UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Karolayne Helena Capistrano Andrade

Atividade antiparasitária de compostos sintéticos contra tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis*: estudo *in silico* e *in vitro*

Juiz de Fora
2024

Karolayne Helena Capistrano Andrade

Atividade antiparasitária de compostos sintéticos contra tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis*: estudo *in silico* e *in vitro*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Avaliação Biológica e Farmacológica.

Orientador: Profa. Dra. Lauren Hubert Jaeger

Coorientador: Profa. Dra. Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração
automática da Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Andrade, Karolayne Helena Capistrano.
Atividade antiparasitária de compostos sintéticos contra tripanotiona redutase de Leishmania amazonensis : estudo in silico e in vitro / Karolayne Helena Capistrano Andrade. -- 2024.
116 p. : il.

Orientadora: Lauren Hubert Jaeger
Coorientadora: Priscila Vanessa Zabala Capriles
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. Leishmania amazonensis. 2. Tripanotiona redutase. 3. Triagem virtual. 4. Teste in vitro. 5. Citotoxicidade. I. Jaeger, Lauren Hubert, orient. II. Capriles, Priscila Vanessa Zabala , coorient. III. Título.

Karolayne Helena Capistrano Andrade

Atividade antiparasitária de compostos sintéticos contra tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis*: estudo *in silico* e *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 17 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Lauren Hubert Jaeger - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Isabella Alvim Guedes

Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC)

Dr. Ricardo José Alves

Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Job Domingos Inácio Filho

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Juiz de Fora, 21/11/2024.

Documento assinado eletronicamente por **Lauren Hubert Jaeger**, **Professor(a)**, em 18/12/2024, às 15:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Isabella Alvim Guedes**, **Usuário Externo**, em 18/12/2024, às 16:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Ricardo José Alves**, **Usuário Externo**, em 19/12/2024, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Job Domingos Inácio Filho**, **Usuário Externo**, em 20/12/2024, às 19:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt**, **Professor(a)**, em 17/02/2025, às 19:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2112995** e o código CRC **22187079**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a oportunidade de conclusão desta etapa, primeiramente a Deus pois foi com muita fé e perseverança que consegui concluir essa jornada, Ele sempre me guiando nos caminhos, na estrada, nos estudos, no desconhecido, toda honra e glória a Deus e a Nossa Senhora. Agradeço profundamente aos meus pais, João Antônio e Helena, que sempre me incentivaram, me inspiraram e me apoiaram com amor incondicional, sendo os alicerces sólidos que me conduziram à realização desta pós-graduação e a cada sonho que busquei concretizar. Agradeço de coração ao meu namorado Anderson, que esteve ao meu lado em todos os momentos, acreditou em minha capacidade de superar desafios e sempre me ofereceu apoio incondicional. Ter você ao meu lado é um privilégio, e sua presença sempre foi fundamental para minha jornada. Agradeço também a minha irmã Keitryane pelo apoio. Agradeço imensamente à minha querida mentora, mestre e amiga Lauren, cuja orientação carinhosa e palavras inspiradoras foram fundamentais para o meu desenvolvimento. Com sua sabedoria e generosidade, ela me ensinou a navegar pelos desafios do mundo da parasitologia e da pós-graduação, sempre com paciência e maestria. Sou profundamente grata por todo o aprendizado, oportunidades e apoio que recebi ao longo dessa jornada. Agradeço a coorientadora Priscila e ao colaborador Ari por todo o conhecimento compartilhado e por sua dedicação ao meu desenvolvimento acadêmico. Agradeço também às minhas amigas: Júlia que dividiu comigo os desafios e apoiou dentro do caminho da farmácia, minha amiga Camilly que fez Juiz de Fora também se tornar lar, Ândria, Bianca, Nilcéia, Morgana, Michelly, Daniele que sempre me incentivaram e apoiaram nessa jornada. Agradeço às minhas amigas do Sacolão, Bruna e Val, vocês foram essenciais no apoio aos meus estudos. À minha afilhada Amelíe e minha sobrinha Maitê por serem as doçuras em minha vida, mesmo tão pequenas. Um carinho especial aos meus amigos de laboratório, Victor, Alexandra, Wanderleya, Fernanda, Laura Rezende e Laura, por sempre me ajudarem em tudo e me darem suporte no dia a dia. E também nomes que me ajudaram a chegar ao destino final, como Otávio, Nathalia, Paula e Wander. Aos professores da pós - graduação que sempre foram tão solícitos. Agradeço aos Professores Ricardo Alves e Renata Barbosa, da Universidade Federal de Minas Gerais, por sua valiosa colaboração ao cederem os compostos para os testes, essenciais para o avanço deste trabalho. À Professora Ana Cláudia, parceira de laboratório, pelo suporte nos

experimentos com linhagens humanas e pela ajuda na aquisição dos reagentes necessários para as análises. Ao Professor Edézio Júnior, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela constante disponibilidade, apoio e solidariedade, especialmente durante o período em que estive de licença médica. Ao Dr. Elmo Amaral, ao Dr. Job Domingos e ao Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos, pela colaboração e por terem me recebido tão bem na Fiocruz. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pelo apoio e pela oportunidade de viajar ao MedTrop – Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical em Salvador e à Fiocruz para realização de atividades de campo, que foram essenciais para o desenvolvimento do meu trabalho e pessoal também. Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa, que foi fundamental para a continuidade dos meus estudos e desenvolvimento do meu trabalho acadêmico. E por fim, a todos que torceram pela minha vitória, esse momento é de todos nós.

“Tente,
E não diga que a vitória está perdida
Se é de batalhas que se vive a vida
Tente outra vez”
Raul Seixas

"Tudo posso naquele que me fortalece." - Filipenses 4:13

RESUMO

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e considerada uma doença tropical negligenciada devido à sua alta incidência em regiões com baixo desenvolvimento socioeconômico. A enfermidade ocorre em 98 países e coloca mais de 350 milhões de pessoas em risco de infecção em todo o mundo. A leishmaniose tegumentar, especificamente, causa lesões cutâneas e mucosas que, se não tratadas adequadamente, podem levar a deformidades permanentes e impactar gravemente a qualidade de vida dos indivíduos. O tratamento farmacológico permanece um desafio para os profissionais de saúde, devido a sua toxicidade e a emergência da resistência aos antiparasitários. Nesse contexto, a enzima tripanotiona redutase (TR) surge como um alvo promissor para novas terapias, pois desempenha um papel essencial na defesa antioxidante do parasito, tornando-o vulnerável à ação de inibidores específicos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antiparasitário *in silico* e *in vitro* de compostos de uma biblioteca pública frente a enzima tripanotiona redutase de *L. amazonensis*. A pesquisa envolveu uma triagem virtual utilizando a biblioteca *The Brazilian Compound Library* (BraCoLi) completa, que contém 1.176 compostos. Os testes *in vitro* foram realizados com compostos pertencentes a três grupos químicos: derivados da L-glutamina, derivados da glicosamina e derivados da papulacandina D. Dentre os resultados obtidos, dois grupos químicos se destacaram por apresentarem resultados promissores *in silico* e foram selecionados para os testes *in vitro*. Nos ensaios *in vitro* com promastigotas, o composto derivado da papulocandina-D BR010034 apresentou um CI50 de 82,78 µM, indicando atividade anti-*Leishmania*. O composto derivado da L-glutamina BR010032 por sua vez, destacou-se ao reduzir a atividade enzimática da LaTR, com uma inibição de 63,9%. Análises do perfil farmacocinético *in silico* mostrou potencial para boa absorção por via oral desse último. Quanto à citotoxicidade frente a células de linhagem humana, o composto BR010032 apresentou um perfil *in vitro* mais seguro em comparação ao BR010034, que demonstrou maior toxicidade celular. Em conclusão, ambos os compostos BR010034 e BR010032 mostraram atividade anti-*Leishmania*, com o BR010032 se destacando por seu equilíbrio entre eficácia e segurança, tornando-se uma opção promissora para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*. Tripanotiona redutase. Triagem virtual. Atividade biológica. Atividade enzimática.

ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by protozoa of the genus *Leishmania* and is considered a neglected tropical disease due to its high incidence in regions with low socioeconomic development. The disease occurs in 98 countries and puts more than 350 million people at risk of infection worldwide. Tegumentary leishmaniasis, specifically, causes cutaneous and mucosal lesions that, if not properly treated, can lead to permanent deformities and severely impact individuals' quality of life. Pharmacological treatment remains a challenge for healthcare professionals due to its toxicity and the emergence of antiparasitic resistance. In this context, the trypanothione reductase (TR) enzyme emerges as a promising target for new therapies, as it plays an essential role in the parasite's antioxidant defense, making it vulnerable to specific inhibitors. The objective of this study was to evaluate the *in silico* and *in vitro* antiparasitic potential of compounds from a public library against the trypanothione reductase enzyme of *L. amazonensis*. The research involved virtual screening using the complete The Brazilian Compound Library (BraCoLi), which contains 1,176 compounds. In vitro tests were performed with compounds belonging to three chemical groups: L-glutamine, glucosamine, and papulacandin D derivatives. Among the results obtained, two chemical groups stood out for presenting promising results. In vitro promastigote assays, the papulocandin-D derivative BR010034 showed an IC50 of 82.78 µM, indicating anti-*Leishmania* activity. The L-glutamine derivative BR010032 demonstrated a reduction in LaTR enzymatic activity (63.9% inhibition). In silico pharmacokinetic profile analyses showed potential for good oral absorption of the latter. Regarding cytotoxicity against human cell lines, compound BR010032 showed a safer profile compared to BR010034, which demonstrated higher cellular toxicity. In conclusion, both compounds BR010034 and BR010032 showed anti-*Leishmania* activity, with BR010032 standing out for its balance between efficacy and safety, making it a promising option for the development of new therapeutic alternatives.

