétricas foram realizadas em placas de 96 poços, a temperatura constante de 30 °C, durante 300 segundos, em, e os resultados foram expressos em IC₅₀ (PEÑA, 2022).

4.4 Ensaios *in vitro* com o *T. cruzi*

Nos ensaios *in vitro* contra o *T. cruzi* foram utilizadas cepas Tulahuen lacZ, os quais foram geneticamente modificados para expressar o gene β -galactosidase de *Escherichia coli* lacZ, que catalisa uma reação colorimétrica com vermelho de clorofenol β D-galactopiranosídeo (CPRG, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) como substrato. O meio de cultura LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina, foi utilizado para cultivar a forma epimastigota do *T. cruzi*. Para a obtenção das formas tripomastigotas do *T. cruzi*, foram coletadas alíquotas do sobrenadante de culturas celulares já infectadas (VELEZ et al., 2021; TEZUKA, 2019).

No intuito de avaliar a atividade da β -galactosidase, também foram cultivadas – em meio RPMI 1640 (do inglês *Roswell Park Memorial Institute*) sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina – culturas de fibroblastos humanos infectados pelo parasita. Dessa forma, para a realização dos ensaios foram utilizadas placas de cultura de tecidos de 96 poços (Becton Dickinson), nos quais foram adicionadas $2,0 \times 10^3$ células de fibroblastos humanos (presentes em 80 μ L de meio de cultura RPMI 1640 sem vermelho de fenol) em cada poço. A incubação foi feita durante a noite e, no dia seguinte, foram adicionados tripomastigotas, expressando o gene β -galactosidase, em uma quantidade de $1,0 \times 10^4$ (em 20 μ L de meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol) para cada poço. Passados 24 horas, as TSCs foram adicionadas em diluições seriadas de 50 μ L, cobrindo uma faixa de 100 a 0,1 μ M. As diferentes concentrações dos compostos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO), diluídas em RPMI 1640 (sem vermelho de fenol) e aplicadas em duplicata. Após 72 h de incubação, foi realizado uma inspeção em um microscópio para assegurar o crescimento dos controles e esterilidade das culturas. Na sequência, 50 μ L do substrato, contendo CPRG e Nonidet P-40 (concentração final de 0,1%), foram adicionados a cada um dos poços. Para quantificar a atividade remanescente do parasita, após a incubação com as TSCs, as culturas foram submetidas a leitura em espectrofotômetro com leitor de placas automático, utilizando o comprimento de onda de 570 nm. O comprimento de onda escolhido leva em consideração a coloração amarelada dos poços em que o parasita ainda apresenta atividade β -galactosidase e, conseqüentemente, é capaz de

continuar metabolizando o substrato. Os dados obtidos foram transferidos para o *software SigmaPlot*[®] para determinação dos valores de IC₅₀ (PAGOTTI et al., 2023).

4.5 Ensaios de Citotoxicidade em Fibroblastos Humanos HFF1

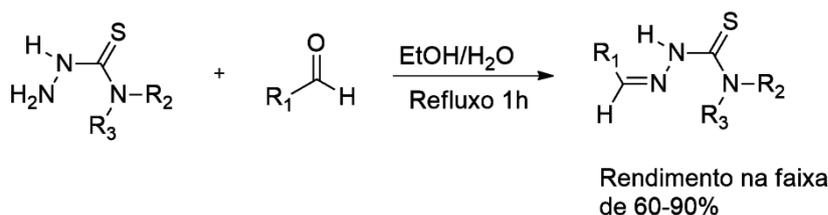
A citotoxicidade dos compostos contra a linhagem celular humana utilizada como célula hospedeira para a determinação da potência dos compostos teste contra o *T. cruzi* foi avaliada pelo método MTS (sal de tetrazólio). A linhagem celular de fibroblastos HFF1 foi plaqueada numa concentração de 2×10^3 células por poço, numa placa de cultura de 96 poços (TPPTM) e incubadas *overnight*. Em seguida, sete concentrações (100 – 0,1 μ M) de cada composto teste foram adicionadas em triplicata aos poços e as placas foram incubadas por 72 h a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% CO₂. Foram adicionados 20 μ L do reagente MTS (*CellTiter 96*[®] *AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega*) aos poços e a placa foi incubada por mais 4 h a 37 °C (CHAVEZ, 2017).

A absorbância em 490 nm foi medida em espectrofotômetro para acessar a redução do reagente MTS pelas células viáveis. A porcentagem de células inviáveis foi determinada com relação aos poços contendo o controle negativo (DMSO 0,5%). Pelo menos dois experimentos independentes foram realizados para cada composto teste (TÉLLEZ, 2020).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação mais simples para obtenção de compostos de TSCs é feita a partir da reação de condensação com aldeídos ou cetonas (Figura 16) ao qual é bastante conhecida devido à rapidez, quimioseletividade e altos rendimentos (GROSSI, 2018).

Figura 16: Esquema reacional de síntese das TSCs via reação de condensação da tiossemicarbazida com o aldeído correspondente.



Fonte: Adaptado SENS et al., 2018.

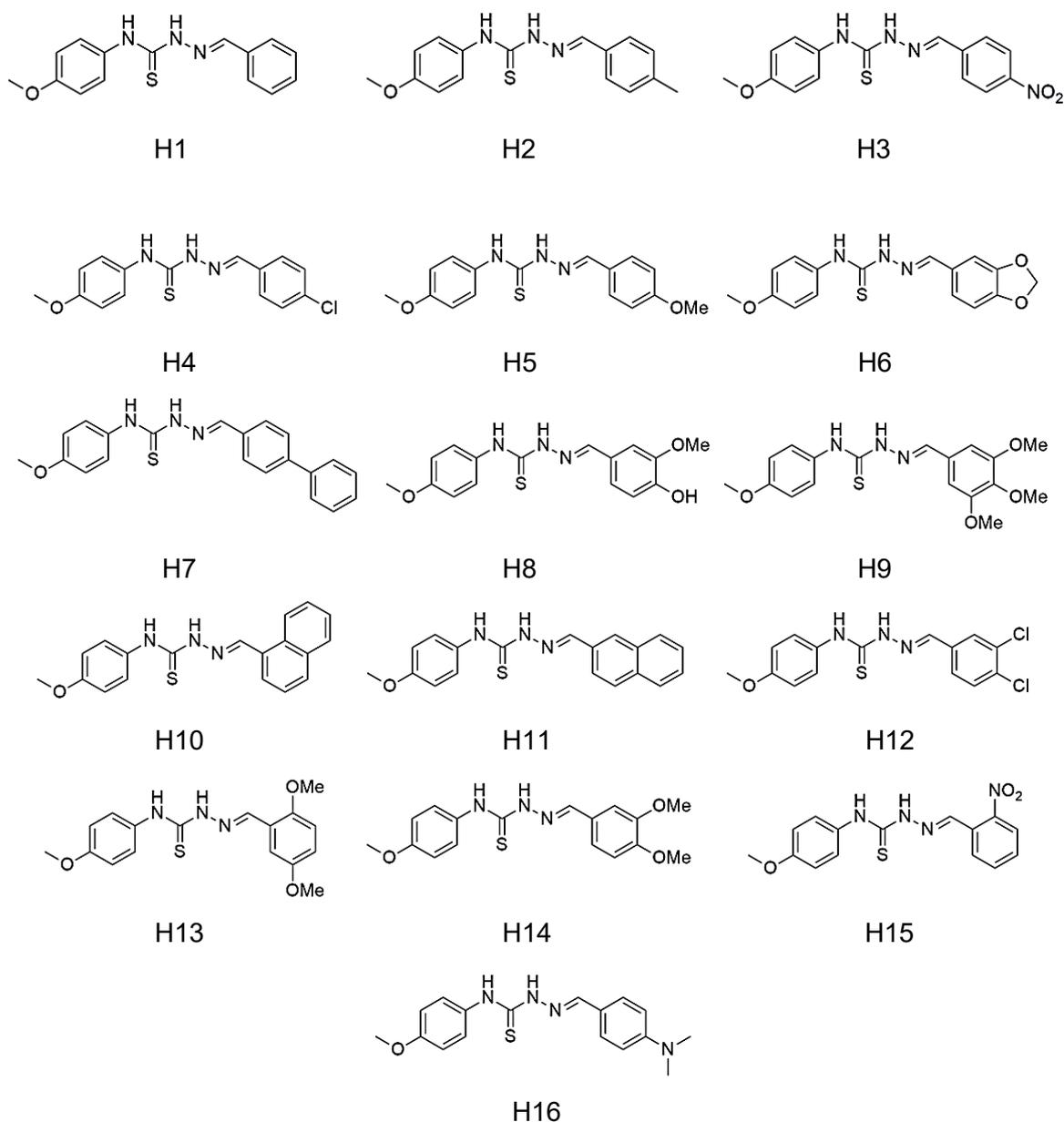
As TSCs, obtidas por colaboração, foram testadas quanto ao seu perfil farmacocinético (*in silico*), quanto à inibição da enzima cruzafina (*in silico* e *in vitro*), quanto ao seu potencial tóxico (*in silico* e *in vitro*) e quanto ao seu potencial tripanocida (*in silico* e *in vitro*), conforme seções a seguir.

5.1 Testes *in silico*

5.1.1 Preparação para a docagem molecular

Nos trabalhos de modelagem molecular foram utilizadas ferramentas de pesquisa tanto *on-line* quanto de uso remoto. Inicialmente, através do programa ACD/ChemSketch® foram desenhadas as estruturas bidimensionais das 16 TSCs (Figura 17).

Figura 17: Série de TSCs avaliadas neste trabalho.



Após o desenho bidimensional das estruturas foi utilizado o programa *Avogadro*[®], um avançado editor de estruturas químicas bastante versátil e capaz de trabalhar desde longas estruturas orgânicas até pequenas enzimas biológicas. Dessa forma, foi utilizado o *Avogadro*[®] converter as moléculas em 3D, para omitir os hidrogênios e ajustar o pH das estruturas em 5,5 em função do pH do reservossomo do *T. cruzi*, local celular onde está a cruzaina.

Realizou-se também a otimização molecular que é uma ferramenta do *Avogadro*[®] que faz com que a molécula busque seu arranjo molecular de menor

energia e mais apropriado aos tipos de ligações presentes (CERQUEIRA, 2016). Dependendo do tamanho da molécula e dos tipos de ligações presentes, esse processo pode durar em média de 30 a 180 segundos.

Ainda utilizando ferramentas disponíveis no Avogadro[®], foi obtida a configuração do campo de energia molecular de forma a ajustar as interações de *van der Waals*, de maneira que se aproximassem ao máximo dos parâmetros experimentais, e ficassem o mais próximo possível da realidade. Assim foi utilizado o campo de força *Merck Molecular Force Field* - MMFF94, específico para moléculas orgânicas. Os cálculos de MMFF9 são divididos em sete tipos de energia que calculam as energias parciais de diferentes interações dentro da molécula, sendo o resultado da energia a soma da energia total de cada tipo dada na unidade kcal/mol. Esse parâmetro é necessário para que otimização da estrutura molecular corresponda a um estado de baixa energia, representando os sistemas químicos conforme são encontrados na natureza (JÁSZ et al., 2019).

Somado a isto, tem se que, o campo de força MMFF94 é parametrizado para atuar em mais de 20 famílias químicas e abrange muitas combinações moleculares através de cálculos matemáticos e computacionais *ab initio* (2800 estruturas), além de aplicar recursos tecnológicos na otimização de polarizabilidade e distribuição de cargas; interações eletrostáticas e dielétricas. O referido campo de força abrange praticamente todos os espaços químicos constituídos pelos seguintes átomos: H, C, N, O, S, P, F, Cl, Br, I, Fe, Li, Na, K, Zn, Ca, Cu e Mg (RABELLO, 2016).

5.1.2 Re-docking molecular

O *software Gold*[®] utiliza um algoritmo genético, baseado em operadores de evolução Darwiniano, como mutações e recombinações, que permite o ancoramento do ligante com a proteína rígida ou parcialmente flexível, buscando a melhor conformação, posição e orientações otimizadas do complexo, classificadas em funções de pontuação. Os resultados da docagem utilizando o *Gold*[®] são fornecidos em funções de pontuação e baseadas em 4 funções disponível no próprio *software*: *GoldScore*, *ChemScore*, *ASP* e *ChemPLP* (SAPUNDZHI; PRODANOVA; LAZAROVA, 2019).

A pontuação *GoldScore* utiliza diversos parâmetros, entre eles os relacionados às interações ligante-receptor como as ligações de hidrogênio e as interações de *van*

der Waals, além da energia interna do ligante (*van der Waals* e torcionais). A função *ASP* relaciona a função potencial átomo-átomo baseado em um banco de dados que correlaciona a frequência de interações ligante - proteína, cujo cálculo se baseia em um estado de referência em que o ligante se encontra livre de interações. Já a função *ChemScore*, parametriza a energia total livre no sistema do complexo ligante-proteína. Por fim a função *ChemPLP* utiliza um algoritmo *Piecewise Linear Potential*, que relaciona as características estereais do ligante e proteína, com os cálculos da distância e ângulos das ligações hidrogênica e metálicas, que se somam ao resultado final, sendo considerado bastante semelhante ao *ChemScore* (CHACHULSKI, WINDSHUGEL, 2020; SPIEGEL; SENDEROWITZ, 2022; PIROLLA, 2018; NEVES, 2015).