Keywords: *Leishmania amazonensis*. Trypanothione reductase. Virtual screening. Biological activity. Enzymatic activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIS	Cisteína (do inglês *cysteine*)
EDTA	Ácido tetracético etilenodiamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)
DTN	Doença Tropical Negligenciada
FAD	Dinucleotídeo de adenina flavina
GLS	Glutaminase
GLU	Glutamato (do inglês *glutamine*)
GR	Glutationa redutase
GS	Glutamina sintetase
HIS	Histidina (do inglês *histidine*)
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
kDa	Kilo Dalton
LaTR	Tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis*
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MTT	Sal de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NADPH	Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo Fosfato
nRotb	Número de reações rotativas (do inglês *number of rotatable bonds*)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (do inglês *phosphate buffered saline*)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)

SFB	Soro fetal bovino (do inglês *fetal bovine serum*)
SMF	Sistema Mononuclear Fagocitário
TYR	Tirosina (do inglês *tyrosine*)
TPSA	Área de superfície polar (do inglês *topological polar surface área*)
TR	Tripanotiona redutase (do inglês *tripanotione reductase*)

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom
G	gravidade
g/mL	Gramas por mililitro
g/mol	Gramas por mol
Kcal/mol	Quilocalorias por mol
logP	Coeficiente de partição octanol-água
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µg/mL	Micrograma por mililitro
M	Molar
mg/mL	Miligrama por mililitro
mM	Milimolar
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
U/mL	Unidades por mililitro
º C	Graus Celsius
%	Percentual

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Agentes quimioterápicos disponíveis para tratamento das leishmanioses 21
Quadro 2: Características da sequência usada na modelagem molecular da enzima TR de *L. amazonensis* 43
Quadro 3: Parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos utilizados no estudo 48
Quadro 4: Demais parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos utilizados no estudo 50
Quadro 5: Resultados da análise de atracamento molecular mostrando os compostos promissores (n = 8) 59
Quadro 6: Parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos dos compostos promissores (n = 8) pela plataforma Swiss ADME 63
Quadro 7: Parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos dos compostos promissores (n = 8) pela plataforma pkCSM Pharmacokinetics 64
Quadro 8: Predição da atividade biológica dos compostos promissores 66
Quadro 9: Resultado da avaliação da seletividade frente a proteína ortóloga glutationa redutase (GSR) de *Homo sapiens* 66
Quadro 10. Resultados de CI50 dos compostos promissores frente à promastigotas de *L. amazonensis* 67
Quadro 11. Resultados do teste de inibição enzimática da LaTR dos compostos da BraCoLi 71
Quadro 12. Resultados de CI50 dos compostos promissores frente a células de linhagem humana de fibroblastos 76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de LbTryR em modelo *cartoon* 27
Figura 2. Representação esquemática resumida do mecanismo de ação da proteína tripanotiona redutase 28
Figura 3. Representação esquemática das quatro diferentes condições da proteína TR de *Leishmania braziliensis* durante seu mecanismo de ação 29
Figura 4. Representação esquemática da participação do aminoácido glutamato no mecanismo catalítico da proteína tripanotiona redutase 29
Figura 5. Representação química da L-glutamina 31
Figura 6. Representação química da papulacandina D 33
Figura 7. Representação química da glicosamina 35
Figura 8. Representação esquemática dos modelos (A) “chave-fechadura” e (B) induzido 37
Figura 9. Estrutura química do fármaco clomipramina usado como controle positivo das análises *in silico* 47
Figura 10: Estrutura química dos ligantes BR010066 (A) e BR010067 (B) mostrando os maiores valores de comprimento em Å 58
Figura 11. Interações entre dois compostos promissores 61
Figura 12. Efeito do composto BR010034 na viabilidade de promastigotas de *Leishmania amazonensis*: curva de dose-resposta 68
Figura 13. Curva da cinética da atividade enzimática de LaTR frente aos compostos testados a 500 µM por tempo 69
Figura 14. Inibição da atividade enzimática da tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis* 70
Figura 15. Inibição da atividade enzimática da LaTR do composto BR010032 ao longo do tempo 72
Figura 15. Avaliação da inibição da enzima LaTR do composto BR010032 considerando diferentes concentrações 72
Figura 17. Avaliação da citotoxicidade de diferentes concentrações dos compostos promissores frente a células de linhagem humana de fibroblastos 73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....16

2 DESENVOLVIMENTO…….....17

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO 17

2.1.1 O parasito **.....17**

2.1.2 A doença.....18

2.1.3. Tratamento farmacológico 20

2.1.4. Enzima tripanotiona redutase de parasitos do gênero *Leishmania*……...….26

2.1.5 Grupos químicos da biblioteca pública ……..31

2.1.5.1 Compostos derivados da L-glutamina e análogos 31

2.1.5.2 Compostos derivados da papulacandina D e análogos 33

2.1.5.3 Compostos derivados da glicosamina 34

2.1.6 Planejamento de fármacos…….....……..35

2.1.7 Testes de atividade biológica *in vitro* contra *Leishmania* spp. 38

2.2 OBJETIVOS.....41

2.1.2 Objetivos gerais.....41

2.2.2 Objetivos específicos 41

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS 42

2.3.1 Compostos de uma biblioteca pública……..……...42

2.3.2 Avaliação das interações *in silico* entre os compostos e a biomacromolécula alvo tripanotiona redutase de *L. amazonenses.....42*

2.3.2.1 Preparo dos ligantes…….....42

2.3.2.2 Modelagem molecular da proteína tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis*……..…….……*43*

2.3.2.3 Atracamento molecular…….…….45

2.3.2.4 Determinação do perfil farmacocinético *in silico* e potencial atividade biológica dos compostos promissores……47
2.3.2.5 Avaliação da seletividade *in silico* dos compostos promissores frente a proteínas de *Homo sapiens*……..…….....53
2.3.2.6 Avaliação da atividade inibitória *in vitro* dos compostos promissores contra formas promastigotas de *L. amazonensis*……..…….....54
2.3.2.6.1 Cultivo e manutenção de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* *54*
2.3.1.6.2 Avaliação da atividade inibitória em promastigotas de *L. amazonensis*…….....54
2.3.2.7 Determinação a atividade inibitória *in vitro* dos compostos promissores contra a enzima tripanotiona redutase de *L. amazonensis*……..…..…..54
2.3.2.8 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos compostos promissores frente a células de linhagem humana……..……..56
2.3.2.8.1 Cultivo Celular 56
2.3.2.8.2 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos compostos frente a fibroblastos humanos 56
2.4 **RESULTADOS……....58**
2.4.1 Avaliação das interações *in silico* entre compostos provenientes de uma biblioteca pública e a biomacromolécula alvo tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis* 58
2.4.2 Determinação do perfil farmacocinético *in silico* e potencial atividade biológica dos compostos promissores 62
2.4.3 Avaliação da seletividade *in silico* dos compostos frente a proteínas de *Homo sapiens*.....66
2.4.4 Avaliação da atividade inibitória *in vitro* dos compostos promissores contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.....67
2.4.5 Determinação a atividade inibitória *in vitro* dos compostos promissores contra a enzima tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis* 68
2.4.6 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos compostos promissores frente a linhagem de células humanas.....73
2.5 DISCUSSÃO……....77

3 CONCLUSÃO 86
4 PERSPECTIVAS FUTURAS……..…...87
5 REFERÊNCIAS…….....88
APÊNDICE A.....99
APÊNDICE B 103
APÊNDICE C 107
APÊNDICE D 111
APÊNDICE E 115
APÊNDICE F 116

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou as leishmanioses como um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Elas ocorrem em 98 países e afetam mais de 350 milhões de pessoas (OMS, 2017). Este protozoário é um parasito intracelular obrigatório cujo habitat são células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) (incluindo macrófagos). Essas células respondem à infecção produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) para controlar a infecção parasitária. Entretanto, o parasito apresenta mecanismos de defesa contra esse efeito microbicida antioxidante dos macrófagos, no qual a enzima tripanotiona redutase possui papel fundamental. Assim, essa biomacromolécula tem sido bastante estudada e descrita como possível alvo para o desenvolvimento de novos fármacos contra o parasito. Além de possuir uma alta disponibilidade de informações em banco de dados, essa proteína é essencial para manutenção do ciclo de vida parasitário pois atua no ciclo oxidativo do parasito. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in silico* e *in vitro* a atividade antiparasitária de compostos derivados sintéticos de uma biblioteca pública contra a enzima tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis.*

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.1 O parasito

As espécies de *Leishmania* são protozoários que causam a doença leishmaniose e são divididas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (GONTIJO, et al, 2003). De acordo com a apresentação clínica da doença, ela pode ser subdividida em Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), onde se encontram as formas mucosa, cutânea e mucocutânea da doença (dermotrópicas), e a Leishmaniose Visceral (LV), também chamada de não dermotrópica (de FREITAS, et al, 2020). A espécie *L. amazonensis* é a principal causadora da LTA no Brasil (SILVA, et al, 2021), enquanto cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral no Brasil e em países em desenvolvimento é causada pela *L. infantum* (VARJÃO, et al, 2021).

Considerando sua classificação taxonômica, a *Leishmania* pertence aos protozoários, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Kinetoplastida, família Trypanomasotidae, gênero *Leishmania* e subgênero *Leishmania* (SERAFIM, et al, 2020). Para entender a epidemiologia da leishmaniose, a genotipagem e identificação se faz necessária para determinar e diferenciar as espécies doe *Leishmania*. Essa variedade interespécies pode causar características singulares que tem como consequência variações na virulência, diferentes respostas aos tratamentos e distribuição geográfica (CHAGAS, et al, 2021).

A identificação das espécies de *Leishmania* é realizada por meio de técnicas de biologia molecular, como a amplificação do DNA parasitário por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) de áreas específicas no genoma do parasito, possibilitando a genotipagem. Essas técnicas analisam marcadores genéticos ou sequências únicas de DNA para diferenciar e identificar as distintas espécies do gênero. Essas técnicas podem envolver a análise de genes específicos, como o gene da RNA Polimerase, regiões do cromossomo mini-exon ou outros marcadores genéticos únicos para cada espécie. O sequenciamento de DNA também é comumente utilizado para identificar diferenças genéticas entre as espécies (ESCOBAR, et al, 2019). É interessante se identificar a espécie de *Leishmania* para realizar um tratamento mais seguro, controle e prevenção (SIMÃO, et al, 2018).

As leishmanioses são consideradas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) pela OMS, sendo endêmica em cerca de 98 países do mundo. Entretanto, em apenas

32 essas doenças são de notificação obrigatória (WHO, 2019). Felizmente, no Brasil as leishmanioses fazem parte da “Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública” (BRASIL. Ministério da Saúde, 2022). Dados recentes estimam que 1,2 milhão de novos casos de LV e LTA ocorrem anualmente no mundo (ESPADA, et al, 2018).