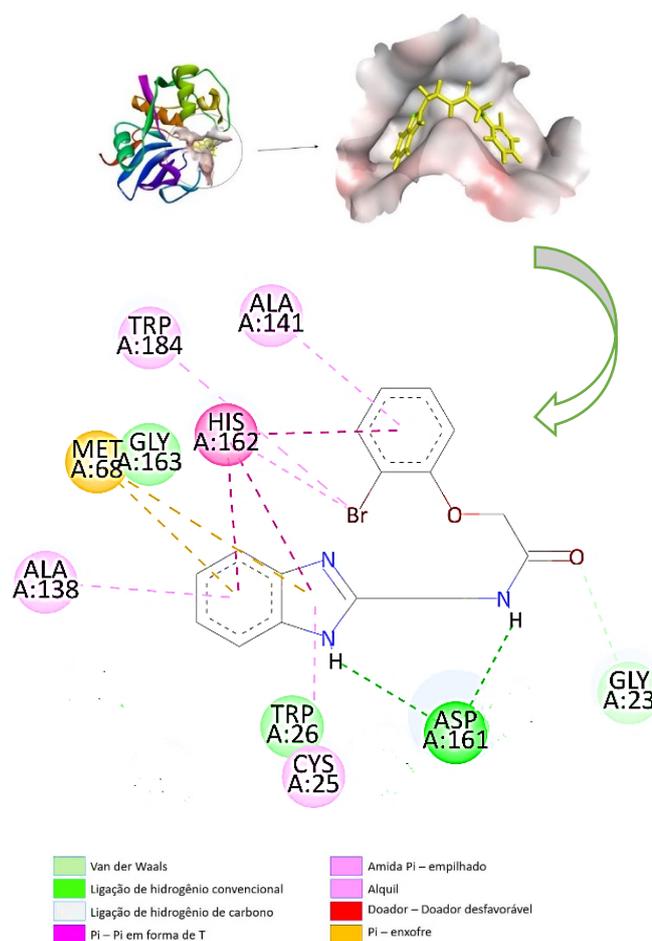
No que se refere a rigidez do ligante e do receptor, existem três tipos de docagem: docagem com ligantes e receptores rígidos, docagem com ligantes flexíveis e receptor rígido e docagem com ligantes e receptores flexíveis. Entretanto, por se aproximar mais do meio biológico, a docagem com ligantes e receptores flexíveis é recomendado, uma vez que as moléculas podem alterar sua conformação espacial de forma a possibilitar o melhor encaixe na ancoragem, além de ter a maior precisão e menor custo computacional (NEVES, 2015).

Na consideração de uma docagem bem-sucedida, foi realizado o processo de *re-docking*, em que o co-ligante da molécula 3KKU, extraída do PDB, foi analisada quanto a conformação, posição e orientação dentro do sitio ativo da proteína, de forma a delimitar a função de pontuação que melhor sinaliza a interação ligante/receptor. Sendo assim, o ligante é retirado do seu complexo proteína-ligante e novamente é encaixado no local. Nessa metodologia, esse ancoramento é comparado ao método experimental e sua distância quadrática média (*RMSD*) é calculada. A ligação é bem-sucedida quando o valor do *RMSD* é menor que 2Å (DAVID et al., 2022; VERDONK, 2003).

Resultados menores que 2 Å indicam sucesso tanto da função de pontuação quanto do algoritmo de busca, sendo esses, parâmetros utilizados como referência na realização da docagem (PIROLLA, 2018; NEVES, 2015).

Os resultados do *re-docking* estão apresentados na Figura 18 e na Tabela 6.

Figura 18: Resultado *re-docking* 3kku com seu ligante co-cristalizado.



Legendas: - imagens obtidas via programa *Discovery Studio* - pontuação *ChemPLP*

Tabela 6: Pontuação *re-docking* da molécula 3KKU (PDB).

Função	Score	RMSD
ChemPLP	60,1093	0,7619
GoldScore	57,1168	0,4167
ASP	35,2315	7,2593
ChemScore	26,6437	4,7162

Utilizando o programa *Discoverys studio*[®] toda a cadeia estrutural foi alinhada ao seu respectivo molde e seu encaixe e ligação foram verificados de acordo com o estabelecido na literatura. Dessa forma, na análise do *re-docking* foi observado que o

ligante se encaixa perfeitamente no receptor, não sendo observável qualquer desvio ou irregularidade estrutural que afete os parâmetros apresentados. Assim, com ligações e encaixe predominantes no sítio S1' (**Asp161, His162 e Trp184**), os modelos obtidos nesses resultados são ideias para serem usados como referências no referido trabalho, sendo que dentre as 4 funções do programa *Gold*[®], as funções *ChemPLP* e *GoldScore* (60,1093 e 57,1168 respectivamente) se mostraram ideais para este trabalho e reproduzem melhor a orientação do ligante co-cristalizado dentro do sítio ativo, uma vez que apresentaram os menores níveis de variação de *RMSD*, o que correlaciona com os resultados descritos na literatura (FERREIRA et al., 2010).

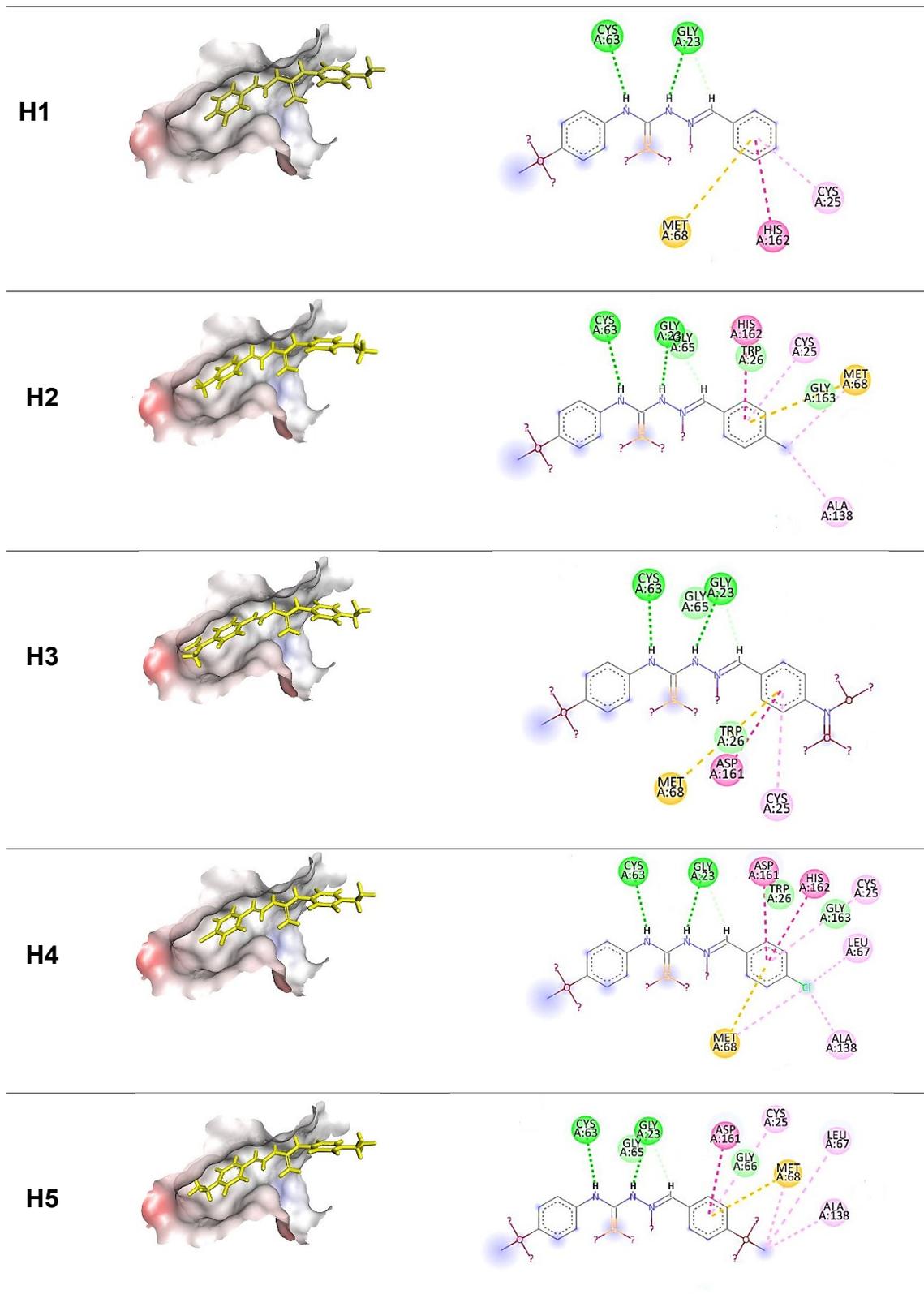
Essa padronização da técnica do *re-docking* não deve ser considerada como um todo absoluto no que se refere à variação do *RMSD*, pois devido ao alto número de ligações rotacionáveis, os valores inferiores a 2 Å são considerados raros (AROOJ et al., 2013).

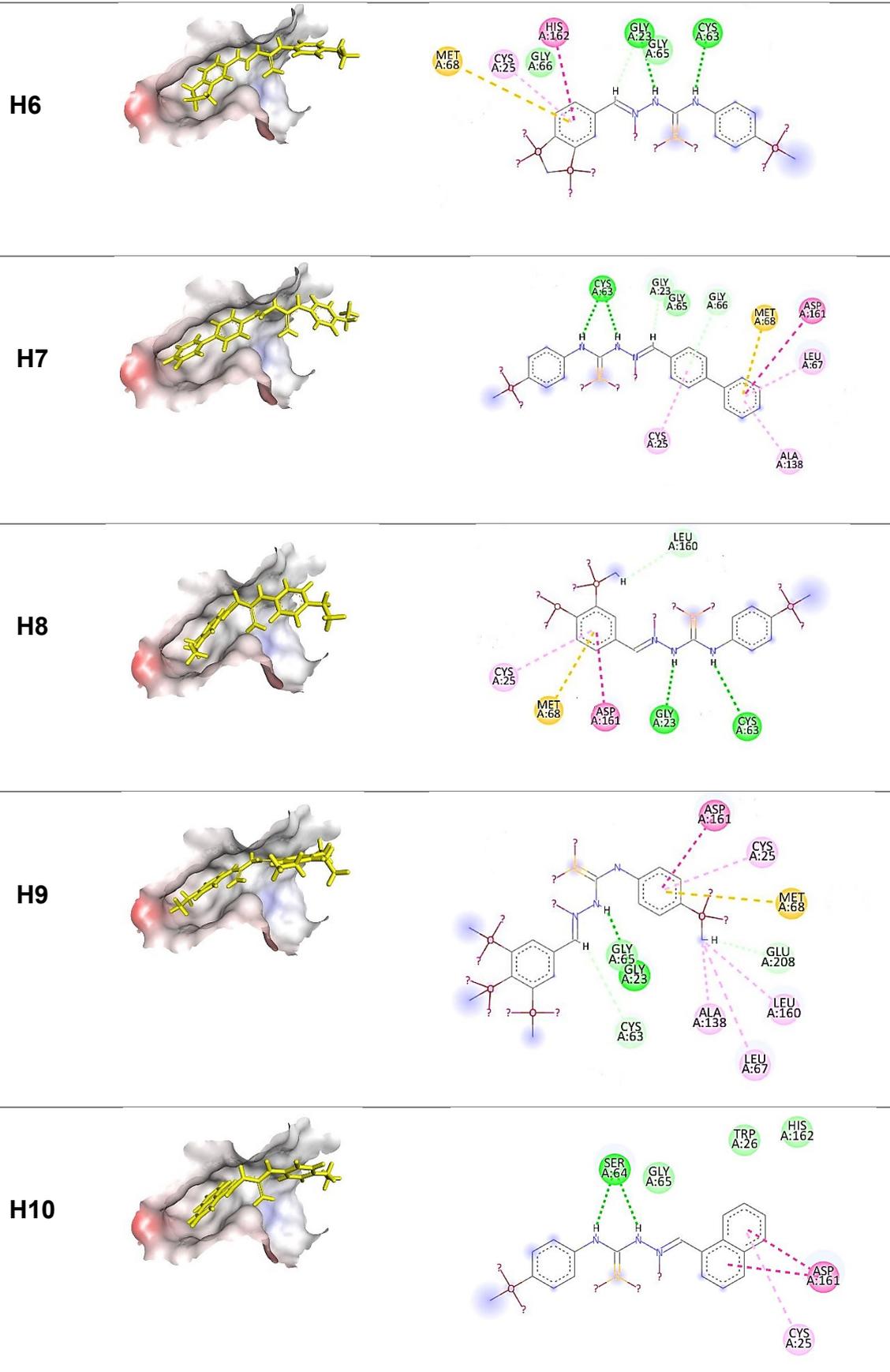
5.1.3 Docagem das TSCs

Com o *re-docking* concluído, foi realizado a docagem molecular das 16 moléculas de TSCs e os resultados comparados aos parâmetros estabelecidos no *re-docking*. No programa *Gold*[®] foi retirado o ligante cristalizado bem como as águas, visto que essas moléculas não fazem interações de interesse no processo de docagem. Foram acrescentados os átomos de hidrogênios e regulado o raio do centro ativo em 6 Å.

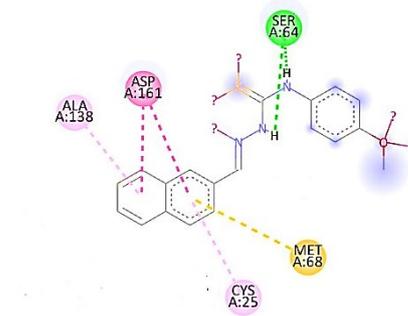
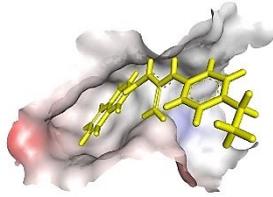
Todas as moléculas foram observadas visualmente e classificadas de acordo com o grau de interação ligante – receptor (Tabela 7):

Tabela 7: Encaixe visual das TSCs e suas Interações ligante – receptor.