O ciclo biológico do parasito é heteroxênico, o que significa que ele passa por múltiplas fases e requer diferentes hospedeiros para completar seu ciclo de vida. O ciclo de vida envolve dois tipos de hospedeiros: um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um hospedeiro invertebrado (um vetor, geralmente um mosquito flebótomo dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*) (OLIVEIRA, et al, 2019). Ao realizar a hematofagia em um hospedeiro vertebrado infectado, o inseto vetor ingere o sangue contendo as formas amastigotas de *Leishmania* spp. Depois de 4 a 5 dias no intestino do inseto, ocorre a alteração da forma amastigota para a promastigota. Esses parasitos se reproduzem nas glândulas salivares desse inseto. Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas dos flebotomíneos infectadas inoculam as formas promastigotas metacíclicas (forma infectante) em um próximo hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas interagem com as células do SMF da pele e mucosas do hospedeiro vertebrado. Por fim, a forma promastigota diferencia-se em amastigota no interior dessas células, na qual é capaz de se multiplicar. Após sucessivas multiplicações, a célula hospedeira se rompe, liberando os amastigotas que irão infectar novas células. Ao realizar o repasto sanguíneo, o vetor ingere juntamente com o sangue os macrófagos contendo a forma amastigota do parasito, reiniciando o ciclo de vida (de FREITAS, et al, 2020). O ciclo heteroxênico desses parasitos, desempenha um papel crucial na manutenção e disseminação do mesmo. A compreensão desse ciclo é essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção das leishmanioses (OLIVEIRA, et al, 2019).

2.1.2 A doença

A manifestação clínica da LTA, percebe-se no local do contágio entre o vetor e o hospedeiro a formação de uma pápula que tipicamente evolui para placa ou nódulo com tendência a ulcerar (ABADIAS-GRANADO, et al, 2021). As lesões podem ser solitárias ou múltiplas e se espalhar pelos vasos linfáticos, causando adenopatias e lesões satélites (CARVALHO, et al, 2017).

Inicialmente percebe-se um pequeno eritema no local da picada do vetor flebotomíneo na pele do indivíduo. Depois, desenvolve-se uma pápula dérmica. A pápula é uma elevação sólida e geralmente pequena na pele, que pode ser sentida como um nódulo ou protuberância. Com a progressão da infecção, essa pápula pode evoluir para formas mais avançadas de lesões, como nódulos, placas ou ulcerações na pele, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro e da espécie específica de *Leishmania* envolvida (MARKUS, et al, 2020).

Na LV, também conhecida como calazar, (GALVIS-OVALLO, et al, 2020) podem ser verificados os sintomas: febre, anorexia, perda de peso, distensão abdominal, fraqueza e aumento significativo do abdômen devido à hepatoesplenomegalia. Quando a doença se manifesta clinicamente, ocorrem eventos imunopatogênicos nos órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, como baço, fígado, medula óssea e linfonodos. Isso resulta em desvio na produção de diferentes tipos de células na medula óssea, levando à anemia, leucopenia e plaquetopenia, juntamente com hiperplasia e hipertrofia das células do sistema fagocítico em baço, fígado e linfonodos (LINDOSO, et al, 2018). A gravidade dos sintomas pode variar de acordo com a espécie e a resposta imunológica do hospedeiro, indivíduos com um sistema imunológico mais robusto podem controlar a infecção de forma mais eficaz, resultando em sintomas menos severos, enquanto aqueles com imunidade comprometida podem apresentar formas mais graves da doença, com lesões mais extensas e sistêmicas, fatores como a saúde geral do paciente, condições pré-existentes, idade e até mesmo a carga parasitária inicial podem influenciar a gravidade dos sintomas (BELLOTI, et al, 2019). A espécie *L. amazonensis* normalmente causa lesões ulceradas simples e limitadas com muitos parasitos nas bordas (Neves, et al, 2016). Devido às lesões e deformidades causadas pela manifestação cutânea, a LTA pode assumir formas que podem causar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com impacto significativo no campo psicossocial do indivíduo (de Sousa, et al, 2019). Assim como a LV, além de ter impacto significativo na saúde física dos pacientes, também pode ter consequências psicossociais importantes. A doença pode causar estigma e discriminação devido ao seu potencial de transmissão entre humanos e animais, bem como devido aos sintomas visíveis, como hepatomegalia e esplenomegalia, que podem afetar a aparência física do paciente. Isso pode levar a sentimentos de isolamento, baixa autoestima e dificuldades de interação social (SILVA, et al, 2013).

O diagnóstico da LTA envolve uma combinação de métodos clínicos, laboratoriais e, em alguns casos, histopatológicos. O diagnóstico clínico epidemiológico é presuntivo, as circunstâncias como lesões típicas e residência em áreas endêmicas se faz presente, ideal ser associado a métodos laboratoriais. O diagnóstico laboratorial é confirmado através da identificação direta do parasito, utilizando técnicas como pesquisa direta por observação microscópica do parasita em esfregaços ou cortes histológicos da lesão. Além disso, são empregados exame histopatológico e a PCR para essa confirmação. Exames imunológicos, como a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) e a imunofluorescência indireta, são métodos complementares que auxiliam no diagnóstico ao fornecer informações indiretas. A escolha do método de diagnóstico pode depender da disponibilidade de recursos laboratoriais, da fase da doença, da localização e do tipo de lesão cutânea. E a combinação de várias técnicas pode aumentar a precisão do diagnóstico (VASCONCELOS, et al, 2018).

Já o diagnóstico da LV é extremamente importante para que o tratamento do paciente possa ser iniciado prontamente, evitando assim os casos de óbitos. Tradicionalmente, é feito com a demonstração direta ou através do cultivo do parasito originário de células infectadas obtidas da punção da medula óssea do paciente suspeito. Outras formas de diagnóstico, bem menos invasivas, são os testes imunológicos que se baseiam na resposta das células do sistema imune do paciente e na produção de anticorpos anti-*Leishmania*, como exemplos, o teste cutâneo de Montenegro e os testes sorológicos (DE FARIAS, et al, 2020).

2.1.3 Tratamento farmacológico

Atualmente, os tratamentos farmacológicos disponíveis para a resolução das leishmanioses ainda são um grande empecilho no controle da doença e melhoria da qualidade de vida do indivíduo infectado. Algumas limitações podem ser listadas: i) efeitos adversos, ii) resistência medicamentosa, iii) baixa eficácia, iv) alto custo e v) necessidade de múltiplas doses endovenosas, dificultando a aderência do paciente ao tratamento (PRADHAN, et a, 2022). No Quadro 1 são apresentados os agentes quimioterápicos disponíveis para tratamento das leishmanioses.

Quadro 1: Agentes quimioterápicos disponíveis para tratamento das leishmanioses.

Fármaco	Via de administração	Nome comercial	Efeitos adversos mais comuns	Mecanismo de ação	Sobre o fármaco
Antimonial pentavalente	Intralesional, intramuscular, intravenosa	Glucantime ®	Cardiotoxicidade, pancreatite; nefrotoxicidade; hepatotoxicidade	É convertido ao estado trivalente dentro do parasita, inibindo enzimas essenciais, como a glicose-6-fosfato desidrogenase, o que resulta em disfunção metabólica e morte do parasita.	Apesar do baixo custo e disponibilidade, é um tratamento doloroso e prolongado
Anfotericina B	Intravenosa	Anfotericin ® Fungizon ® Abelcet ®	Toxicidade renal; reações relacionadas à injeção; hipocalemia	A anfotericina B se liga ao ergosterol, que é um componente da membrana celular dos fungos e de parasitas como *Leishmania*. Essa interação forma	Administração em ambiente hospitalar

				poros na membrana, permitindo a fuga de íons e moléculas essenciais para o parasita.	
Anfotericina B lipossomal	Intravenosa	Ambisome ®	Calafrios durante a administração	A ação é semelhante à da anfotericina B convencional, mas a formulação lipossomal permite uma liberação mais direcionada e menor toxicidade.	Apesar da alta eficácia e baixa toxicidade, é necessário administração intravenosa lentamente
Miltefosina	Oral	Milteforan ®	efeitos adversos gastrointestinais, toxicidade renal e hepática e teratogênese	A miltefosina age inibindo a biossíntese de fosfatidilcolina, um componente essencial da membrana celular do parasito. Ela também afeta o metabolismo energético,	Eficaz porém com alto custo

				interferindo com a função mitocondrial e a síntese de lipídios, o que resulta em disfunção celular e morte do parasita.	
Paromomicina	Intramuscular ou tópica	Humatin ®	Toxicidade renal e hepática	A paromomicina age ligando-se à subunidade 30S do ribossomo do parasita, impedindo a leitura adequada do RNA mensageiro e, assim, inibindo a síntese de proteínas essenciais para a sobrevivência do parasita.	Baixo custo, potencial de resistência e eficácia variada de acordo com a área
Pentamidina	Intramuscular	Pentacarinat ®	Hiperglicemia; hipotensão e taquicardia	A pentamidina interfere na biossíntese de DNA e RNA do parasita,	Eficácia variada de acordo com a espécie de leishmania

				inibindo a produção de nucleotídeos essenciais para a replicação celular. Ela também pode afetar a função mitocondrial e o transporte de íons nas células do parasita, resultando em morte celular.	
Clomipramina	Oral	Clo ®	Sonolência, cansaço, tontura, intranquilidade, aumento do apetite, boca seca, constipação, visão borrada, tremores, dores de cabeça, náusea, transpiração, ganho de peso, dificuldades sexuais	A clomipramina atua principalmente por meio da despolarização mitocondrial e inibição da enzima tripanotiona redutase (TR), induzindo estresse oxidativo intenso nos protozoários. Esse	Apesar de sua ação antidepressiva, já demonstrou ter valor limitado como medicamento tripanocida

				processo desencadeia respostas adaptativas, como autofagia e exocitose, que, ao falharem, culminam em morte celular programada semelhante à apoptose.	

Fonte: Adaptado de PRADHAN et al., 2022, Rath, et al 2003; Santiago, et al, 2021; Rodrigues, et al, 2017

A procura por novos tratamentos implica o uso de medicamentos eficazes para condições com uma biologia patógeno-hospedeiro similar, com alvos moleculares presentes no parasito, mas ausentes no hospedeiro. Um exemplo é a tripanotiona redutase em parasitos do gênero *Leishmania*, onde a clomipramina (Clo) atua como um inibidor desta enzima, sendo conhecida por sua ação antidepressiva (BARRINUEVO, et al). Assim, o desenvolvimento de novos compostos pode focar em maior seletividade, reduzindo os efeitos colaterais sistêmicos e aumentando a eficácia no combate ao parasito.