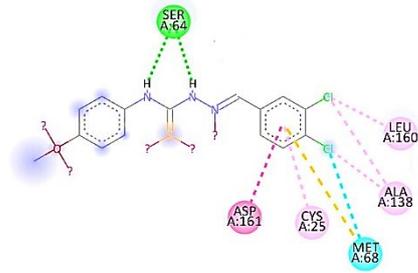
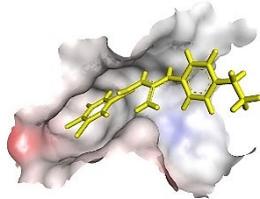




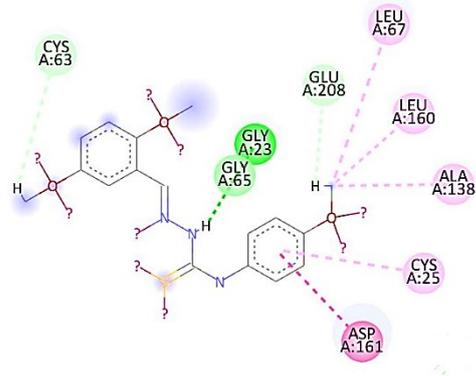
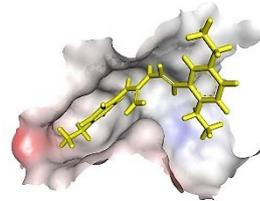
H11



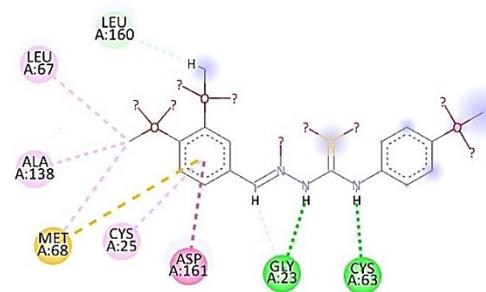
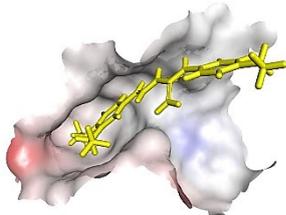
H12

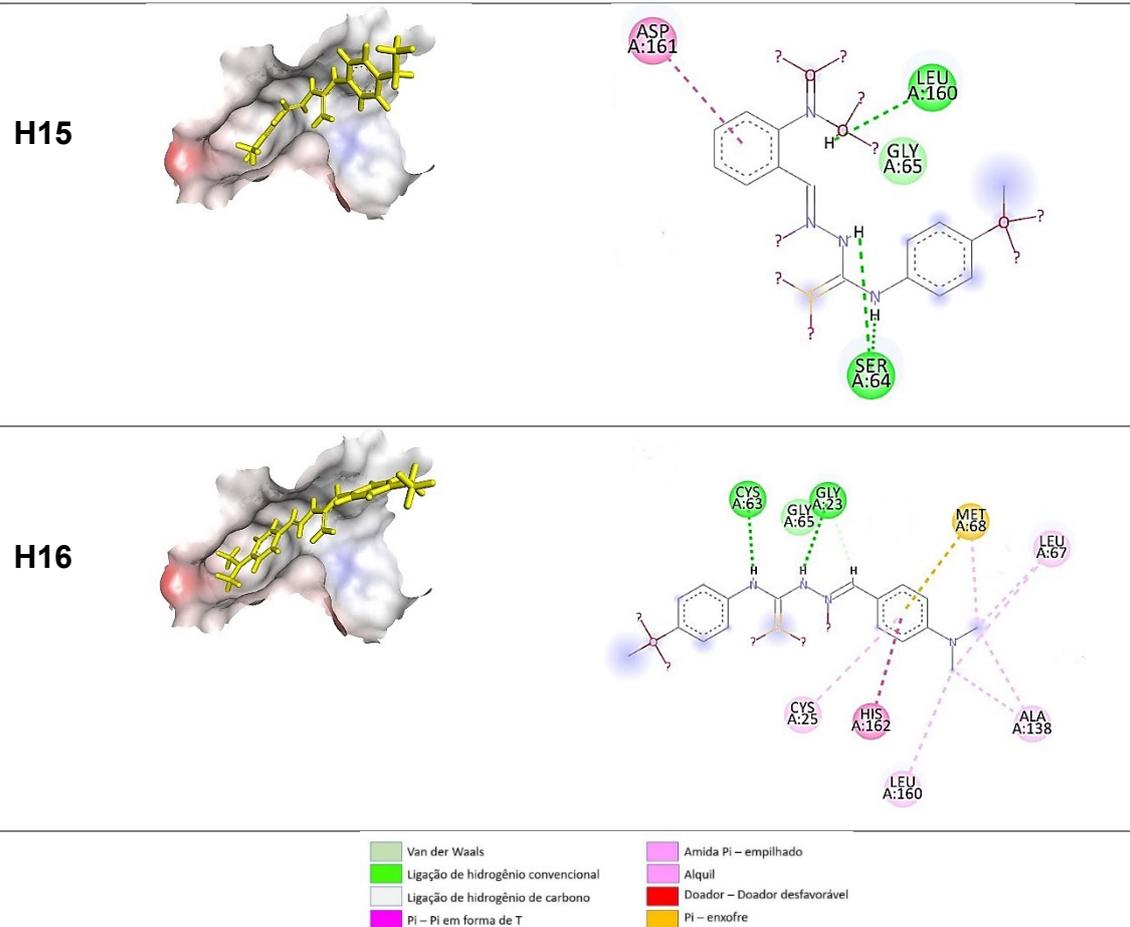


H13



H14





Fonte: Imagens obtidas via programa *Discovery Studio*.

São vários os tipos de interações que ocorrem num ancoramento molecular. No programa *Discovery Studio* são apresentadas as interações do tipo ligação de hidrogênio, as hidrofóbicas, covalentes, iônicas, π - π , cátions com grupamento positivos, anéis aromáticos, entre outros (RODRIGUES, 2019). Assim, é perceptível que em muitos complexos cristalográficos da cruzaina, grandes grupos hidrofóbicos tendem a ser ligados na região S2, o que demonstra a seletividade da região por esses tipos de resíduos (MARTINS, 2018).

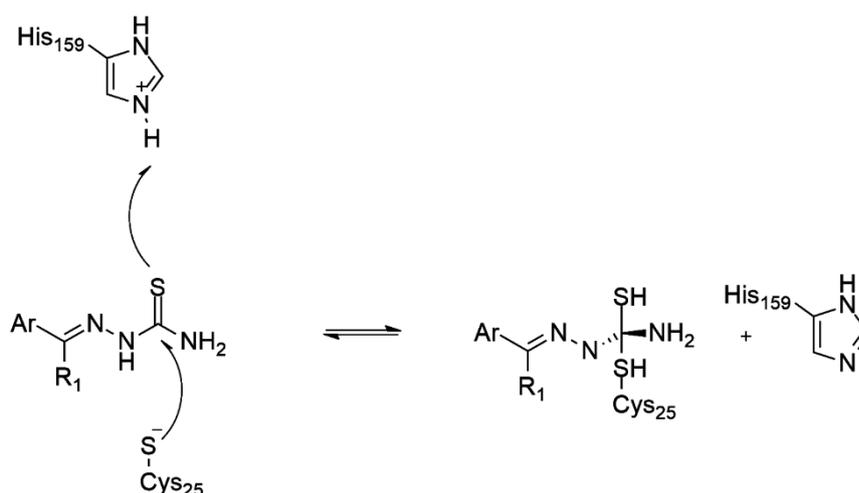
Sendo assim e a partir da Tabela 7, grande parte da porção nitrogenada das TSCs tiveram uma preferência pelos resíduos **Cys63, Gly23 e Gly25 (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H13, H14, H16)** via ligações de hidrogênio. Essas interações polares são responsáveis pelo ancoramento do ligante ao sítio ativo da molécula. Já as interações hidrofóbicas tiveram predominância nas porções finais da molécula, principalmente com os resíduos **His162, Met68, Ala138, Leu67, Asp161, Gly16, Leu67 e Leu160** presentes na cruzaina.

Nenhuma das moléculas testadas interagiu com todos os resíduos da tríade catalítica; contudo, com exceção da molécula H15 que não apresentou interação, todas apresentaram uma ou mais interação com resíduos da tríade catalítica (Cys25, His162, Asn182).

Dentre as interações observadas, as mais comuns foram as do tipo ligações de hidrogênio, interações $\pi - \pi$, $\pi - \text{alquil}$ e $\pi - \text{enxofre}$ em que os resíduos de aminoácidos mais frequentes foram **Cys25**, **Gly23**, **His162**, **Met68**, **Cys63**, **Asp161** e **Leu67**. Assim, esse resultado vai ao encontro com os reportados na literatura que sugere que esses resíduos são parte essencial do mecanismo de ação de agentes inibitórios da cruzaina (REIS, 2021).

O mecanismo de ação das TSCs ainda não está completamente elucidado, entretanto, dois mecanismos de ação são aceitos. Em um deles ocorre o ataque covalente do resíduo **Cys25** ao carbono tiocarbonilado (C=S), com uma possível transferência de um próton do resíduo **His159** formando um tetraédrico sulfídrico. Já na outra proposta mecanística, esta ação estaria relacionada ao possível ataque do carbono em C=N, de forma que o nitrogênio seja protonado pelo resíduo His162 (MARTINS et al., 2023; CARDOSO, 2008) (Figura 19).

Figura 19: Mecanismo de ação proposto para as TSCs frente a cruzaina.

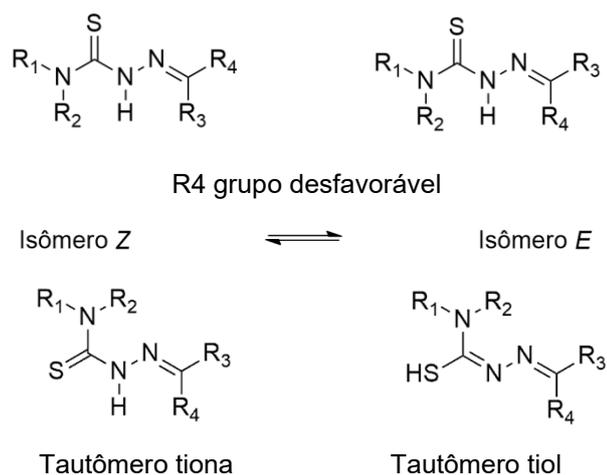


FONTE: Adaptado de Espindola (2015).

Estruturalmente as TSCs podem ocorrer em diferentes formas isoméricas como isômeros geométricos (*E - Z*) e anti-rotâmeros e tautômeros tiona/tióis (Figura 20). Por esta razão é importante identificar qual destas formas predomina no meio polar, meio em que ocorre a interação ligante-enzima; sendo assim, em relação às

TSCs, a forma predominante corresponde ao isômero *E* em seu estado tautomérico tiona, confirmando assim a preferência dessa família de compostos em adotar essa conformação tanto no estado sólido, quanto em soluções (JASINSKI et al., 2022).

Figura 20: Isômero *E* e *Z* das TSCs com suas formas tautoméricas.



Fonte: adaptada de LOPES (2021).

Diante do exposto as TSCs tiveram uma relação bastante promissora com o sítio ativo da proteína, principalmente o anel aromático que teve boa complementaridade no sítio, onde a maioria obteve interações aromáticas com os resíduos Cys25, Asp161, Met68, Leu67.

Nas pontuações (Tabela 8), as funções *ChemPLP* e *GoldScore*, foram utilizados levando em consideração os resultados obtidos no *re-docking* da proteína com seu ligante co-cristalizado e pela comparação com os resultados obtidos nos ensaios de inibição da cruzaina e do *T. cruzi*.

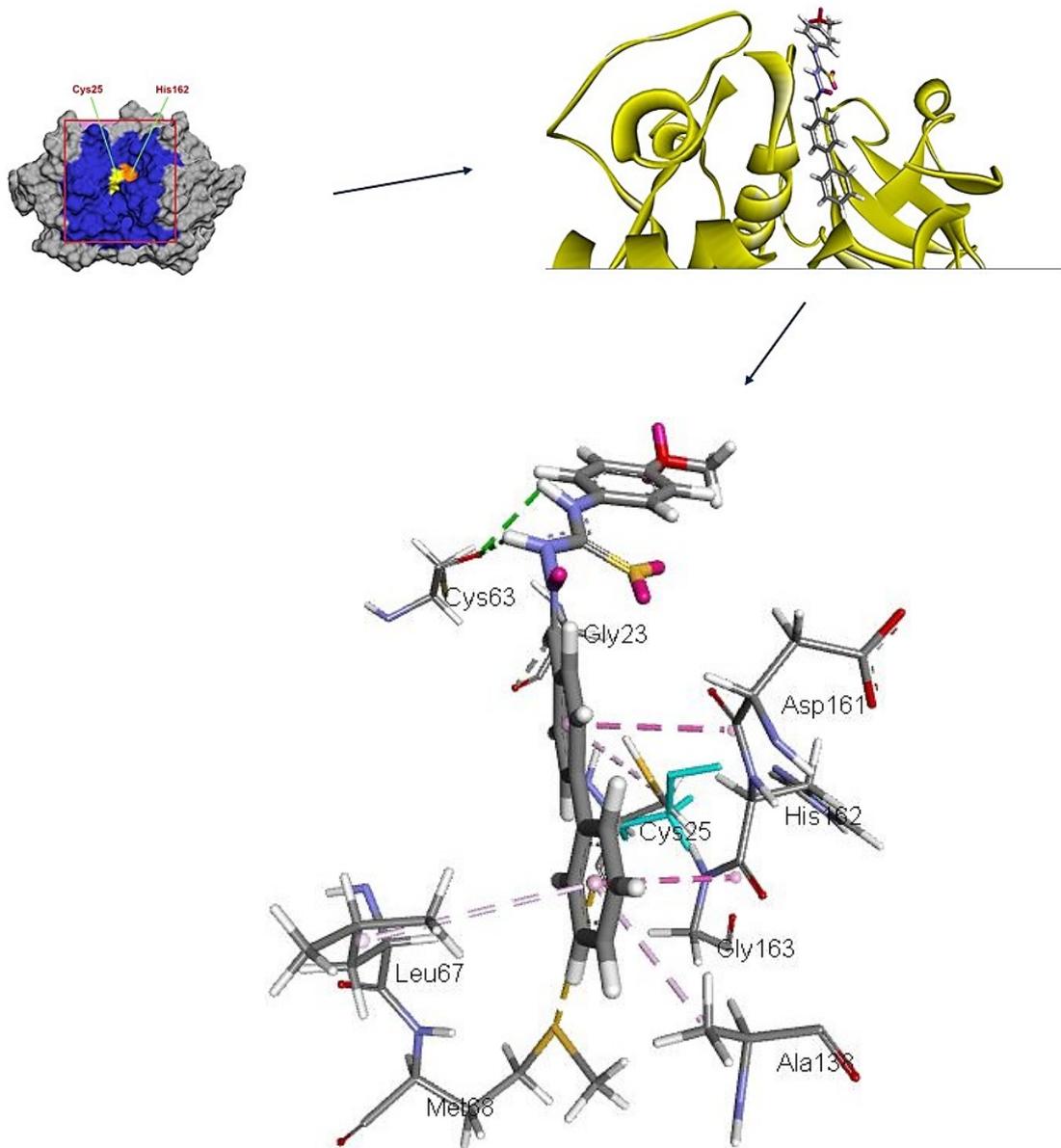
Tabela 8: Pontuações obtidas na docagem para as TSCs com a proteína 3KKU (PDB).

Composto	Funções			
	<i>ChemPLP</i>	<i>GoldScore</i>	<i>ChemScore</i>	<i>ASP</i>
H1	45,1801	48,4387	20,0373	22,3468
H2	47,1657	50,7330	21,5829	19,9396
H3	48,0117	52,6521	20,7983	23,1961
H4	46,9736	49,8666	21,7628	21,9692
H5	46,8207	50,7119	21,1397	23,5328
H6	48,5858	51,1100	19,7436	24,0199
H7	59,0066	53,3596	25,7339	24,3228
H8	47,9733	49,8399	17,9449	23,8294
H9	46,6521	51,9215	16,9557	26,4709
H10	53,0980	55,3398	23,9377	25,0923
H11	57,6764	55,7686	24,5172	24,7955
H12	46,0712	54,4892	21,3659	22,7132
H13	48,7915	56,8511	19,5724	28,7309
H14	50,1034	54,9223	20,9288	26,2629
H15	48,4374	53,2279	18,0841	22,9665
H16	53,8093	54,5577	23,1105	23,5085

Assim, nos resultados obtidos todas as TSCs tiveram pontuações dentro de uma média de *score* de 49,6468 e 52,7368 nas funções *ChemPLP* e *GoldScore* respectivamente. E ainda, levando em consideração o alvo de ação de cada molécula, é perceptível uma pequena diferença nos valores, sugerindo que as novas TSCs possuem uma boa complementaridade e interação com o sítio ativo da cruzaina.

Este resultado pode estar diretamente ligado à interação com os resíduos presentes nos subsítios S1, S2 e S3. Essas interações com os principais resíduos catalíticos da cruzaina, demonstram que a referida pesquisa vai ao encontro com o consenso científico sobre a protonação da díade da cruzaina, onde, ao se ligar ao substrato ou ligante o próton Cys25 é transferido para a His162 dando origem ao estado iônico conforme já comentado (Figura 20).

Figura 21: Ancoragem da TSC H7 e suas interações.



Levando em consideração os resíduos da tríade catalítica, His162, Cys25 e Asn182 e suas interações com as novas moléculas, todas as novas TSCs possuem uma ou mais ligação com esses resíduos denotando uma possível boa atividade para a inibição da cruzafina.

Cabe salientar que em relação aos grupos farmacofóricos da estrutura das TSCs, a substituição em C1 por grupos *fenil*, *p-metil-fenil*, e alquílicos lineares aumentam a potência desta classe de compostos frente ao *T. cruzi*. Somado a isso, a presença de halogênios como o bromo e cloro, são tolerados nas posições 3 e/ou 5 (R e R1) no anel aril. Mudanças nos substituintes metil na posição 2 não geraram

efeitos significativos, bem como substituições no nitrogênio na posição 1 e NH₂ da posição 3 (ESPINDOLA, 2015; CARDOSO, 2008). Já as substituições nas posições 3 e 4 do anel fenóxi por grupos metóxi aumenta ligeiramente a inibição da enzima cruzaina o que pode explicar a interação das moléculas **H5, H9, H13 e H14**.

Do mesmo modo, a presença de halogênios (F, Cl, Br, I) no anel fenila com substituições na posição 4 do anel, contribui para o aumento da atividade inibitória, comparáveis aos inibidores da cruzaina mais potentes descritos na literatura, tais como o composto K11777 (IC₅₀ = 0,004 μM) (ASSIS et al., 2021; ESPINDOLA, 2015; JASINSKI et al., 2022).

5.2 A inibição da cruzaina, ensaios fenotípicos e citotoxicidade das TSCs

Todos os ensaios *in vitro* apresentados nessa seção foram realizados em colaboração com o Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC) do Instituto de Física- USP de São Carlos, sob a supervisão do Prof. Dr. Adriano Andricopulo (Tabela 9):

Tabela 9: Ensaios de inibição da enzima cruzaina, ensaios fenotípicos e citotoxicidades das TSCs.

Composto	Cruzaina IC ₅₀ (μM)	<i>T. cruzi</i> CC ₅₀ (μM) ± SD	<i>HFF-1</i> CC ₅₀ ± SD
H1	0,720 ± 0,015	9,80 ± 0,05	>64
H2	0,673 ± 0,065	10,15 ± 0,15	>64
H3	0,654 ± 0,085	4,23 ± 0,23	45,71 ± 1,03
H4	0,678 ± 0,026	8,60 ± 0,25	>64
H5	0,675 ± 0,010	12,05 ± 0,85	>64
H6	0,640 ± 0,028	7,65 ± 0,35	>64
H7	0,306 ± 0,009	1,96 ± 0,05	>64
H8	0,655 ± 0,015	8,15 ± 0,25	>64
H9	0,685 ± 0,045	10,15 ± 0,45	>64
H10	0,512 ± 0,012	2,85 ± 0,13	>64
H11	0,412 ± 0,042	2,15 ± 0,26	>64
H12	0,699 ± 0,024	9,25 ± 0,35	>64
H13	0,636 ± 0,026	10,68 ± 0,15	>64
H14	0,605 ± 0,015	10,95 ± 0,54	>64
H15	0,630 ± 0,041	5,87 ± 0,05	51,26 ± 0,87
H16	0,519 ± 0,023	2,95 ± 0,65	>64

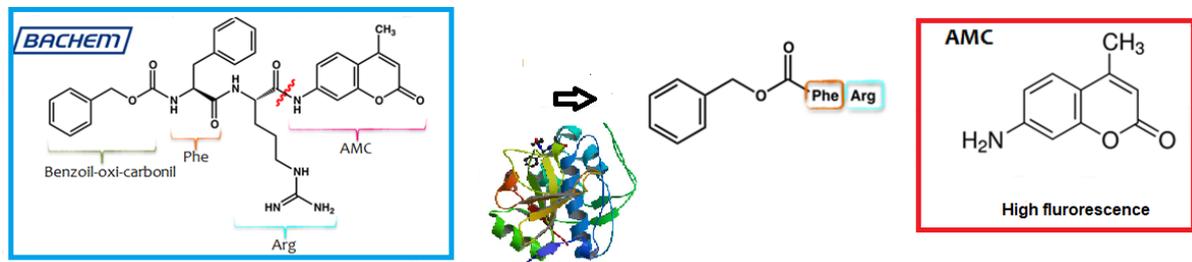
Tabela 10: Correlação entre a docagem e a inibição da cruzaina e *T. cruzi* pelas TSCs.

	ChemPLP	GoldScore	ChemScore	ASP	Cruzain IC₅₀ (µM)	T. cruzi IC₅₀ (µM)
H1	45,1801	48,4387	20,0373	22,3468	0,720	9,80
H2	47,1657	50,7330	21,5829	19,9396	0,673	10,15
H3	48,0117	52,6521	20,7983	23,1961	0,654	4,23
H4	46,9736	49,8666	21,7628	21,9692	0,678	8,60
H5	46,8207	50,7119	21,1397	23,5328	0,675	12,05
H6	48,5858	51,1100	19,7436	24,0199	0,640	7,65
H7	59,0066	53,3596	25,7339	24,3228	0,306	1,96
H8	47,9733	49,8399	17,9449	23,8294	0,655	8,15
H9	46,6521	51,9215	16,9557	26,4709	0,685	10,15
H10	53,0980	55,3398	23,9377	25,0923	0,512	2,85
H11	57,6764	55,7686	24,5172	24,7955	0,412	2,15
H12	46,0712	54,4892	21,3659	22,7132	0,699	9,25
H13	48,7915	56,8511	19,5724	28,7309	0,636	10,68
H14	50,1034	54,9223	20,9288	26,2629	0,605	10,95
H15	48,4374	53,2279	18,0841	22,9665	0,630	5,87
H16	53,8093	54,5577	23,1105	23,5085	0,519	2,95

Os ensaios de inibição da cruzaina são bem conhecidos na literatura, e são gerados a partir da clivagem de substratos peptídicos fluorogênicos, na presença de inibidores, que podem apresentar autofluorescência ou absorvância nos mesmos comprimentos de onda utilizados (CORNÉLIO, 2015). A especificidade do substrato está sujeita às propriedades dos sítios de ligação arranjados ao redor da cavidade catalítica responsável pela quebra da ligação peptídica (SOUZA, 2022).

A atividade inibitória pode ser aferida através do percentual de inibição, representada pelo IC₅₀ (concentração necessária para inibição de 50% da atividade enzimática). Na cruzaina, o IC₅₀ é dado através da fluorimetria, onde o substrato Z-Phe-Arg-AMC (benzoiloxycarbonil-fenilalanina-arginina-aminometilcumarina) que libera o grupo fluorescente 7-amino-4-metilcumarina (AMC) ao ser clivado pela cruzaina, sendo que este pode ser inibido ou não pelos compostos testados (Figura 22). Dessa forma, os compostos sintetizados foram testados diretamente contra a cruzaina pelo método fluorimétrico e os valores de IC₅₀ utilizados para o desenvolvimento de uma relação de inibição entre os testes *in vitro* e *in silico* (CHAVEZ, 2017; AVELAR, 2014).

Figura 22: Método de fluorimetria com o substrato Z-Phe-Arg-AMC e a enzima cruzaina originando o composto fluorescente 7-amino-4-metil cumarina (AMC).

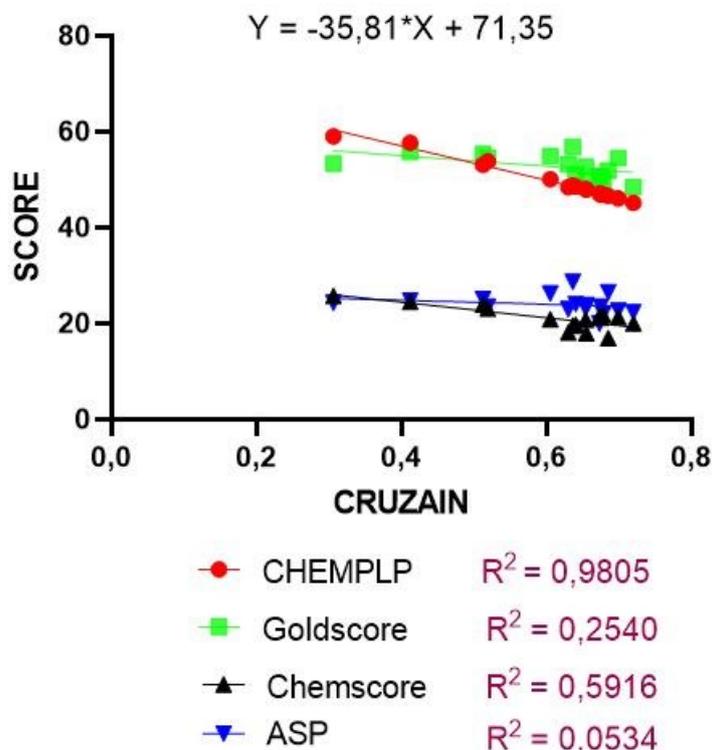


Fonte: FERREIRA et al., 2014.

O modelo de regressão linear é um modelo matemático que representa de forma quantitativa a relação entre duas ou mais variáveis, onde um diagrama de dispersão sugere a existência linear de uma relação, em que a reta originada representa os mínimos quadrados, de forma que o coeficiente de determinação seja o mais próximo de 1 (MARTINS, 2019).

Dessa forma e acordo com os dados da Tabela 9 e 10, foi determinada a relação entre os índices de inibição da cruzaina, com os índices de interação ligante-receptor baseado nas pontuações do docking molecular. Os compostos **H7**, **H10** e **H11** (IC_{50} 0,306, 0,512 e 0,412 respectivamente) se mostraram os mais ativos na atividade inibitória da cruzaina, sendo que o gráfico apresentado na Figura 23, mostra essa correlação de dados entre as 4 funções da docking com os índices de IC_{50} , em que o R^2 (índice estatístico que indica o quão próximo as estão as variáveis analisada) que responde à função do docking que melhor representa os dados experimentais foi igual a 0,9805. Dessa forma, através da equação da reta, pelos métodos dos mínimos quadrados, é comprovada essa correlação e integração de dados.

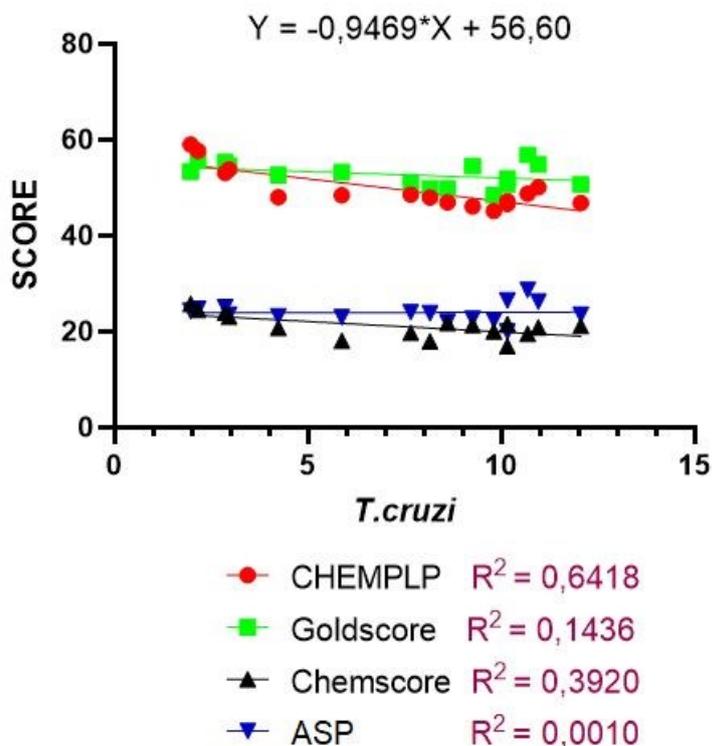
Figura 23: Correlação linear entre os dados de inibição da cruzaina(IC₅₀) com os scores referentes às funções de pontuação da docagem molecular via *software Graphpad prism 9.5.1*.



Analisando os dados geridos pelo gráfico da figura 23, é observado que a função que possui o valor de R² mais próximo a 1, foi a função *ChemPLP*. Nesse sentido, é possível gerar dados de inibição da cruzaina sem a necessidade de realização dos dados experimentais, apenas usando a equação da reta, ao qual representa o modelo de relação entre os dados teóricos e experimentais.

Da mesma forma, o gráfico da Figura 24, representa os índices de inibição do IC₅₀ do *T. cruzi*, com as 4 funções da docagem molecular, cujo R² da função que melhor representa os dados experimentais foi de 0,6418, que também pertence à função *ChemPLP*.