2.1.4 Enzima tripanotiona redutase de parasitos do gênero *Leishmania*

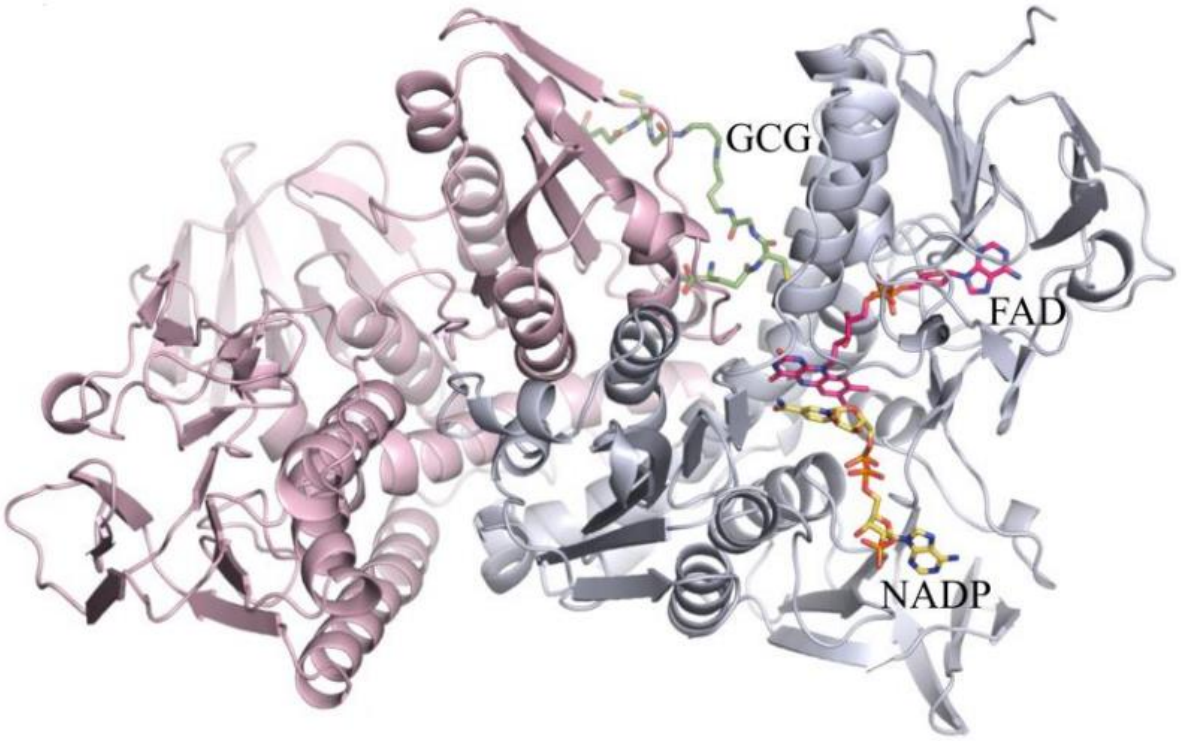
Alguns membros da família Trypanosomatidae possuem interesse médico e econômico pois são os principais causadores de DTN, como a doença de Chagas e a leishmaniose (FURINI, et al, 2016). Essa família é composta por protozoários uniflagelados intracelulares que vivem no interior de macrófagos e produzem ROS, no qual tem capacidade de atuar no controle da proliferação parasitária. Entretanto, ao longo da evolução, esses parasitos desenvolveram mecanismos de fuga contra o efeito microbicida dos macrófagos, incluindo defesas antioxidantes (Andrea Illari, et al., 2012).

A proteína tripanotiona redutase (TR, do inglês *trypanothione reductase)* é conhecida por atuar nas defesas antioxidantes de membros da família Trypanosomatidae, na qual catalisa a redução do dissulfeto de tripanotiona, desencadeando eventos responsáveis pela neutralização das ROS (da Silva, et al., 2019). É uma proteína homodimérica, o que significa que as duas subunidades (cadeias) idênticas da proteína interagem entre si em regiões específicas. Cada monômero conta em seu sítio ativo com três domínios de ligação estrutural, sendo eles: fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) (na qual é dependente), dinucleotídeo de adenina flavina (FAD) e tripanotiona (Inacio, et al, 2018).

A TR, quando em estado reduzido, “sequestra” as ROS geradas no interior da célula do hospedeiro e mantém esse estado de redução para o sucesso da infecção. A reação mais importante realizada pela TR é a redução da tripanotiona oxidada após a ligação de NADPH (Figura 1). Dessa forma ocorre a transferência dos elétrons para FAD e a redução dos resíduos da ponte dissulfeto formado entre os aminoácidos Cisteína (CIS) nas posições 52 (CIS52) e 57 (CIS57) da proteína. A redução desses

resíduos ocorre pela transferência de carga transitória entre a flavina e o tiolato CIS57. Em seguida, CIS52 que está desprotonada pelo par Histidina (HIS) na posição 461 (HIS461) ataca nucleofilicamente a ponte dissulfeto na tripanotiona oxidada, formando com ela um dissulfeto misto, que é resolvido pelo ataque de CIS57 à CIS52. Por fim, a ponte dissulfeto CIS57-CIS52 é novamente formada e a tripanotiona reduzida é liberada. Um outro resíduo essencial neste mecanismo é o Glutamato na posição 466 (GLU466), no qual foi demonstrado ser essencial na orientação da HIS catalítica (Kraught-siegel, et al, 2007).

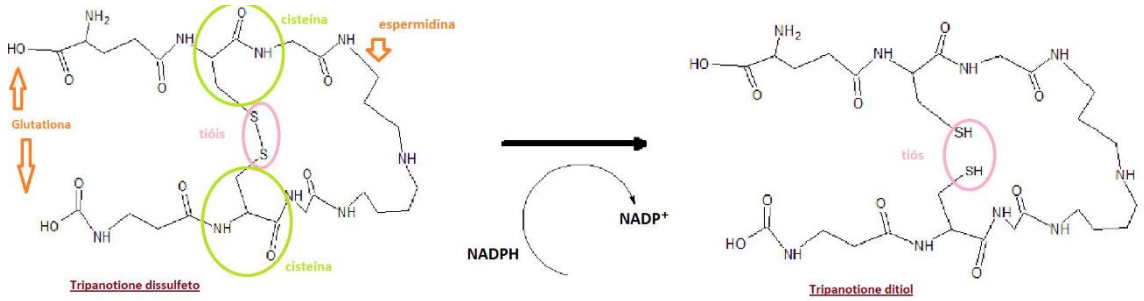
Figura 1. Representação de LbTryR em modelo *cartoon*.



O monómero A é apresentado em azul claro e o monómero B em rosa claro. Os ligantes e heteroátomos são apresentados em formato de bastões: tripanotiona (GCG - verde), NADP (amarelo) e FAD (magenta). Fonte: Adaptado de Da Silva, et al, 2019.

Um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa demonstrou que a proteína TR de *L. braziliensis* pode apresentar diferentes condições na natureza durante seu mecanismo de ação (da Silva, et al, 2019). São elas (Figura 2): condição fechada (condição zero), condição aberta (condição 1), condição 2/3 e condição 5. Cada condição representa um passo durante o mecanismo de ação da proteína TR.

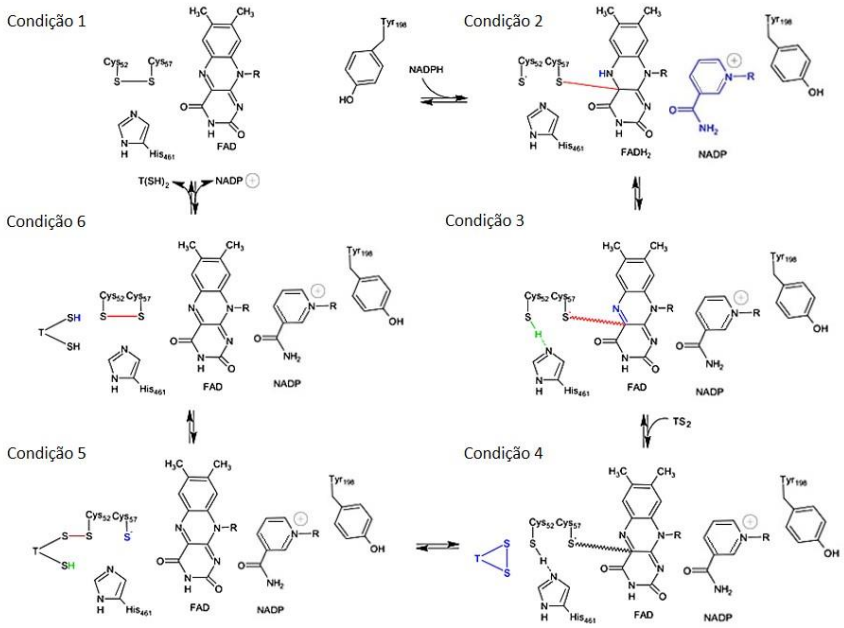
Figura 2. Representação esquemática resumida do mecanismo de ação da proteína tripanotiona redutase.



Fonte: Krauth-Siegel, et al, 2003.

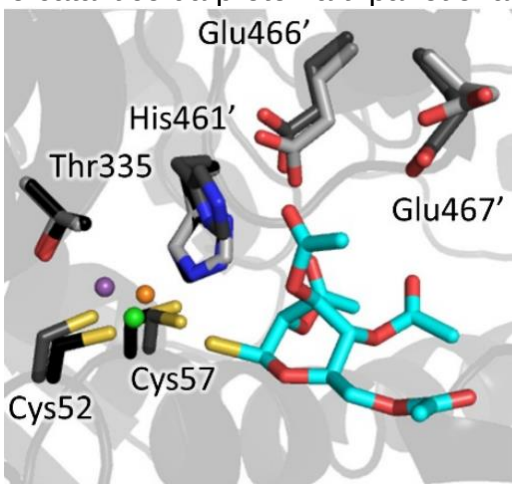
Na condição zero (representada por condição 1 e condição 6 na Figura 3) é possível observar a “condição fechada” da proteína. Nessa condição, o sítio catalítico está fechado e não há reações químicas. Já na condição 1 (“condição aberta”, representada por condição 2 na Figura 3), há adição do NADPH no sítio e o aminoácido Tirosina na posição 198 (TYR198) vira (do inglês *flip*). Em seguida, o NADP transfere elétrons para o FAD (que reduz em FADH2) para que consiga se ligar à CIS57. Essa ligação ocorre após a quebra da ligação dissulfeto entre duas cisteínas, CIS52 e CIS57. Na condição 2/3 (representada por condição 3 e condição 4 na Figura 3) ocorre a transferência de H+ do FADH2 para que ocorra a ligação de hidrogênio temporária entre a CIS52 com a HIS461. Enquanto isso o GLU466 está nas proximidades durante o mecanismo catalítico formado pelas Cisteínas e HIS461 (Figura 4) desempenhando um papel fundamental na regulação da transferência de elétrons e na formação das ligações dissulfeto, essenciais para a atividade da enzima. Na condição 5 (representada por condição 5 na Figura 3) há uma nova ligação de um grupamento dissulfeto com a CIS52.

Figura 3. Representação esquemática das quatro diferentes condições da proteína TR de *Leishmania braziliensis* durante seu mecanismo de ação.



Fonte: Adaptado de da Silva et al., 2019.

Figura 4. Representação esquemática da participação do aminoácido glutamato no mecanismo catalítico da proteína tripanotiona redutase.