Figura 24: Correlação entre os dados de inibição do *T. cruzi* (IC₅₀) com os scores referentes às funções de pontuação da docagem molecular via software *Graphpad prism9.5.1*.



Nos resultados apresentados, as TSCs **H7**, **H10** e **H11** (IC₅₀ de 1,96, 2,85 e 2,15µM respectivamente) tiveram destaque pois apresentaram os menores percentuais de concentração para inativar o *T. cruzi* e foram os mais ativos nas pontuações de referências *ChemPLP* e *GoldScore*.

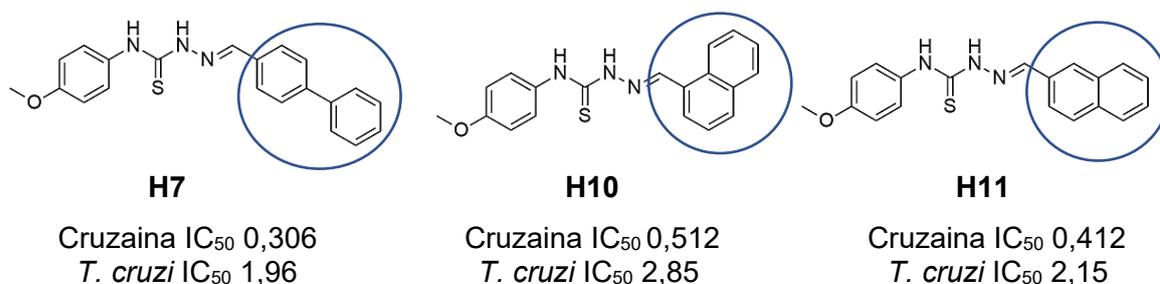
Analisando a Tabela 10, é perceptível que os compostos mais ativos nos testes *in silico*, também foram os melhores nos testes *in vitro* no que se refere à inibição da enzima cruzaina e inibição *T. cruzi* em testes *in vitro*.

O modelo de regressão linear utilizado neste trabalho serve para resumir dados e informações e podem ser vistos como um dispositivo computacional para estimar diferenças entre um grupo tratado e um grupo controle, prevendo o comportamento de Y a partir de X. Nesse ínterim, a reta de regressão permite prever a melhor função de pontuação delineada pelo docagem a partir dos resultados apresentados pelos testes de inibição da cruzaina e do *T. cruzi* (CHEIN, 2019). Nesse sentido, os parâmetros indicados estão adequados, pois confirmam a função de pontuação que melhor descreve os dados já obtidos nos ensaios teóricos. Disto isso, dentre as 4

funções avaliadas na docagem molecular, a função *ChemPLP*, cujo valor de $R^2 = 0,9805$ (cruzaína) e $R^2 0,6418$ (*T. cruzi*) são os que mais se aproxima de 1, sendo que foram os que mais se ajustaram aos dados experimentais.

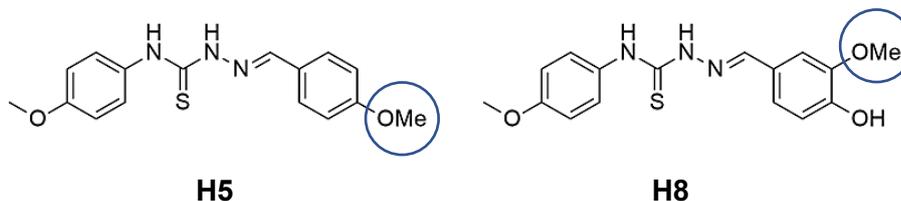
A atividade inibitória frente a enzima cruzaína e *T. cruzi* dos três melhores compostos indicam a importância da presença do anel benzênico (Figura 25) para o aumento da atividade tripanocida. Este grupamento favorece o aumento da lipofilicidade, aumento da atividade metabólica, do perfil farmacocinético e manteve o caráter hidrofóbico da porção P1, o que é característico dos inibidores da cruzaina (SILVA, 2016; LAMEIRO, 2020; SENS et al.,2018).

Figura 25: Compostos com perfis mais promissores nos experimentos *in silico* e *in vitro*.



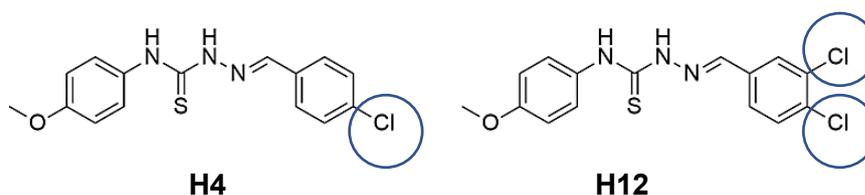
Por sua vez, os compostos **H3** e **H15** apresentaram parâmetros tóxicos com relação aos testes de citotoxicidade ($CC_{50} < 64$), ambos possuem o grupo nitro em sua estrutura (Figura 26). Contudo, o grupo nitro é bem conhecido na literatura por apresentar diversas correlações em atividades biológicas. Os próprios fármacos de referência no tratamento da DC possuem o grupamento nitro a seus anéis aromáticos. Além de seus efeitos antiparasitários, fármacos com grupamento nitro, são comumente usados em diferentes tratamentos como mal de Parkinson, angina, insônia, entre outros, além de serem amplamente empregados como agentes terapêuticos, contra uma variedade de infecções causadas por protozoários e bactérias (TRINDADE, 2019).

Figura 27: Estrutura dos compostos **H5** e **H8** com o grupo metóxi destacado.



No que se refere à presença de halogênios, o composto **H12** com dois substituintes cloro teve sua atividade levemente diminuída ao se comparar com o composto **H4**, que possui apenas 1 átomo de cloro na estrutura (Figura 28). Entretanto, na literatura é reportado que a inserção de halogênios melhora a expressividade da atividade do composto, mas não aumenta sua potência com o aumento da quantidade de grupamento (ESPINDOLA, 2015; DIOGO, 2019).

Figura 28: Estrutura dos compostos **H4** e **H12** com o substituinte cloro em destaque.



Estudos demonstraram que a presença de halogênio como bromo e cloro na posição *para* dos anéis fenílicos, aumenta sua atividade tripanocida. Já a introdução de grupos retiradores de elétrons na posição *orto*-, tendem a diminuir sensivelmente a atividade tripanocida dos compostos conforme pode se observar nos valores de IC₅₀ 0,678 e 0,699 μ M dos compostos **H4** e **H12** na tabela 9 respectivamente (DIOGO, 2019).

Em suma todas as TSCs apresentaram resultados satisfatórios, sendo que os compostos mais ativos pra inibição da cruzaina, também foram os mais ativos na inibição do *T. cruzi*, representando uma correlação de dados integradora tanto em relação aos testes *in silico* quanto os *in vitro*.

Em relação aos ensaios de citotoxicidade, estes são utilizados para verificar a seletividade dos compostos ao parasita, de modo que não atuem contra células saudáveis. Dessa forma, os efeitos citotóxicos das TSCs foram avaliados em células

HFF1 não tumorais para determinar os perfis tóxicos ou não dos compostos (Tabela 9. Um CC_{50} (concentração citotóxica mínima de 50%) acima de 64 prediz baixa toxicidade em células humanas, o que de acordo com a Tabela 9, com exceção das moléculas **H3** e **H15**, as TSCs possuem bons perfis de segurança em células humanas.

5.3 Perfil farmacocinético, farmacodinâmico e toxicidade e *in silico*

Os ensaios farmacocinéticos e farmacodinâmicos *in silico* são importantes no desenvolvimento de novas entidades farmacológicas. Entretanto, é importante destacar que seus resultados servem apenas para orientação no desenvolvimento de novas estruturas, sendo que os ensaios biológicos e tóxicos devem ser considerados em conjunto.

A plataforma online *Osiris*[®], é um *software* utilizado para predizer o potencial toxicológico de uma determinada molécula. Esta plataforma utiliza cálculos probabilísticos através de cores para designar se a molécula tem potencial mutagênico, tumorais, de interferência na reprodução e irritabilidade pela comparação de partes da moléculas com um banco de dados de fragmentos moleculares com Registro de Efeitos Tóxicos de Substâncias Químicas (RTECS) presente no centro de controle e prevenção de doenças (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA) (RAJALAKSHMI et al., 2021; CHODANKAR, MAHAJAN, 2022; CAIANA, FILHO, 2020).

Nesse sentido, a plataforma faz uma varredura na molécula em busca de algum fragmento que comparado com seu banco de dados possa sugerir efeitos tóxicos e seus resultados são aferidos nas cores vermelhos, amarelo e verde, indicando em que alto risco de incidência, risco moderado e baixa incidência de risco respectivamente.

Os resultados obtidos a partir do *software Osiris*[®], para as TSCs foram comparados com Bz e Nfx e estão apresentados na Tabela 11:

Tabela 11: Parâmetros de toxicidade das TSCs obtidos pelo *software Osiris*®.

Molécula	Toxicidade			
	Mutagênico	Tumoral	Reprodução	Irritação
H1	AR	NR	AR	NR
H2	AR	NR	AR	NR
H3	AR	NR	AR	NR
H4	AR	NR	AR	NR
H5	AR	NR	AR	NR
H6	AR	NR	AR	NR
H7	AR	NR	AR	NR
H8	AR	NR	AR	NR
H9	AR	NR	AR	NR
H10	AR	AR	AR	NR
H11	AR	NR	AR	NR
H12	AR	NR	AR	NR
H13	AR	NR	AR	NR
H14	AR	NR	AR	NR
H15	AR	NR	AR	NR
H16	AR	AR	AR	NR
Bz	NR	NR	AR	NR
Nfx	AR	AR	AR	NR

Legendas: NR – nenhum risco; MR – médio risco; AR - alto risco.

De acordo com os dados obtidos foi constatado que as TSCs tiveram resultados similares ou inferiores em relação aos compostos de referência. Assim como o Nfx, 100% das TSCs apresentaram toxicidade de alto risco no que se refere à incidência de problemas mutagênicos e relacionados à reprodução. Entretanto, apresentaram resultados melhores no que se refere à incidência de problemas tumorais. Contudo, em relação ao Bz, as TSC não apresentaram resultados superiores no que se refere à toxicidade. Em relação à irritabilidade, os resultados com as TSCs foram similares a ambos os compostos de referência.

No teste seguinte, foi utilizado a plataforma *Molinspirations*®, uma plataforma que faz a predição de características e aspectos físico-químicos da molécula. Neste sentido, levando em consideração a regra dos cinco de *Lipinski*, o *Molinspirations*®

descreve os aspectos relacionados aos ligantes que atuam como receptores acoplados à proteína G, inibidores da cinases, moduladores dos canais iônicos, doadores e receptores de hidrogênio, além de receptores nucleares e massa molar (AYAR, 2022; CAIANA, FILHO, 2020; BAI, GEETHAVANI, RAMAKRISHNA, 2022).

De acordo com a plataforma *Molinspirations*[®] e levando em consideração a regra de *Lipinski*, o composto deve possuir:

- Coeficiente de partição $\log P \leq 5$ (valor ideal para fármacos entre 2 e 5);
- Massa molar igual ou menor a 500 g mol^{-1} (MM);
- Aceptadores de hidrogênio ≤ 10 (nAH);
- Doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 (nDLH)

Para ser considerado uma molécula adequada aos parâmetros fisiológicos, um composto não pode violar mais de um destes parâmetros da regra de *Lipinski*. A regra foi criada ponderando que compostos que apresentam boa solubilidade em água e aceitável permeabilidade intestinal podem ser promissoras quanto a biodisponibilidade oral (SANTOS, 2018; GABRIEL, 2021).

Os potenciais vias de administração de um medicamento são avaliadas pelo parâmetro *Topological Polar Surface Area* - TPSA (Área de superfície polar topológica). Este por sua vez, é um descritor que define as características ideais para o transporte de drogas, absorção intestinal, barreira hematoencefálica e permeabilidade em células de adenocarcinoma do cólon humano - (Caco2). Este parâmetro corresponde ao resultado da soma de superfícies de átomos polares em determinada molécula. Resultados abaixo de 160 \AA^2 aferem boa biodisponibilidade oral para as moléculas (ARRUDA et al., 2020).

Os resultados do perfil farmacocinético obtidos pela plataforma *Molinspirations*[®] estão compilados na Tabela 12, em que é possível verificar que somente o composto **H7** violou uma das condições básica de *Lipinski*, pois apontou um $\log P$ superior a 5.

Tabela 12: Perfil farmacocinético das TSCs a partir da plataforma *Molinspirations*[®].

	LogP	MM g (mol⁻¹)	nDLH (oHNNH)	nALH (nOH)	TPSA (Å)	Violações
H1	3,37	285,37	2	4	45,65	0
H2	3,82	299,40	2	4	45,65	0
H3	3,33	330,37	2	7	91,48	0
H4	4,05	319,82	2	4	45,65	0
H5	3,43	315,40	2	5	54,89	0
H6	3,26	329,38	2	6	64,12	0
H7	5,17	361,47	2	4	45,65	1
H8	2,71	331,40	3	6	75,11	0
H9	3,00	375,45	2	7	73,35	0
H10	4,53	335,43	2	4	45,65	0
H11	4,56	335,43	2	4	45,65	0
H12	4,66	354,26	2	4	4565	0
H13	3,42	345,42	2	6	64,12	0
H14	3,02	345,42	2	6	64,12	0
H15	3,26	330,37	2	7	91,48	0
H16	3,48	328,44	2	5	48,89	0
Bz	0,78	260,25	1	7	92,75	0
Nx	0,71	287,30	0	8	108,71	0

O logP é um parâmetro que elucidada a capacidade de um composto se difundir em água ou em óleo e está diretamente ligada à absorção. De acordo com regra de Lipinski, compostos com valores muito baixo de logP tendem a ter dificuldade no trânsito entre as membranas celulares e valores muito alto podem causar toxicidade por manter o composto preso nas membranas. Assim o valor ideal deve estar entre 2 e 5 (LIPINSKI; MECKERROW, 2017; DIAS, 2018). A partir dos resultados obtidos é possível verificar que tanto o Bz quanto o Nfx apresentam um perfil de coeficiente de partição menor que 1, o que sinaliza uma absorção fisiológica não imediata de ambos, uma vez que o valor ideal de log P está entre 2 e 5. Já as TSCs, com exceção de **H7**, apresentaram coeficiente de partição entre 2 e 5, sugerindo possuir um caráter hidrofóbico e uma boa permeabilidade às membranas biológicas.