Durante a reação, Glu466 posiciona-se próximo ao sítio catalítico, auxiliando na estabilização das interações entre as cisteínas (C52 e C57) e His461 Fonte: Battista, et al, 2020.

Segundo Hefnawy e colaboradores (2016), a TR é descrita como um dos principais mecanismos de resistência aos antiparasitários disponíveis em espécies de *Leishmania* (Monte-Neto et al., 2011; Mittal et al., 2007, Fonseca et al, 2021). Dessa forma, o desenvolvimento de novos compostos com potencial atividade biológica contra essa proteína pode atuar de modo a inibir o mecanismo de escape do parasito (Hefnawy, et al., 2016, Pinheiro, et al, 2024). Assim como o sistema da glutationa redutase (GR) presente em mamíferos, inclusive em humanos, o sistema da tripanotiona é considerado como uma linha de defesa do parasito contra possíveis danos causados por agentes oxidantes, xenobióticos e metais pesados tóxicos (COSTA, et al, 2021).

Além de desempenhar uma função crucial para o parasito, outra característica que torna a TR um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos antiparasitários é sua notável disparidade estrutural em relação à GR, uma enzima com função análoga nos seres humanos. As principais discrepâncias entre a TR e a GR estão relacionadas ao tamanho, carga e distribuição dos bolsões hidrofílicos/hidrofóbicos. O sítio catalítico da TR apresenta um tamanho destacado e é envolto por resíduos hidrofóbicos e com carga eletronegativa. Em contraste, os resíduos no local da GR humana exibem carga positiva. Essa disparidade pode ser a principal causa da especificidade na exploração de novos compostos para o tratamento das leishmanioses. Essas variações tornam o sítio ativo da TR mais propício para acomodar substratos com grupos mais volumosos (ILARI et al., 2017).

Além disso, a TR possui resíduos com carga negativa e regiões hidrofóbicas em seu sítio ativo, que podem interagir com seu substrato por meio de interações eletrostáticas e de van der Waals, respectivamente. Por outro lado, a GR possui resíduos de Arginina carregados positivamente, que se ligam ao substrato por meio de interações eletrostáticas. Essas disparidades estruturais podem ser exploradas no desenvolvimento de inibidores seletivos para a TR (OLIVEIRA, et al, 2008).

Além disso, é crucial destacar que, dentre os medicamentos pertencentes à classe dos compostos tricíclicos (neurolépticos), a clomipramina, embora considerada o arquétipo, já demonstrou eficácia limitada como agente tripanocida, tendo como principal alvo a TR. Apesar de seu papel bem estabelecido como antidepressivo tricíclico, sua atuação no combate a infecções causadas por tripanossomatídeos permanece restrita, evidenciando suas limitações como um medicamento tripanocida efetivo (RICHARDSON et al., 2012).

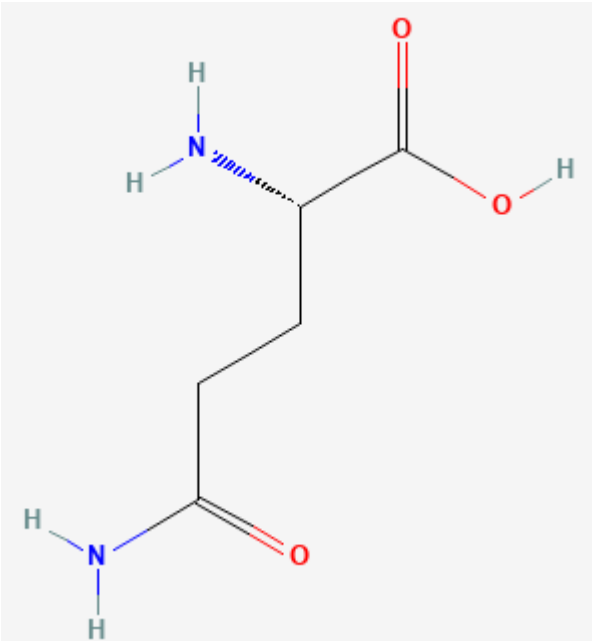
Dessa forma, a TR é uma proteína promissora para estudos nas Ciências Farmacêuticas, com o objetivo de procurar compostos voltados na sua inibição, uma vez que ela é essencial para manutenção da sobrevivência parasitária no hospedeiro. Somado a isso, a TR apresenta a vantagem de estar presente apenas em tripanossomatídeos e não ser encontrada no hospedeiro humano.

2.1.5 Grupos químicos da biblioteca pública

2.1.5.1 Compostos derivados da L-glutamina e análogos

Segundo estudo de Da Luz e colaboradores (2021) a glutamina é considerada um aminoácido não essencial, mas pode se tornar "condicionalmente essencial" em condições inflamatórias, durante infecções e condições de lesão (Da Luz, et al, 2021). Além disso, a molécula tem sido reportada como um componente essencial do metabolismo celular. Sob condições apropriadas, ela pode funcionar como um combustível para a respiração e pode melhorar a função de células imunológicas (BRIANEZ, et al, 2014). Um exemplo clássico na natureza, a glutamina é usada pelos macrófagos para realizar suas funções fagocíticas e citotóxicas. A proliferação de linfócitos e a atividade fagocítica de neutrófilos são outras funções desse aminoácido (Gois, et al, 2006). A Figura 5 mostra a estrutura química da L-glutamina.

Figura 5. Representação química da L-glutamina.



Fonte: PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/).

Com peso molecular de 146,15 kDa (kilodalton), a glutamina é classificada como neutra em pH fisiológico. A molécula desempenha papéis fundamentais como transporte de nitrogênio e é incorporada em proteínas. No corpo humano, sua concentração varia entre o plasma e os tecidos, sendo considerado o aminoácido mais abundante (Tan, et al, 2017). A regulação da glutamina envolve equilíbrio entre síntese e consumo por órgãos e tecidos, sendo afetada por fatores como glicocorticoides, hormônios tireoideanos, e insulina. As enzimas glutamina sintetase (GS) e glutaminase (GLS) desempenham papéis cruciais em seu metabolismo intracelular. Estudos indicam que a glutamina é vital para células do sistema imunológico, mas sua redução em condições catabólicas não afeta significativamente sua função. Além disso, em infecções bacterianas pode haver modulação do metabolismo de glutamina pelos microrganismos como mecanismo de sobrevivência (Cruzat, et al, 2018).

A estrutura assume uma importância maior no intestino em comparação com a glicose como substrato energético. No intestino, ela é metabolizada de várias maneiras, incluindo a formação de prolina, ornitina e citrulina, além de sua participação no ciclo de Krebs para a produção de energia (HOLECEK, et al., 2018). Por outro lado, os músculos destacam-se como o principal local para o armazenamento e liberação de glutamina, desempenhando um papel essencial em seu metabolismo. O transporte de glutamina é influenciado por regulação hormonal, envolvendo insulina e fatores de crescimento. Em cenários catabólicos, a redução da concentração de glutamina nos músculos correlaciona-se a uma diminuição na sobrevivência de pacientes sépticos. Além disso, a glutamina desempenha um papel na modulação da expressão gênica, especialmente relacionada ao conteúdo muscular, e exibe efeitos antioxidantes e citoprotetores, sendo crucial em condições de catabolismo intenso (Cruzat, et al, 2018).

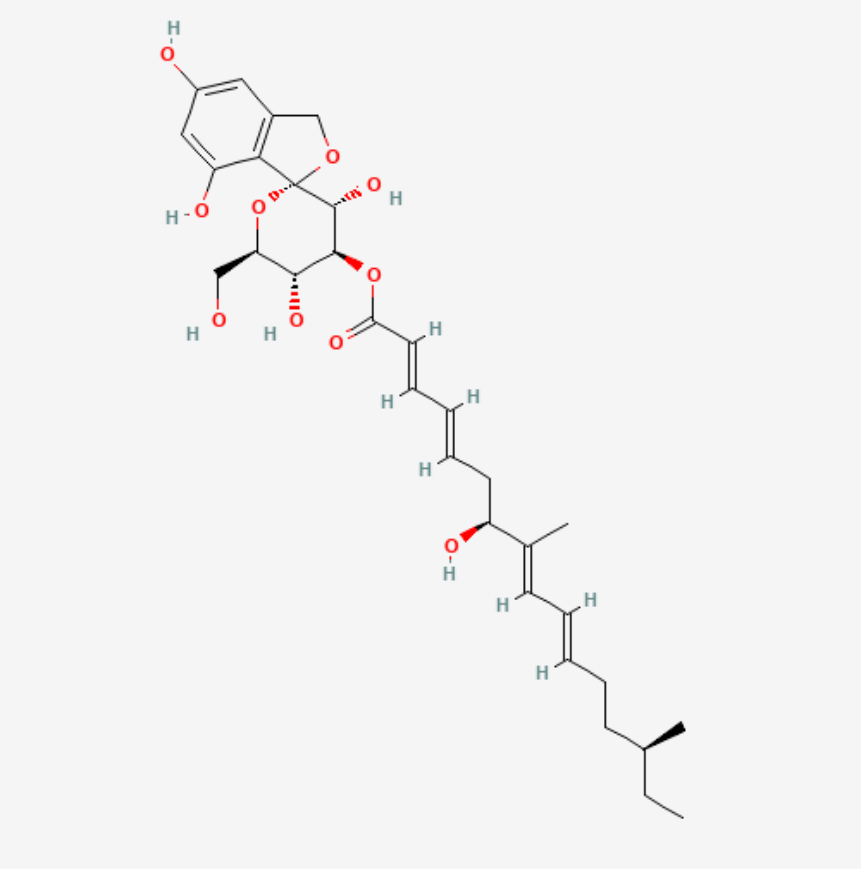
Um estudo realizado por Bretas (2013), realizou o planejamento, a síntese e a avaliação da atividade biológica de uma série de novos análogos da L-glutamina. Nesse contexto, foram conduzidos testes de atividade antifúngica em compostos relacionados a essa molécula. Esses compostos foram submetidos a avaliações abrangentes contra diversos patógenos fúngicos, incluindo *Criptococcus neoformans, Criptococcus gattii, Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei, Candida parapsilosis* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Entretanto, os resultados revelaram a ausência de atividade contra esses microganismos, uma vez que nenhum dos

compostos apresentou inibição do crescimento até a concentração de 500 µM (Bretas, 2013).

2.1.5.2 Compostos derivados da papulacandina D e análogos

A 1,3-β-D-glicana sintase é uma enzima que catalisa a síntese de glicanas 1,3-β-D, sendo considerada um alvo promissor para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Entre os inibidores naturais dessa enzima, destacam-se as papulacandinas, substâncias isoladas do fungo *Papularia spherosperma* em 1977, que incluem quatro variantes principais: A, B, C e D. Cada uma dessas variantes apresenta diferenças estruturais, com as papulacandinas A, B e C contendo espiroglicosídeos esterificados com ácidos graxos insaturados e centros quirais, enquanto a papulacandina D, mais simples, é um espiroglicosídeo monossacarídico derivado da D-glicose e esterificado em C-3 (BRETAS, et al, 2013). A Figura 6 mostra a estrutura química da papulacandina D.

Figura 6. Representação química da papulacandina D.



Fonte: PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/).

Apesar de sua simplicidade quando comparada às outras papulacandinas, a papulacandina D é de grande interesse para a síntese de análogos devido à sua estrutura menos complexa, facilitando a obtenção de quantidades suficientes para estudos da atividade biológica e toxicidade. Estudos sugerem que modificações estruturais, como a ausência do anel espirocíclico ou variações nas cadeias graxas, podem influenciar na atividade inibitória, sem necessariamente eliminá-la, como observado em compostos como a catecandina VIII. Entretanto, modificações mais drásticas, como a substituição da cadeia graxa por um éster cinamoil, reduzem significativamente a atividade biológica (DIAZ, et al, 2023).

Um estudo interessante de Souza (2010) sintetizou e avaliou análogos da papulacandina D para atividades antifúngicas contra cepas de *Candida* spp. Dentre os compostos testados, alguns, como os intermediários de síntese XVIII e XIX, demonstraram atividade inibitória na concentração de 200 µg/mL, indicando potencial para o desenvolvimento de novos antifúngicos baseados nesse modelo. Esses resultados reforçam o potencial da papulacandina D como um protótipo para o planejamento de novos inibidores da 1,3-β-D-glicana sintase, visando tratamentos mais potentes e seletivos para infecções fúngicas (SOUZA, et al, 2010).

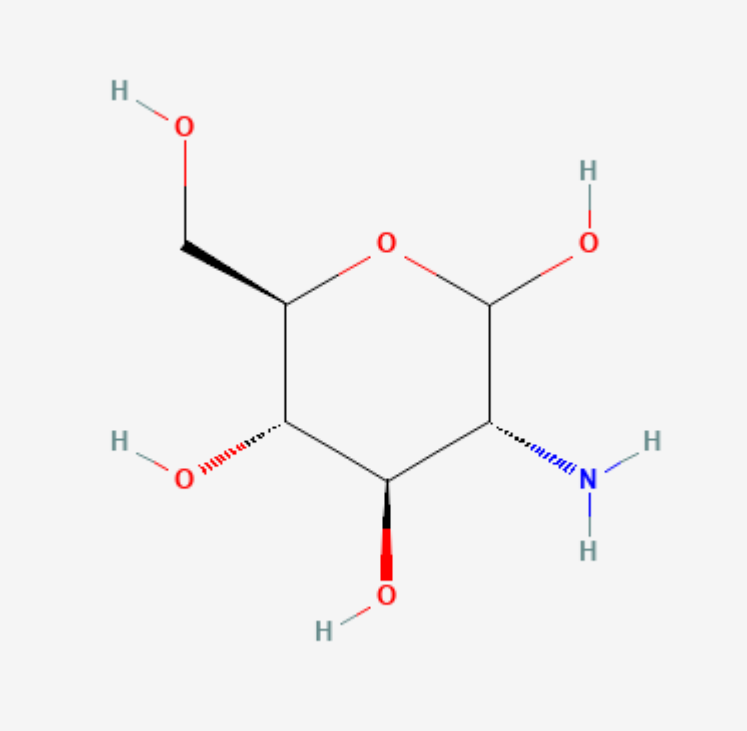
2.1.5.3 Compostos derivados da glicosamina

A glicosamina é um aminoaçúcar natural que faz parte da estrutura dos glicosaminoglicanos, componentes importantes da matriz extracelular da cartilagem articular. Ela desempenha um papel crucial na manutenção e reparo da cartilagem, ajudando na síntese de proteoglicanos, que são essenciais para a saúde articular. Além disso, a glicosamina atua como um agente anti-inflamatório e anti-catabólico, sendo útil no tratamento de doenças como a osteoartrite. Estudos sugerem que ela pode ajudar a prevenir a degradação da cartilagem e estimular a síntese de colágeno tipo II, um componente chave da matriz da cartilagem articular (MARINE, et al, 2024).

No estudo de Bretas (2013), os derivados da glicosamina são discutidos no contexto dos aminoglicosídeos, uma classe de antibióticos bactericidas com eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Entre esses compostos, destaca-se a neamina, considerada um bloco estrutural essencial para a ligação dos aminoglicosídeos ao RNA ribossomal bacteriano, onde exercem sua ação antimicrobiana. A partir da neamina, foram sintetizados novos derivados com potencial

antimicrobiano, projetados para aumentar a eficácia terapêutica e minimizar a resistência bacteriana (BRETAS, et al, 2013). A Figura 7 mostra a estrutura química da glicosamina.

Figura 7. Representação química da glicosamina.



Fonte: PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/).

2.1.6 Planejamento de fármacos

O desenho racional de fármacos é uma abordagem metodológica para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de doenças. Esse processo integra princípios científicos e técnicas avançadas para identificar, conceber e sintetizar compostos químicos com potencial terapêutico (MIKOVSKI, et al, 2018). Nesse cenário, diante da urgência da indústria farmacêutica pela descoberta de compostos rentáveis, este planejamento se tornou uma ferramenta importante para a pesquisa farmacológica, gerando uma diversidade de moléculas orgânicas estruturalmente análogas, contendo diferentes grupos farmacofóricos e/ou condições, que eram sintetizadas de maneira simultânea, acelerando de forma exponencial a construção de coleções de novas substâncias (RAMOS, et al, 2021). Desta forma, essa técnica inclui compreender a biologia subjacente de uma doença e identificar moléculas ou processos específicos que podem ser direcionados para tratá-la. Assim,

a tecnologia desempenha um papel fundamental no planejamento de fármacos, permitindo a otimização do tempo e a redução de custos operacionais (de MEDEIROS, et al, 2020).

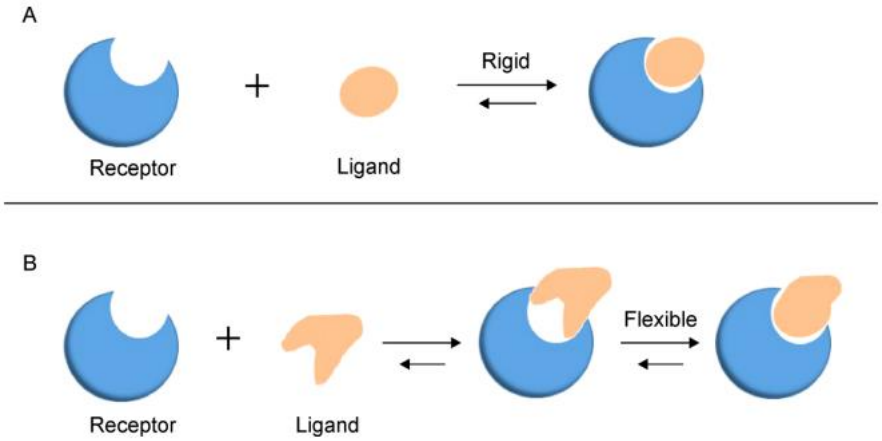
Nessa abordagem de desenho racional, a química farmacêutica e sintética conta com diversas ferramentas e métodos que aceleram e aprimoram o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Um exemplo são as avaliações *in silico*, que empregam *softwares* especializados, que utilizam algoritmos baseados em modelos matemáticos e estatísticos comprovadamente eficazes. Essas técnicas têm por objetivo prever, em um curto período, as possíveis características biológicas e farmacológicas de uma molécula (TOROPOVA, et al, 2017). Neste sentido, a bioinformática tem um papel fundamental na descoberta de medicamentos, sobretudo no campo do *drug discovery* ou descoberta de fármacos. Pode-se utilizar a identificação de alvos terapêuticos, como dados genômicos, proteômicos e das rotas metabólicas para revelar possíveis alvos moleculares para intervenções terapêuticas (ALVES-FERREIRA, et al, 2014).

Uma abordagem da bioinformática muito interessante é a chamada *High Throughput Virtual Screening* (HTVS), ao avaliar centenas ou milhares de compostos em um curto espaço de tempo a fim de identificar candidatos a fármacos (TAFT, et al, 1994). Essa abordagem consiste em desenvolver ou utilizar uma biblioteca de compostos químicos, em busca daqueles que têm maior probabilidade de exibir atividade biológica contra uma determinada proteína-alvo acelerando assim o processo de descoberta de novos medicamentos (BRETAS, 2013).

As abordagens da modelagem e do atracamento molecular (*molecular docking*) possibilitam prever as interações entre uma molécula candidata e seu alvo molecular (proteína). A utilização dessas ferramentas pode agilizar a escolha e o aprimoramento de substâncias químicas com potencial atividade biológica, além de reduzir os custos da pesquisa, melhorar significativamente a capacidade preditiva do alvo do fármaco e compreender o mecanismo molecular relacionado ao desenho farmacológico (FAN, et al, 2019). Em resumo, o atracamento molecular procura reproduzir a conformação ideal com base na complementaridade e predisposição, possibilitando a previsão e obtenção da afinidade de ligação e do modo de interação entre o ligante e o receptor, no modelo “chave-fechadura” (Figura 8A) ou modelo de ajuste induzido (Figura 8B). A diferença entre esses dois métodos se baseia em: o modelo chave e fechadura enfatiza a complementaridade estrutural precisa, enquanto o modelo induzido destaca

a capacidade de adaptação e mudança conformacional das moléculas envolvidas no atracamento molecular (MORRIS, et al, 2008).

Figura 8. Representação esquemática dos modelos (A) “chave-fechadura” e (B) induzido.



Fonte: MORRIS, et al, 2008.

Além disso, a descoberta de fármacos utiliza ferramentas da bioinformática para realizar triagens virtuais em vastos repositórios de compostos químicos, buscando identificar potenciais fármacos capazes de interagir com alvos terapêuticos específicos. Esse processo resulta em uma economia significativa de tempo e recursos, reduzindo a quantidade de compostos necessários para testes experimentais (FIGUEIREDO et al., 2018). Nesse contexto, o estudo de Suwitono e Lizki (2016) ilustra de forma prática a aplicação do atracamento molecular, destacando a relevância dessa metodologia na descoberta de novos fármacos. Os autores avaliaram a afinidade de ligação entre três flavonoides e o receptor NF-κB, utilizando a abordagem da triagem virtual para medir as energias de ligação em Kcal/mol. Os resultados, com valores de -8,96 Kcal/mol para Engeletin, -7,59 Kcal/mol para Cyclomorusin e -7,00 Kcal/mol para Cyclomulberrin, refletem interações de diferentes intensidades, sendo que valores mais negativos indicam ligações mais fortes e potencialmente mais eficazes. Esse estudo não apenas demonstra a utilidade das ferramentas de bioinformática para identificar compostos promissores, mas também exemplifica como o atracamento molecular pode otimizar o processo de

desenvolvimento de fármacos, permitindo a triagem inicial de compostos e a priorização de candidatos terapêuticos mais robustos.