Também foi medida a área de superfície polar da molécula (TPSA), sendo este um parâmetro bastante utilizado para prever aspectos relacionados à biodisponibilidade oral, solubilidade, permeabilidade da mucosa e estabilidade no trato gastrointestinal. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12, todas as moléculas estão abaixo de 160Å (TPSA) o que sugerindo que a maioria das TSCs podem ser facilmente difundidas, transportadas e absorvida no meio biológico.

Outro parâmetro útil no desenvolvimento de novas drogas é o cálculo e a predição de alvos em relação aos aspectos farmacodinâmicos. Neste sentido o *Molinspirations*[®] se torna uma ferramenta versátil, pois além de prever os parâmetros essencial do perfil farmacocinético, sua opção *predict bioactivity* (prever a bioatividade) ajuda a elucidar aspectos relacionados à ligação com a proteína G, a moduladores dos canais iônicos, a ligação com receptores nucleares, a inibidores de quinases e proteases e a outros alvos enzimáticos biológicos (ARRUDA, 2020).

O *Molinspirations*[®] apresenta scores que indicam a biodisponibilidade do alvo, sendo que valores maiores de 0,0 apresenta boa biodisponibilidade, enquanto valores entre -5,0 e 0,0 apresentam uma biodisponibilidade moderada e abaixo de -5,0 prediz inatividade (ALVES, 2019; ARRUDA, 2020; CAIANA, 2020).

Os resultados experimentais do perfil farmacodinâmico obtidos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Perfil farmacodinâmico das TSCs pela plataforma *Molinspiration*®.

	Ligante proteína G	Modulador canal iônico	Inibidor protease	L receptor nuclear	Inibidor quinase	Inibidor enzima
H1	-0,96	-0,89	-0,93	-1,05	-0,85	-0,57
H2	-0,94	-0,93	-0,92	-0,99	-0,83	-0,60
H3	-0,93	-0,83	-0,86	-0,92	-0,84	-0,60
H4	-0,89	-0,86	-0,90	-0,98	-0,80	-0,58
H5	-0,82	-0,81	-0,77	-0,88	-0,72	-0,51
H6	-0,77	-0,86	-0,76	-0,93	-0,73	-0,52
H7	-0,63	-0,66	-0,57	-0,66	-0,52	-0,39
H8	-0,75	-0,76	-0,74	-0,76	-0,65	-0,44
H9	-0,71	-0,73	-0,66	-0,80	-0,60	-0,45
H10	-0,61	-0,74	-0,62	-0,69	-0,65	-0,42
H11	-0,69	-0,73	-0,62	-0,75	-0,61	-0,43
H12	-0,81	-0,80	-0,82	-0,91	-0,75	-0,55
H13	-0,72	-0,83	-0,65	-0,77	-0,68	-0,49
H14	-0,76	-0,77	-0,70	-0,81	-0,66	-0,48
H15	-0,98	-0,85	-0,88	-0,87	-0,92	-0,68
H16	-0,76	-0,79	-0,73	-0,80	-0,64	-0,49
Bz	-0,33	-0,39	-0,05	-0,71	-0,49	-0,02
Nx	-0,93	-1,40	-0,81	-1,61	-0,73	-0,58

De acordo com a Tabela 13, verifica-se que todas as TSCs obtiveram desempenho moderado em relação à biodisponibilidade. Comparando com os fármacos de referência, tanto o Nfx quanto o Bz apresentaram parâmetros na faixa de atividade moderada, sendo o Nfx um valor ainda menor no que se refere à modulação do canal iônico e receptor nuclear. Em termos clínicos, este resultado para Nfx pode ter relação com seus graves efeitos tóxicos no organismo humano. Algumas pesquisas buscam associar as drogas atuais do tratamento da DC em baixas doses com outras moléculas seguras como o Alopurinol e antifúngicos, de forma a atacar o protozoário com um arsenal menos tóxicos e mais efetivo (MONTEIRO, 2019; MAZZETI, 2014).

De forma geral este trabalho reforça a importância e confiabilidade que os resultados da modelagem molecular trazem em relação aos testes experimentais e reforça a proeminente atividade das TSCs como potentes candidatas ao tratamento da DC.

6.0 CONCLUSÃO

- A partir dos ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados neste trabalho, ficou comprovada a potente atividade de inibição tanto da cruzaina, quanto do *T. cruzi* pelas TSCs;
- Nos ensaios de cinética enzimática e fenotípicos todas as TSCs obtiveram resultados satisfatórios graus de inibição da cruzaina e do *T. cruzi* respectivamente, com destaque para os compostos **H7**, **H10** e **H11**;
- Os compostos mais ativos nos testes teóricos também foram os mais ativos nos testes experimentais, dos quais se destacam os compostos de **H7**, **H10** e **H11**;
- Os compostos mais promissores obtiveram interações relevantes com resíduos da tríade catalítica da enzima cruzaina;
- Com exceção dos compostos **H3** e **H15**, todas TSCs demonstraram bons perfis de segurança em células de fibroblatos (HFF-1);
- Nos ensaios farmacocinéticos e farmacodinâmicos, as TSCs apresentaram perfil similar aos fármacos de referência;
- De forma geral, neste trabalho as TSCs provam promissoras no tratamento da DC e como perspectiva sugere-se, estudos quantitativos de relação estrutura atividade (QSAR), além de modificações estruturais nos compostos mais promissores, buscando uma melhor otimização no potencial tripanocida.

7.0 BIBLIOGRAFIAS

AGAMAH, F. E. et al. Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. *Briefings in bioinformatics* v. 21,5 (2020), 1663-1675, <https://doi:10.1093/bib/bbz103>.

ALEMKERE, G; TENNA, A; ENGIDAWORK, E. Antibiotic use practice and predictors of hospital outcome among patients with systemic bacterial infection: identifying targets for antibiotic and health care resource stewardship. *Plos One*, v. 14, n. 2, (2019), 1-16, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212661>.

ALENCAR, S. Utilização de ferramentas computacionais para o estudo do impacto funcional e estrutural de nsSNPs em genes codificadores de proteínas. Tese (Doutorado em Bioinformática) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

ALEXANDRE, J. P; TESTON, A. P. M; ZANUSSO, J. G. Tratamento etiológico da doença de chagas: um antigo problema de saúde pública. *Revista Uningá Review*, [S.], v. 20, n. 2, nov. 2014.

ALMEIDA, V. L. et al. Estudos de relações estrutura-atividade quantitativas (QSAR) de bis-benzamidinas com atividade antifúngica. *Química Nova* [online]. v. 33, n. 7, (2010), 1482-1489, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000700011>.

ALQAHTANI, M. S. et al. Advances in oral drug delivery. *Frontiers in pharmacology*, v. 12, (2021), p. 618411, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.618411>.

ALVES, V. M. et al. Químioinformática: uma introdução. *Química Nova*, v. 41, n. Quím. Nova, v. 41(2), (2018), p. 202–212, <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170145>.

ANDRADE, S. F. Manual de terapêutica veterinária. 2ª ed. cap. 3. p.23. ed. Rocca. São Paulo. 2002.

ANDRICOPOULO, A. D; FERREIRA, L. G. Medicamentos e tratamentos para a Covid-19. *Estudos Avançados* [online], v. 34, n. 100, (2020) p. 7-27, <https://doi.org/10.1590/s0103-4014.2020.34100.002>.

ANTUNES, K; BUSATO, M. A; LUTINSKI, J. A. Epidemiological profile of diseases transmitted by insect vectors in Brazilian municipalities located in the border region with Argentina. *Research, Society and Development*, [S. I.], v. 10, n. 17, (2021), p. e112101724070, <https://doi:10.33448/rsd-v10i17.24070>.

ARAUJO, A. J. G; SABROZA, P. C; SILVA, L. F. Situação atual da epidemiologia da doença de Chagas. *Epidemiologia da doença de Chagas - Fiocruz*. 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/doenca/epidemiologia/>. Acesso 15 jun 2021.

ARFA, B. A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol*. v. 43. (2006), p.149-154, <https://doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x>.

AROOJ, M. et al. Molecular modeling study for inhibition mechanism of human chymase and its application in inhibitor design. PLoS One, v. 8, n. 4, (2013), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060470>.

ARRUDA, I. E. et al. Preparação de hidrazona e n-acilidrazona usando fármacos comerciais como reagentes: aulas práticas de síntese de compostos bioativos. Química Nova, v. 43, (2020), p. 642-648, <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170497>.

ARSLAN, B. A. et al. The iron (III) and nickel (II) complexes with tetradentate thiosemicarbazones. Synthesis, experimental, theoretical characterization, and antiviral effect against SARS-CoV-2. Journal of Molecular Structure, v. 1246, (2021), p. 131166, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131166>.

ASSIS, D. R. R. de et al. 4-Chlorophenylthioacetone-derived thiosemicarbazones as potent antitrypanosomal drug candidates: Investigations on the mode of action. Bioorganic chemistry v. 113, (2021), p.105018, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105018>.

AUNIQ, R. B. J. et al. Assessment of anti-nociceptive and anthelmintic activities of Vitex Peduncularis Wall. leaves and in silico molecular docking, ADME/T, and PASS prediction studies of its isolated compounds. JOURNAL OF complementary medicine research, v. 10, n. 4, (2019), p. 170–185, <https://10.5455/jcmr.20190805024523>.

AUSTIN, D. Carvacrol: Mercado 2021, tamanho da indústria, participação, análise global, status de desenvolvimento, tendências Regionais, avaliação de oportunidades e estudo abrangente de pesquisa até 2026. Rev Coimbra Diário. 2021. Disponível em: <https://www.researchreportsworld.com/enquiry/request-sample/19205314>. Acesso 08 nov 2021.

AVELAR, L. A. A. Síntese de inibidores das enzimas cruzaina e Diidroorotato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestre em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

AYAR, A. et al. Antioxidant, Cytotoxic Activity and Pharmacokinetic Studies by Swiss Adme, Molinspiration, Osiris and DFT of PhTAD-substituted Dihydropyrrole Derivatives. Current computer-aided drug design v. 18, n.1, (2022), p. 52-63, <https://doi.org/10.2174/1573409917666210223105722>.

AZAMBUJA, P; GARCIA, E. S. O ciclo do *Trypanosoma cruzi* no inseto vetor. Fisiologia – FIOCRUZ. 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/vetor/fisiologia/>. Acesso 15 jun 2021.

BAI, S. B; GEETHAVANI, M; RAMAKRISHNA, C. Synthesis Characterization and Molinspiration Analysis, Anti-bacterial activity of Novel 2,4,6-tri Substituted Pyrimidines. Journal of Young Pharmacists, v. 14(2), (2022), p.174-178, <https://doi.org/10.5530/jyp.2022.14.33>.

BAJAJ, K; BUCHANAN, R. M.; GRAPPERHAUS, C. A. Antifungal activity of thiosemicarbazones, bis (thiosemicarbazones), and their metal complexes. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 225, (2021), p. 111620, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111620>.

BAKER, C. H; WELBURN, S. C. The Long Wait for a New Drug for Human African Trypanosomiasis. Trends in parasitology. v. 34, n. 10, (2018), p. 818-827, <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.08.006>.

BARREIRO, E. J; FRAGA, C. A. M. Química medicinal: bases moleculares da ação dos fármacos. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, p.608. 2015.

BARROS, M. E. S. B. Estudos de *Docking* Molecular, síntese e atividade biológica de análogos da (-)- massoialactona e da combretastatina A-4. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

BASER, K. H. C. Biological and pharmacological activities of carvacrol and essential oils containing carvacrol. Current Pharmaceutical Design.v. 14, n. 29, (2008), p.3106-19, <https://doi: 10.2174/138161208786404227>.

BISELLI, R. et al. Uma revisão histórica das estratégias médicas militares para combater doenças infecciosas: dos campos de batalha à saúde global. Biomedicines v.10, n. 8, (2022), p.2050, <https://doi.org/10.3390/biomedicines10082050>.

BOUFAS, W. et al. Synthesis and antibacterial activity of sulfonamides. SAR and DFT Studies. Journal of Molecular Structure. v.1074, (2014), p. 180-185, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.05.066>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. Bol Epidemiol [Internet]. Abr; 51,1-43. 2020. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Acesso 10 abril 2023.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. Rev Inst Med Trop; São Paulo. Nov-Dec; 4:389-96. 1962.

BRITO, A. C. O. et al. Um Doenças Negligenciadas: Doença de Chagas e os aspectos atuais do tratamento. Revista de ensino, ciência e inovação em saúde, v. 2, n. 1 (2021), p.19 – 17, <https://doi.org/10.51909/recis.v2i1.69>.

BUENO, R. V. Planejamento de novos candidatos a fármacos tuberculostáticos: modelagem molecular e QSAR. p.109. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Universidade Federal de Goiás - Goiânia, 2013.

CAIANA, R. R. A; FILHO, F. C. M. Estudo farmacológico e toxicológico de um candidato à fármaco derivado da d-glicose. I CONIMAS e III CONIDIS/2019, v.1, Campina Grande: Realize Editora, (2020), p. 747-761. Disponível em: <<https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/65008>>. Acesso em: 15 Dez 2022.

CHAVEZ, R. M. E. Desenvolvimento de Novos Inibidores da Enzima Cruzaína de *T. Cruzi*. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2017.

CAMPOS, D. F. et al. Farmacocinética e farmacodinâmica da associação das sulfas e trimetoprim. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*. Ano VII. Número 12. (2009), p. 1679-7353, Garça -SP.

CAPUTTO, M. E. et al. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-Trypanosoma cruzi agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, n.22, (2011), p. 6818-6826, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.09.037>.

CARDOSO, M. V. O. Síntese e avaliação de tiossemicarbazonas e tiazolinonas como inibidores da protease cruzaina no Trypanosoma cruzi. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 2008.

CARVALHO, G. A. U. Avaliação do Uso de Técnicas de MMGBSA na Triagem Virtual de Bibliotecas de Ligantes para o Desenvolvimento de Fármacos contra *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*. p.166. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

CERA, T. P; PANCOTE, C. G. Planejamento de fármacos. *Revista científica UNILAGO*. p. 137 a 148. 2004.

CERQUEIRA, N. Avogadro. *Revista Ciência Elementar*, v. 4, n. 2, (2016), p. 017, <http://doi.org/10.24927/rce2016.017>.

CHACHULSKI, L; WINDSHUGEL, B. LEADS-FRAG: A Benchmark Data Set for Assessment of Fragment Docking Performance *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 60, n. 12, (2020), p. 6544-6554, <https://doi:10.1021/acs.jcim.0c00693>.

CHEIN, F. Introdução aos modelos de regressão linear: um passo inicial para compreensão da econometria como uma ferramenta de avaliação de políticas públicas. Brasília: Enap, (2019) p. 76. Disponível em:< <http://repositorio.enap.gov.br/handle/1/4788>>. Acesso 04 de Jun 2023.

CHODANKAR, R; MAHAJAN, A. Characterization and in-silico toxicity prediction of the oxidative degradation products of Pimozide. *Sep Sci plus*. v. 5, (2022), p. 275 – 284, <https://doi.org/10.1002/sscp.202100065>.

CORDEIRO, G. A; ZAMORA, P. P; NAGATA, M. Determinação de misturas de sulfametoxazol e trimetoprima por espectroscopia eletrônica multivariada. *Rev Química Nova*, v.31, n. 2, (2008), <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000200012>.

CORNÉLIO, V. E. Estudo de novas metodologias para realização de ensaios com a catepsina D na busca de inibidores. Tese (Doutorado em ciências) do Programa de pós graduação em química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos -SP, 2015.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. Outubro, v. 30, n. 102, (2007), p.113-22, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000900018>.

CRUZ, J. H. A. et al. Análise da atividade farmacológica e toxicológica do monoterpene relacionado à Odontologia: estudo *in silico*. Archives of health investigation, v. 8, n. 11 (2020), <https://doi.org/10.21270/archi.v8i11.4314>.

CUNHA, E. L. A. Avaliação do tratamento com benznidazol, itraconazol e sua associação na fase aguda da doença de Chagas experimental no modelo cão. p.69. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

DAVANÇO, M. G. Farmacocinética do Benznidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada. p.142. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015.

DAVID, A. et al. The AlphaFold database of protein structures: a guide for biologists. Journal of molecular biology, v. 434, n. 2, (2022), p. 167336, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167336>.

DEVI, J; KUMAR, B; TAXAK, B. Recent advancements of organotin (IV) complexes derived from hydrazone and thiosemicarbazone ligands as potential anticancer agents. Inorganic Chemistry Communications, v.139, (2022), p. 109208, <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.109208>.

DIAS, G. T. Avaliação da toxicidade *in silico* e das atividades hemolítica, antioxidante e antibacteriana *in vitro* das formas óleo essencial e óleo essencial microencapsulado de lippia pedunculosa. Graduação (Farmácia) - Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa-PB, 2018.

DIAS, J. C. P. et al. Aspectos Gerais da Epidemiologia da Doença de Chagas com Especial Atenção ao Brasil. Epidemiologia e serviços de saúde: rev do Sistema Único de Saúde do Brasil, [s. l.], v. 25, (2016), p. 7 - 86, <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000500002>.

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Epidemiologia e Serviços de Saúde. Brasília-DF, v. 25, (2015), p. 7-86, <https://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742016000500002>.

DIOGO, G. M. Síntese e avaliação da atividade anti Trypanosoma cruzi de flavanonas bioativas. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós graduação em Química da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro preto – MG, 2019.

DMITRIENKO, S. G. et al. Recent advances in samples preparation techniques and methods of sulfonamides detection – A Review. Analytica Chimica Acta, v. 850, (2014), p. 6-25, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.08.023>.

DU, X. et al. Synthesis and structure-activity Relationship Study of potent Trypanocidal Thio semicarbazone inhibitors of the Trypanosomal Cysteine protease Cruzain. Journal of Medicinal Chemistry, v. 45, n. 13, (2002), p. 2695–2707, <https://doi.org/10.1021/jm010459j>.

DUARTE-SILVA, E. et al. Targeting the Gut Microbiota in Chagas Disease: What Do We Know so Far?. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, (2020), p. 585857, <https://doi.11.10.3389/fmicb.2020.585857>.

ELIAS, T. C. et al. MB-Isoster: um *software* para simulação de bioisosterismo.. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2018.

ENGEL, J. C. et al. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine*, v. 188, n. 4, (1998), p. 725-34, <https://doi:10.1084/jem.188.4.725>.

ERBETTA, G. M. Degradação fotolítica de sulfonamidas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Universidade Estadual de Campinas, Campinas -SP, 2017.

ESPINDOLA, J. W. P. Planejamento estrutural, síntese e avaliação das propriedades *anti-T.cruzi* de novas aril-tiossemicarbazonas. Tese (DOUTORADO). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, 2015.

FERREIRA, A. M. et al. Avaliação do conhecimento acerca do manejo clínicos de portadores da doença de chagas em região endêmica no Brasil. *Revista de APS*, v. 21, n. 3, (2018), p. 345 – 354, <https://doi.org/10.34019/1809-8363.2018.v21.16230>.

FERREIRA, R. A. A. et al. Structure-Based and Molecular Modeling Studies for the Discovery of Cyclic Imides as Reversible Cruzain Inhibitors With Potent Anti-Trypanosoma cruzi Activity. *Frontiers in chemistry*, v. 7, (2019), p.798, <https://doi:10.3389/fchem.2019.00798>.

Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of potent noncovalent and nonpeptidic cruzain inhibitors as anti-Trypanosoma cruzi agents

FERREIRA, R. S. et al. . *Journal of Medicinal Chemical*, v.57, n. 6, (2014), p. 2380-2392, <https://doi.org/10.1021/jm401709b>.

FERREIRA, R. S. et al. Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 13, (2010), p. 4891-4905, <https://doi.org/10.1021/jm100488w>.

FILHO, A. M. O. O Controle Vetorial da Doença de Chagas. Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. 2017. Disponível em: <https://chagas.fiocruz.br/fisiologia/>. Acesso 10 jan 2021.

FONSECA, E. B. Planejamento de Inibidores da Cruzaína baseado em Fragmentos. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2011.

GABER, A. et al. New Mononuclear and Binuclear Cu(II), Co(II), Ni(II), and Zn(II) Thiosemicarbazone Complexes with Potential Biological Activity: Antimicrobial and Molecular Docking Study *Molécules*, v. 26, n. 8, (2021), p. 2288, <https://doi.org/10.3390/molecules26082288>.

GALVAO, C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, <https://doi.org/10.7476/9788598203096>.

GATTI, F. M. Compostos carbonílicos α , β insaturados e hidrazonas sintéticas como antiparasitários. Tese (Doutorado em Farmácia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

GONÇALVES, J. A. O circuito do medicamento: da molécula à farmácia. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa, Porto – Portugal, 2011.

GROSSI, J. C. Avaliação da toxicidade de tiosemicarbazonas derivadas de benzaldeído, acetofenona e benzofenona frente a larvas de *Aedes aegypti*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e biológica molecular) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, Governador Valadares, 2018.

GUARNERI, A. A; LORENZO, M. G. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. *Journal of Insect Physiology*, v. 97, (2017), p. 66-76, <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.07.005>.

GUERRA, T. M. Estudos de *docking* molecular de derivados da tiazolidina como potenciais inibidores da enzima cruzaina de *trypanosoma cruzi*. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Unidade Acadêmica de Serra Talhada da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada - PE, 2019.

GUIDO, R. V. C; ANDRICOPULO, A. D; OLIVA, G. Drug design, biotechnology and medicinal chemistry: applications to infectious diseases. *Estudos avançados – Dossiê tecnologia*, v. 24, n. 70, (2010), p. 81-98, <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300006>.

GUIMARAES, D. G. et al. Biological Potential of Synthetic Hydrazones in the Last Decade: A Systematic Review. *Revista Virtual de Química*, v. 9, (2017), p. 2551-2592, <https://10.21577/1984-6835.20170151>.

HANEE, U; RAHMAN, Md. R; MATIN, M. M. Synthesis, PASS, In silico ADMET and Thermodynamic Studies of Some Galactopyranoside Esters. *Physical Chemistry Research*, v. 9, n. 4, (2021), p. 591-603, <https://doi:10.22036/pcr.2021.282956.1911>.

HERRERA-MAYORGA, V. et al. Structure-Based Virtual Screening and In Vitro Evaluation of New *Trypanosoma cruzi* Cruzain Inhibitors. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 7 (2019), p. 1742, <https://doi:10.3390/ijms20071742>.

HOMMA, A; FREIRE, M. S; POSSAS, C. A. Vacinas para doenças negligenciadas e emergentes no Brasil até 2030: o “vale da morte” e oportunidades para PD&I na Vacinologia 4.0. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 36, supl. 2, (2020), p. 1-18, <https://doi.org/10.1590/0102-311X00128819>.

IBÁÑEZ-ESCRIBANO, A. et al. Thio-and selenosemicarbazones as antiprotozoal agents against *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Enzyme*

Inhibition and Medicinal Chemistry, v. 37, n. 1, (2022), p. 781-791, <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2041629>.

JÁSZ, Á. et al. Optimized GPU implementation of Merck molecular force field and universal force field. Journal of Molecular Structure, v. 1188, (2019), p. 227-233, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.04.007>.

JASINSKI, G. et al. Thiosemicarbazone derivatives: evaluation as cruzipain inhibitors and molecular modeling study of complexes with cruzain Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 61, (2022), p. 116708, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2022.116708>.

JAWARIA, R. et al. Synthesis and characterization of ferrocene-based thiosemicarbazones along with their computational studies for potential as inhibitors for SARS-CoV-2. Journal of the Iranian Chemical Society, v. 19, (2022), p. 839 – 846, <https://doi.org/10.1007/s13738-021-02346-1>.

JAYASHREE, B. S; NIKHIL, P. Sai; PAUL, Soumyajeet. Bioisosterism in Drug Discovery and Development-An Overview. Medicinal Chemistry, v. 18, n. 9, (2022), p. 915-925, <https://doi.org/10.2174/1573406418666220127124228>.

JUNIOR, M. A. F. Reposicionamento de fármacos para o tratamento da doença de Chagas: desenvolvimento de modelos computacionais baseados em ligantes ativos fenotipicamente contra o *Trypanosoma cruzi* e na inibição da diidroorotato desidrogenase. Dissertação (Mestrado em Insumos Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

JUNIOR, V. J. B. Benznidazol associado a outros fármacos para o tratamento da doença de Chagas. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Enfermagem) - Universidade de Brasília, Brasília-DF. 2018.

KANSO, F. et al. Therapeutic perspective of thiosemicarbazones derivatives in inflammatory pathologies: A summary of in vitro/in vivo studies. International Immunopharmacology, v. 96, (2021), p. 107778, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107778>.

KAZMI, S. R. et al. In silico approaches and tools for the prediction of drug metabolism and fate: A review. Computers in biology and medicine, v. 106, (2019), p.54-64, <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2019.01.008>.

KISHIMA, E. Utilização da ferramenta *in silico* para a modulação do perfil de liberação de indapamida sob a forma de pellets de dissolução prolongada. Trabalho de conclusão de curso (Farmácia-bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

LAKHERA, S. et al. In silico Investigation of Phytoconstituents of Medicinal Herb 'Piper Longum' Against SARS-CoV-2 by Molecular Docking and Molecular Dynamics Analysis. Results in chemistry, v. 3, (2021), p. 100199, <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100199>.

LAMEIRO, R. F. Atividade *anti-Trypanossoma cruzi* de agentes não peptídicos como inibidores da Cisteína Protease cruzaina. Dissertação (Mestrado em Ciências: Química orgânica e biológica) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

LIMA, L. et al. Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*-like and other trypanosome species. PLoS One, v. 7, n. 6, (2012), p. e38385, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038385>.

LIMA, L. M. Modern Medicinal Chemistry: challenges and Brazilian contribution. Revista química Nova, v. 30, (2007), p. 1456-1468, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000600015>.

LIPINSKI, C. A; MCKERROW, J. H. The rule of five should not impede anti-parasitic drug development. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 7, n. 2, (2017), p. 248-249, <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2017.05.003>.

LOPES, R. A. P. Síntese e avaliação *in vitro* de novos derivados de tiossemicarbonas como compostos biologicamente ativos. Dissertação (Mestrado em Química Bioorgânica) - Departamento de Química da Universidade Nova de Lisboa, 2022.

MADDEN, J.C et al. A Review of *in silico* Tools as alternatives to animal testing: principles, resources and applications. Alternatives to Laboratory Animals, v. 48, n. 4, (2020), p. 146-172, <https://doi:10.1177/0261192920965977>.

MAFUD, A. et al. Discovery of novel antischistosomal agentes by molecular modeling. Trends in parasitology, v. 32, n. 11, (2016), p. 874-886, <https://doi:10.1016/j.pt.2016.08.002>.

MAK, K; PICHKA, M. R. Artificial intelligence in drug development: present status and future prospects. Drug Discovery Today, v. 24, n. 3, (2019), p. 773-780, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.11.014>.

MARTINS, L. C. et al. Experimental and Computational Study of Aryl-thiosemicarbonas Inhibiting Cruzain Reveals Reversible Inhibition and a Stepwise Mechanism. Journal of chemical information and modeling, v. 63, n. 5, (2023), p.1506-1520, <https://doi:10.1021/acs.jcim.2c01566>.

MARTINS, L. C. et al. Investigation of the binding mode of a novel cruzain inhibitor by docking, molecular dynamics, ab initio and MM/PBSA calculations. Journal of computer-aided molecular design, v. 32, n. 5, (2018), p. 591-605, <https://doi:10.1007/s10822-018-0112-3>.

MARTINS, E.G.M. Regressão linear simples, Revista Ciência Elementar, v.7, n.3, <http://doi.org/10.24927/rce2019.045>.

MATORE, B. W; ROY, P. P; SINGH, J. M. Discovery of novel VEGFR2-TK inhibitors by phthalimide pharmacophore based virtual screening, molecular docking, MD simulation and DFT. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, (2023), p. 1-22, <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2178510>.

MAZZETI, A. L. Benznidazol em combinação com alopurinol: aumento da atividade *anti-Trypanosoma cruzi in vitro e in vivo*. Dissertação (Mestrado em Ciências

Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

MEMAR, M. Y. et al. Carvacrol and thymol; Strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews in Medical Microbiology*, n. 28. (2017), p.63-68, <https://doi.org/10.1097/MRM.000000000000100>.

MENDES, E. P. Investigação da atividade antileishmania *in vitro* de chalconas-tiossemicarbazonas. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2019.

MILOVANOVIC, M. et al. The effect of cavacrol on inflammatory pain and motor coordination in rats. *Acta Veterinaria-Beograd*, v. 66, (2016), p. 478-488, <https://doi.org/10.1515/acve-2016-0041>.