Outra abordagem interessante na descoberta de novos compostos é a predição computacional das propriedades farmacocinéticas. Essa análise permite avaliar, com base nas características químicas, como um composto poderá ser absorvido, distribuído, metabolizado e eliminado pelo organismo – parâmetros conhecidos como ADME: Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (CACERES et al., 2020). Essas previsões são fundamentais para compreender o comportamento de um composto em organismos vivos antes mesmo de sua validação experimental *in vitro* ou *in vivo* (FERREIRA et al., 2019). A plataforma *online* Swiss Target Prediction destaca-se como uma ferramenta bioinformática amplamente utilizada para prever interações entre compostos químicos e seus alvos terapêuticos. Baseando-se na semelhança estrutural de pequenas moléculas bioativas com ligantes conhecidos, a ferramenta é empregada para identificar interações moleculares, prever possíveis efeitos colaterais e analisar alvos secundários. Em um estudo realizado por Daina e colaboradores (2019), a plataforma foi utilizada para testar 500 moléculas, das quais 72% tiveram ao menos um alvo corretamente previsto em humanos. Esses resultados evidenciam a capacidade preditiva do *software*, ressaltando sua relevância em etapas pré-clínicas de desenvolvimento de fármacos (Shaikh, et al., 2020).

2.1.7 Testes de atividade biológica *in vitro* contra *Leishmania* spp.

Apesar dos testes *in silico* serem de suma importância na triagem de compostos no descobrimento de novos fármacos, há a necessidade de seguimento dos testes para confirmação da atividade biológica predita: testes *in vitro* e *in vivo*. É interessante também verificar a toxicidade das substâncias promissoras frente a células de linhagem humana (ROGERO, et al, 2003).

Dessa forma, os ensaios *in vitro* realizados em formas parasitárias promastigotas, amastigotas e, também, diretamente na enzima TR de espécies de *Leishmania* representam abordagens cruciais na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos contra as leishmanioses (ANDRADE-NETO et al, 2021). Os promastigotas, forma flagelada do parasito presente no trato digestivo do vetor, são

cultivados e submetidos a diversas condições experimentais, incluindo testes com compostos para avaliar seu impacto na viabilidade do parasito. Já os amastigotas, forma intracelular encontrada em células hospedeiras (macrófagos), são alvo de testes que envolvem a infecção *in vitro* de células hospedeiras, proporcionando uma avaliação do fármaco por meio da infecção celular (PINHEIRO, et al, 2023). O teste enzimático direto na proteína TR é de interessante para a avaliação e confirmação do alvo molecular, desempenhando um papel relevante no desenvolvimento de agentes terapêuticos (TOVAR, et al, 1998).

A busca por moléculas com atividade anti-*Leishmania* com especial atividade contra a enzima TR tem sido realizada. No estudo conduzido por Inácio e colaboradores (2021), investigou-se o mecanismo de ação do (-)-Epigallocatechin 3-O-galato (EGCG) contra promastigotas de *L. infantum*, parasito causador da LV. Análises *in silico* e ensaios cinéticos *in vitro* confirmaram a capacidade do EGCG de se ligar à TR, atuando como um inibidor competitivo contra as formas promastigotas de *L. infantum* (INACIO, et al, 2021).

Outro estudo, conduzido por Oliveira e colaboradores (2006), adotou uma abordagem semelhante visando a descoberta de novos agentes terapêuticos, porém em outro organismo. Neste estudo, foram sintetizados e testados diversos arilfuranos, incluindo monoarilfuranos e diarilfuranos, para avaliar sua atividade contra a TR e contra as formas tripomastigotas e amastigotas do parasito *Trypanosoma cruzi*, causador da tripanossomíase americana (também conhecida como doença de Chagas). O composto mais promissor identificado foi a diacetamida 12, que se mostrou como o melhor inibidor da TR. No entanto, não foi observada uma correlação direta entre a inibição da TR e a atividade anti-*Trypanosoma* dos compostos testados. Um resultado interessante foi observado com o composto 15, que mesmo sendo inativo contra a TR, apresentou uma redução significativa no número de tripomastigotas no sangue de camundongos (OLIVEIRA, et al, 2006).

Considerando o estudo realizado por Silva e colaboradores (2023), os promastigotas de *L. braziliensis* foram tratados com as novas moléculas, denominados Chalcone 1, Chalcone 2, Chalcone 3 e Chalcone 4. Cada um desses compostos foi submetido a uma avaliação abrangente, incluindo análises de sua atividade biológica, citotoxicidade e atividade anti-*Leishmania*. Além disso, a atividade da TR foi avaliada para determinar o impacto dos compostos sobre essa enzima. Esses testes permitiram a investigação da capacidade dos compostos em inibir

seletivamente a TR, interferindo, consequentemente, no metabolismo redox das promastigotas e afetando sua sobrevivência e crescimento. Os resultados obtidos forneceram informações valiosas sobre o potencial dos novos compostos como agentes terapêuticos contra a leishmaniose (SILVA, et al, 2023).

No estudo de Beig e colaboradores (2015) também se seguiu o mesmo raciocínio de pesquisa em *Leishmania* spp. Os novos compostos candidatos foram avaliados em promastigotas. E os resultados principais incluem a identificação de 82 novos compostos mais ativos do que a clorexidina, utilizada como controle positivo. Quatro desses compostos mostraram atividade inibitória na faixa nanomolar contra TR, sugerindo um potencial promissor para desenvolvimento futuro. Além disso, três dos compostos mais ativos foram capazes de inibir significativamente a proliferação de *T. brucei* em cultura celular. Esses resultados demonstram que a combinação de ensaios *in vitro* e *in silico* pode superar as limitações das abordagens tradicionais de triagem de alto rendimento, resultando em uma maior eficácia na identificação de compostos ativos contra TR de *Leishmania* e, potencialmente, contra microrganismos causadores de outras doenças negligenciadas (BEIG, et al, 2015).

Este cenário ressalta a necessidade contínua de pesquisa e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que possam superar as limitações observadas em compostos existentes, visando aprimorar a eficácia no tratamento de infecções por tripanossomatídeos. A busca por alternativas mais eficazes permanece crucial para enfrentar os desafios associados à resistência e às limitações terapêuticas dos medicamentos existentes, promovendo avanços significativos no arsenal terapêutico disponível para o tratamento dessas doenças negligenciadas (INÁCIO, et al, 2018).

Dessa forma o objetivo do presente estudo é avaliar o potencial de compostos de uma biblioteca pública brasileira contra a proteína tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis*.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in silico* e *in vitro* a atividade antiparasitária de compostos derivados de uma biblioteca pública contra a proteína tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis.*

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in silico* as interações entre os compostos provenientes de uma biblioteca pública e a biomacromolécula alvo tripanotiona redutase de *L. amazonensis;*
- Determinar *in silico* o perfil farmacocinético dos compostos promissores;
- Avaliar *in silico* a potencial atividade biológica antiparasitária dos compostos promissores;
- Avaliar *in silico* a seletividade dos compostos promissores frente a enzima ortóloga glutationa redutase de *Homo sapiens*;
- Avaliar *in vitro* a atividade inibitória dos compostos promissores contra formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Determinar *in vitro* a atividade inibitória dos compostos promissores contra a enzima tripanotiona redutase de *L. amazonensis*;
- Verificar *in vitro* a citotoxicidade dos compostos promissores frente a células de linhagem humana.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Compostos de uma biblioteca pública

Os compostos sintéticos são provenientes de uma biblioteca pública brasileira The Brazilian Compound Library (BraCoLi, Veríssimo et al., 2021; https://www.farmacia.ufmg.br/qf/downloads/), na qual contém 1.176 substâncias únicas e suas propriedades moleculares, físico-químicas e biológicas. Esses compostos foram desenhados e caracterizados por membros do Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal, da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), liderados pelos Prof. Ricardo José Alves e Profa. Renata Barbosa de Oliveira. Nesse estudo, foram utilizadas 69 moléculas, sequencialmente ordenadas, pertencentes a três grupos químicos distintos: L-glutamina, glicosamina e papulacandina D (BRETAS, 2013).

2.3.2 Avaliação das interações *in silico* entre os compostos e a biomacromolécula alvo tripanotiona redutase de *L. amazonensis*

2.3.2.1 Preparo dos ligantes

Os compostos (n = 1.176) foram adquiridos no formato mol2 na plataforma *online* da Faculdade de Farmácia da UFMG (https://www.farmacia.ufmg.br/qf/downloads/). A adição de cargas de Gasteiger foi realizada no Autodock Tools v. 1.5.6 (Morris GM, 2008; https://autodocksuite.scripps.edu/adt/) e os arquivos foram salvos em formato .pdbqt. As cargas de Gasteiger são amplamente utilizadas em estudos de atracamento molecular para atribuir cargas parciais a átomos dentro de uma molécula, com base em um algoritmo que considera a eletronegatividade e a hibridização atômica. Essas cargas são essenciais para simular com precisão as interações eletrostáticas entre os ligantes e os alvos proteicos durante o processo de atracamento molecular (TORRES, et al, 2019). As moléculas disponíveis na biblioteca, cuja ionização em pH 7,4, foram pré definidas e incorporadas de forma criteriosa.

2.3.2.2 Modelagem molecular da proteína tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis*

A estrutura modelada da proteína TR de *L. amazonensis* foi obtida pela equipe do grupo de pesquisa da Professora Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt, do Departamento de Ciência da Computação, Instituto de Ciências Exatas, UFJF. A modelagem molecular foi realizada conforme Silva e colaboradores (2019). O Quadro 2 mostra as características da sequência de aminoácidos da sequência usada na modelagem molecular da TR de *L. amazonensis*.

Quadro 2: Características da sequência usada na modelagem molecular da enzima TR de *L. amazonensis*

Uniprot ID	Quantidade de aminoácidos	Escore de anotação	Presença de		Local da célula	Referência
			Cofator	Ligante		
A5JV95	491	3/5	NADP+ FAD	tripanotina	Citosol e mitocôndria	Hsu et al., 2008

Fonte: Uniprot (https://www.uniprot.org/) (2024).