MONTEIRO, A. I. Doença de Chagas: análise e perspectivas futuras. Trabalho de conclusão de curso (Farmácias - bioquímica) – Faculdade de ciências farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

MUNIZ, H. S. Métodos híbridos em docagem molecular: implementação, validação e aplicação. Tese (Doutorado em ciências) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

NASCIMENTO, I. J. S. Síntese, avaliação biológica e estudos *in silico* de novos compostos tiazólicos e tiadiazínico com potencial frente ao *Trypanosoma cruzi* e *leishmania amazonensis*. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2022.

NEVES, G. M. Planejamento *in silico* de novos inibidores da enzima Guanina Fosforibosil Transferase de *Giardia lamblia* como possíveis candidatos a fármacos antiparasitários. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

NWEZE, J. A; MBAOJI, F.N; LI, Y. M. et al. Potentials of marine natural products against malaria, leishmaniasis, and trypanosomiasis parasites: a review of recent articles. *Infect Dis Poverty*, v. 10, n. 9, (2021), p. 1-19, <https://doi.org/10.1186/s40249-021-00796-6>.

OJUKA, P. et al. Phytochemistry of the Vepris genus plants: A review and *in silico* analysis of their ADMET properties. *South African Journal of Botany*, v. 157, (2023), p. 106-114, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.03.057>.

OLIVEIRA, A. S. et al. Antioxidant and Antibacterial Activity of Sulfonamides Derived from Carvacrol: A Structure-Activity Relationship Study. *Current Topics Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 3, (2020), p.173-181, <https://doi.org/10.2174/1568026619666191127144336>.

OLIVEIRA, A. S. Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos agentes quimioterápicos para o tratamento da doença de Chagas. Projeto pesquisa (Pós doutorado) - Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, SP. 2019.

OLIVEIRA, J. P. B. Peptidases intestinais de *Danaus plexippus l.* Como uma nova perspectiva na produção de um leite hipoalergênico. Graduação (Ciências Biológicas) - Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza -CE, 2016.

PAGOTTI, M. C. et al. Exploring Synthetic Dihydrobenzofuran and Benzofuran Neolignans as Antiprotozoal Agents against *Trypanosoma cruzi*. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 3, (2023), p. 754, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030754>.

PAPPALARDO, F. et al. In silico clinical trials: concepts and early adoptions. *Briefings in bioinformatics* v. 20, n. 5, (2019), p.1699-1708. <https://doi:10.1093/bib/bby043>.

PAULI, I. Planejamento de inibidores da enzima cruzaina candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

PEÑA, A. F. T. Planejamento, síntese e avaliação biológica de inibidores de cruzaina para o tratamento da doença de chagas. Dissertação (Mestre em Química) - Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2022.

PEREIRA, D. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. *Química Nova*, v. 30, (2007), p. 171-177, <https://doi:10.1590/S0100-40422007000100029>.

PERES, R. B. et al. Identification and preliminary structure-activity relationship studies of novel pyridyl sulfonamides as potential Chagas disease therapeutic agentes. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 28, n.11 (2018), p. 2018-2022, <https://doi:10.1016/j.bmcl.2018.04.064>.

PIRES, D. E. V; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of medicinal chemistry*, v. 58, n. 9, (2015), p. 4066-4072, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>.

PIROLLA, N. F. Modelagem molecular de ligantes de receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 7$ para a doença de Alzheimer. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química (IQ) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara -SP, 2018.

POLO-CERON, D. Cu (II) and Ni (II) complexes with new tridentate NNS thiosemicarbazones: Synthesis, characterisation, DNA interaction, and antibacterial activity. *Bioinorganic chemistry and applications*, v. 2019, (2019), <https://doi.org/10.1155/2019/3520837>.

PONTES, V. M. O et al. Adverse reactions in Chagas disease patients treated with benznidazole, in the State of Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [s. l.], v. 43, n. 2, (2010), p. 182–187, <https://doi.org/10.1590/s0037-86822010000200015>.

PRAJAPATI, N. P; PATEL, H.D. Novel thiosemicarbazone derivatives and their metal complexes: recent development Synthetic Communications, v. 49, n. 21, (2019), p. 2767-2804, <https://doi.org/10.1080/00397911.2019.1649432>.

RABELLO, M. M. Desenvolvimento e automação de metodologias *in silico* para o estudo de complexos de inclusão utilizados na inovação terapêutica. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

RAJALAKSMI, R. et al. In silico studies: Physicochemical properties, drug score, toxicity predictions and molecular docking of organosulphur compounds against Diabetes mellitus. Journal Molecular Recognition, v. 34, n.11, (2021), p. e2925, <https://doi.org/10.1002/jmr.2925>.

REDDY, K. K. et al. Performance evaluation of docking programs- Glide, Gold, AutoDock & SurflexDock, using free energy perturbation reference data: A case study of fructose-1, 6-bisphosphatase-AMP analogs. Mini reviews in medicinal chemistry, v. 20, n. 12, (2020), p.1179-1187, <https://doi:10.2174/1389557520666200526183353>.

REIS, C. R. C. Estudo *in silico* do comportamento dinâmico da enzima cruzaina do *Trypanosoma cruzi* nas formas APO e complexada com inibidores competitivos e não covalentes da classe benzimidazol. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos Para a Saúde) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense, Niterói – RJ, 2021.

REIS, E. C. *Docking* e análise do modo de ligação de três moléculas pequenas, um benzimidazol e dois compostos de crômio, nos sulcos do DNA 5'-CGCGAATTCGCG-3'. 84 f. Dissertação (Mestrado em ciências e tecnologia de materiais) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências de Bauru, 2008.

REIS, L. E; CORREIA, A. J; MOMESSO, L. S. Importância da modelagem molecular para o desenho de novas moléculas bioativas. Universidade Paulista Campus Assis-SP. 2016. Disponível em: https://cic.unifio.edu.br/anaisCIC/anais2016/pdf/09_11.pdf. Acesso 17 abr 2021.

REIS, Rodrigo Souza Silva Valle dos. Avaliação *in silico* de fármacos comerciais para reposicionamento na terapêutica da tuberculose. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2020.

REYES, C. D. C. Sínteses e caracterização química de dipeptidilnitrilas como inibidores da enzima cruzaina visando atividade antiparasitária no *Trypanosoma cruzi*. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

RIBEIRO, D. M. et al. Epidemiological overview of Leprosy, neglected tropical disease that plagues northeast Brazil. Research Society and Development, [S. l.], v. 11, n. 1, (2022), p. e23111124884, <https://10.33448/rsd-v11i1.24884>.

ROCHA, D. A. Síntese de inibidores da cruzaina e rodesaina. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre -RS, 2018.

RODRIGUES, L. M. S. Estudos de *Docking* molecular de derivados tiazóis com a BSA e como potenciais intercaladores de DNA e inibidores da topoisomerase II. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Unidade Acadêmica de Serra Talhada da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, 2019.

RODRIGUES, R. P. et al. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. *Revista Virtual de Química*, v. 4, n. 6, (2012), p. 739-776. Goiânia-GO. 2012. Disponível em: <<https://rvq-sub.s bq.org.br/index.php/rvq/article/view/295>>. Acesso 22 Dez 2022.

RODRIGUES, G. S et al. O uso de *softwares* livres em aula prática sobre filtros moleculares de biodisponibilidade oral de fármacos. *Química Nova*, v. 44, (2021), p. 1036-1044, <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170739>.

SAJID, M. et al. Cruzain: the path from target validation to the clinic. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 712, (2011), p. 100-15, https://doi:10.1007/978-1-4419-8414-2_7.

SANTOS, E. F. et al. Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 14, n. 8 (2020), p. e0008445, <https://doi:10.1371/journal.pntd.0008445>.

SANTOS, V. L. A; GONSALVES, A. A; ARAÚJO, C. R. M. Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de Lipinski e preparação de heterociclo 1,3,4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. *Química Nova*, v. 41, n. 1, (2017), p. 110–115, <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170135>.

SAPUNDZHI, F; PRODANOVA, K; LAZAROVA, M. Survey of the scoring functions for protein-ligand docking. *AIP Conference Proceedings*, v. 2172, n.1, (2019), p. 100008, <https://doi.org/10.1063/1.5133601>.

SCANDELAI, G. A. B. Avaliação *in vitro* e *in silico* das atividades inibidoras de urease e de acetilcolinesterase de chás comercializados em sachês. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2021.

SENS, L. S. et al. Synthetic thiosemicarbazones as a new class of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase A inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 26, (2018), p. 5742-5750, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.10.030>.

SHAKYA, B; YADAV, P. N. Thiosemicarbazones as potent anticancer agents and their modes of action. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 8, (2020), p. 638-661, <https://doi.org/10.2174/1389557519666191029130310>.

SILVA, A. F; LATORRE, M. R. D. O; GALATI, E. A. B. Fatores relacionados à ocorrência de leishmaniose tegumentar no Vale do Ribeira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 1, (2010), p. 46–51, <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000100011>.

SILVA, A. P. et al. Doenças negligenciadas e indústria farmacêutica: o caso da Doença de Chagas. *Research Society and Development*, v. 10, n.2, (2021), p. e21110212419-e21110212419, <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12419>.

SILVA, G. A. T. Síntese, caracterização e avaliação antimicrobiana de novos derivados do timol e carvacrol. Tese (doutorado em produtos naturais e sintéticos bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

SILVA, G. G; AVIZ, G. B; MONTEIRO, R. C. Perfil epidemiológico da Doença de Chagas aguda no Pará entre 2010 e 2017. *Pára Research Medical Journal*, v.4, (2020), <https://dx.doi.org/10.4322/prmj.2019.029>.

SILVA, H. B. Novos complexos de prata (i) contendo tiosemicarbazonas derivados do cinamaldeído: síntese, caracterização e estudos biológicos preliminares. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Química) - Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2022.

SILVEIRA, A. D. S. G. Triagem virtual de compostos análogos a fármacos inibidores de recaptção de serotonina como possíveis anticolinesterásicos. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química) – Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, RS, 2023.

SIQUEIRA, L. R. P. et al. Multi-target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 170, (2019), p. 237-260, <https://doi:10.1016/j.ejmech.2019.03.024>.

SOUZA, R. A. C; OLIVEIRA, C. G. Investigação teórica por *docking* molecular e parâmetros farmacocinéticos do potencial antibacteriano de complexos de manganês(ii) com tiosemicarbazonas. *Open science research II*, cap. 46, (2022), p. 576 - 593, <https://doi.10.37885/220207882>.

SOUZA, E. P. Cistatinas de maqui: produção recombinante e inibição de cisteíno peptidases. 2022. Dissertação (Mestrado em Genética evolutiva e biologia molecular) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2022.

SPIEGEL, J; SENDEROWITZ, H. Towards an Enrichment Optimization Algorithm (EOA)-based Target Specific Docking Functions for Virtual Screening. *Molecular Informatics*, v. 41, n. 11, (2022), p. 2200034, <https://doi.org/10.1002/minf.202200034>.

SRINIVAS, N. et al. *In vitro* cytotoxic evaluation and detoxification of monocrotaline (Mct) alkaloid: an in silico approach. *International Invention Journal Biochemistry Bioinformatics*, v. 2, n. 3, (2014), p.20-29, Disponível em:< https://www.researchgate.net/publication/262182857_In_Vitro_Cytotoxic_Evaluation_and_Detoxification_of_Monocrotaline_Mct_Alkaloid_An_In_Silico_Approach>. Acesso 14 Ago 2022.

TÉLLEZ, P. G. G. Caracterización del proteosoma 20S en amibas del género *Naegleria*. Tesis (doctora en Ciencias en Infectómica y Patogénesis molecular. Tese (Doctora en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular) en el centro de investigación y de estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, Ciudad de México, 2020.

TENRAZ, M. G. et al. Anti-leishmanial click modifiable thiosemicarbazones: Design, synthesis, biological evaluation and in silico studies. *European Journal of Medicinal chemistry*, v. 151, (2018), pag. 585-600, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.003>.

TEZUKA, D. Y. Caracterização in vitro da atividade de inibidores de cisteíno proteases em parasitos (*Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*) e células de câncer de próstata (DU-145 e a PC-3). Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019, <https://doi.org/10.11606/T.82.2019.tde-29102021-175606>.

TRINDADE, J. D. S. Estudos no reposicionamento do fármaco nimesulida para o tratamento da doença de chagas: preparação de derivados, avaliação da atividade tripanocida e investigações sobre prováveis mecanismos de ação. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós graduação em Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

TROSSINI, G. H. G. Antichagásicos potenciais: busca racional de compostos com ação seletiva pela cruzaina. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

VALVERDE, R. Doenças Negligenciadas. Agência FIOCRUZ, 2013. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>>. Acesso 25 Jul 2021.

VELEZ, A. S. M. M et al. Planejamento e síntese de novos híbridos 1,2,4-triazol-3-tioalquil-nitroimidazólicos com toxicidade seletiva contra amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

VERDONK, M. L. et al. Improved protein-ligand docking using Gold®. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 52, n. 4, (2003), p. 609-623, <https://doi:10.1002/prot.10465>.

VICECONTI, M. et al. Credibility of in silico Trial Technologies - A Theoretical Framing. *IEEE, Journal of Biomedical and Health Informatics*, v. 24, n. 1, (2020), p. 4-13, <https://doi: 10.1109/JBHI.2019.2949888>.

VIEGAS-JUNIOR, C et al. Hibridização molecular: uma ferramenta útil na concepção de novos protótipos de drogas. *Current Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 17, (2007), p. 1829-1852, <https://doi.org/10.2174/092986707781058805>.

VRIES, S. J. de et al. The pepATTRACT web server for blind, large-scale peptide-protein docking. *Nucleic acids research*, v. 45, n.1, (2017), p. 361-W364, <https://doi:10.1093/nar/gkx335>.

WENG, G. et al. Comprehensive Evaluation of Fourteen Docking Programs on Protein-Peptide Complexes. *Journal of chemical theory and computation*, v. 16, n. 6, (2020), p. 3959-3969, <https://doi:10.1021/acs.jctc.9b01208>.

WIGGERS, H. J. Integração de métodos *in silico* e *in vitro* para o planejamento de inibidores da enzima cruzaina. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. Geneva, WHO Publication, 2013.

ZINGALES, B. Trypanosoma cruzi: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas?. *Revista Da Biologia*, v. 6, n. 2, (2018), p.44-48, <https://doi.org/10.7594/revbio.6b.09>.