A enzima alvo deste estudo, a tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis* (LaTR), foi modelada tridimensionalmente utilizando o *software* Modeller v.13. A modelagem baseou-se em *templates* selecionados do banco de dados biológico Protein Data Bank (PDB, https://www.rcsb.org/), escolhidos por apresentarem alta identidade de sequência (84%) e similaridade estrutural (91%). Foram utilizadas diferentes condições catalíticas da enzima para representar etapas distintas do seu mecanismo de ação. A escolha de múltiplas conformações foi fundamental para avaliar potenciais alvos de inibição por meio do atracamento molecular, em vez de considerar apenas uma condição.

A qualidade estrutural dos modelos foi avaliada com o uso de ferramentas como Procheck (Laskowski, et al, 1993) e Molprobity (Chen, et al, 2010), que asseguraram a confiabilidade das estruturas para estudos de atracamento molecular. Durante o processo de modelagem, os estados de protonação de resíduos críticos

foram ajustados para refletir as condições catalíticas específicas em cada etapa do mecanismo.

Os resíduos catalíticos C52 e C57 foram configurados para assumir diferentes estados de acordo com a conformação da enzima: i) forma fechada: Esses resíduos formam uma ponte dissulfeto, representando o estado oxidado da enzima; e ii) formas abertas: C52 e C57 apresentam estados alternados entre ionizados (com carga negativa) e protonados, dependendo das interações com cofatores.

Além disso, o resíduo H461 desempenha um papel crucial na estabilização do estado protonado de C52 durante a redução do substrato, contribuindo para o mecanismo redox da enzima. Os ajustes de protonação foram realizados para garantir compatibilidade com a presença dos cofatores NADP e FAD, assim como suas formas reduzidas (FADH2).

O racional para testar diferentes conformações no atracamento molecular em vez de considerar apenas uma condição foi baseado na dinâmica funcional da TR. Ao inibir a enzima nas condições zero e um, impede-se a entrada do NADPH, bloqueando completamente a cascata catalítica antes que o processo se inicie. Por outro lado, se o inibidor atuar apenas no sítio catalítico, significa que o NADPH já foi transferido e o ciclo já começou. Nesse caso, a inibição ocorre após ou durante a ativação das cisteínas (C52 e C57).

Assim, diferentes estratégias foram utilizadas para inibição: Inibir o sítio de NADPH impede a entrada do cofator e bloqueia toda a cascata catalítica antes que qualquer reação ocorra. Esse sítio é mais acessível e sua inibição tem potencial para ser mais eficiente. Mas, ao inibir o sítio catalítico pode-se afetar a função da enzima após a ligação do NADPH, o que exige uma abordagem mais específica. Esse sítio depende de metais, tornando-o um alvo mais desafiador, porém estratégico. Dessa forma, testar múltiplas conformações no atracamento molecular permitiu avaliar qual momento e local são mais eficazes para inibir a TR, aumentando as chances de sucesso no desenvolvimento de novos fármacos. (Silva et al, 2019).

2.3.2.3 Atracamento molecular

Para iniciar o atracamento molecular foi necessária a definição do tamanho ótimo da caixa que foi realizada baseado nos tamanhos dos maiores ligantes a serem analisados. A verificação do tamanho dos ligantes foi realizada individualmente (para cada ligante) utilizando The PyMOL Molecular Graphics System v.2.5.5 (https://www.pymol.org/) e as dimensões foram dadas em Angstrom (Å). Os valores das coordenadas cartesianas X, Y e Z foram definidos. A conferência do tamanho da caixa foi realizada visualmente utilizando o Autodock Tools v.1.5.6 (Morris, 2009; https://autodocksuite.scripps.edu/adt/).

As análises de afinidade de ligação e as interações entre ligante-proteína foram realizadas utilizando o AutoDock Vina (https://vina.scripps.edu/, Trott e Olson, 2010; Eberhardt et al., 2021) e Dockthor-vs Web Service (https://dockthor.lncc.br/, Guedes et al., 2024). Os seguintes parâmetros foram avaliados: afinidade média, constante de inibição média e Z Score.

A afinidade média representa a energia de ligação média entre um ligante e um receptor. É expressa em quilocalorias por mol (Kcal/mol) e indica a força dessa interação: quanto mais negativo o valor, mais forte é a afinidade de ligação. (SUWITONO, et al, 2016). A afinidade média é calculada como a média das energias livres de ligação estimadas para várias poses do ligante em interação com o receptor. Diferentemente da energia de ligação isolada, que avalia a interação de uma única pose, a afinidade média reflete o comportamento médio de todas as poses geradas durante o atracamento molecular. Isso permite uma análise mais robusta e representativa do potencial de ligação (Reis, et al, 2019). O valor médio foi calculado para representar uma avaliação global das interações entre os ligantes e a LaTR em diferentes condições experimentais, considerando que a afinidade de ligação não deve ser baseada em uma única pose do ligante, mas sim no comportamento médio de todas as poses geradas durante o processo de atracamento molecular.

Foi avaliada também a constante de inibição média (cKi) que é uma medida da eficácia com que um ligante pode inibir uma enzima ou receptor, expressa em micromolar (µM). Valores mais baixos de cKi indicam maior potência inibitória, significando que menores concentrações do ligante são necessárias para inibir a atividade do receptor (CER, et al, 2009). Além disso, avaliou-se também o Z Score que é uma medida estatística que indica o quão distante, em termos de desvio padrão, um valor está da média de um conjunto de dados. No contexto do atracamento

molecular, o Z Score médio pode ser usado para avaliar a qualidade e a confiabilidade das previsões de atracamento molecular, comparando a afinidade de ligação de um ligante específico com um conjunto de ligantes de referência. Um Z Score mais baixo indica que a afinidade de ligação é significativamente melhor do que a média dos ligantes de referência (KIM, et al, 2019).

Os valores de afinidade global média foram obtidos nos dois softwares. Os resultados de cKi foram calculados conforme fórmula abaixo, e apresentados como média dos dois softwares usados:

$$cKi = e(\frac{\triangle G}{RT})$$

Onde, △G é a afinidade média obtida no software; R é a constante dos gases ideais (1,98719) e T é a temperatura em Kelvin (298,15).

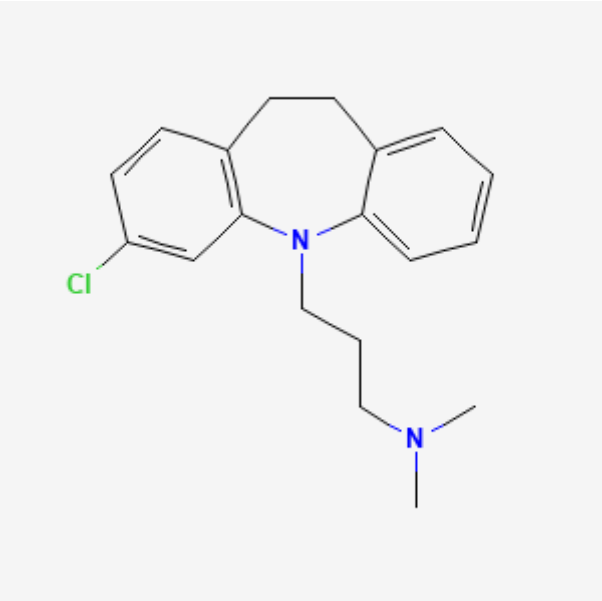
Já o Z-Score é uma medida estatística que indica o quão distante, em termos de desvio padrão, um valor está da média de um conjunto de dados. No contexto do atracamento molecular, o Z-Score foi calculado para cada um dos programas utilizados para avaliar a qualidade e confiabilidade das previsões de afinidade de ligação de um ligante específico (Kim, et al, 2019).

Foram selecionados para testes *in vitro* aqueles compostos que atenderam os seguintes critérios:

1. Melhor Z-score Médio Global em 4 condições: Os compostos foram priorizados se apresentassem o melhor Z-score médio global em quatro diferentes condições da LaTR.
2. Melhor Z-score Médio Global em 3 condições: Em seguida, foram selecionados os compostos com o melhor Z-score médio global em três condições da LaTR.
3. Melhor Z-score Médio Global em 2 condições: Por último, foram escolhidos os compostos com o melhor Z-score médio global em duas condições da LaTR.

O fármaco controle positivo utilizado para as análises *in silico* foi a clomipramina (Figura 9), um conhecido inibidor da proteína TR. A estrutura química do composto foi acessada no PubChem *database* (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/).

Figura 9. Estrutura química do fármaco clomipramina usado como controle positivo das análises *in silico*.



Fonte: PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/).

2.3.2.4 Determinação do perfil farmacocinético *in silico* e potencial atividade biológica dos compostos promissores

Foram analisados alguns parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção - ADME) dos compostos promissores em duas plataformas *online* gratuitas: SwissADME (http://www.swissadme.ch/, Daina et al., 2017) e pkCSM Pharmacokinetics (https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction/, Pires et al., 2015). A toxicidade das moléculas foi avaliada na plataforma pkCSM Phamacokinetics (https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction/, Pires et al., 2015). Os Quadros 3 e 4 mostram os parâmetros avaliados, valores de referência e detalhes sobre cada um dos parâmetros.

Quadro 3: Parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos utilizados no estudo.

Farmacocinética	Parâmetro	Valor de referência	Observação
Absorção	Permeabilidade intestinal (Caco-2 permeability)	< -0,90	Avalia a capacidade do composto de atravessar as células intestinais.
	Absorção intestinal humana	Alta absorção (> 90%): Moderada absorção (40%-90%) Baixa absorção (< 30%)	Estima a fração do fármaco que é absorvida após administração oral.
	Solubilidade aquosa	Alta solubilidade (≥ 1 mg/mL) Baixa solubilidade (< 0,1 mg/mL)	Importante para avaliar a dissolução do composto no trato gastrointestinal.
	logP: Coeficiente de partição octanol/água	Ideal entre 1 e 3	Coeficiente de partição octanol/água, que indica a lipofilicidade do composto, afetando sua absorção e permeabilidade.
Distribuição	Volume de distribuição (Vd)	Ideal 0,6 a 2,0 L/kg	Indica como o composto se distribui entre o plasma e os tecidos após a administração.
	Massa molar (g/mol)	Ideal entre 200 g/mol e 500g/mol	Importante para prever a distribuição do composto no organismo.
	TPSA (Área de superfície polar topológica)	Ideal < 140 $Å^2$	Influencia a permeabilidade celular e a capacidade de atravessar membranas biológicas.

	nrotb (Número de Ligações Rotativas)	Ideal < 10	Reflete a flexibilidade molecular, influenciando a permeabilidade e a bioatividade.
Metabolismo	substrato e inibição do citocromo P450 (CYPs)	não (ausência de inibição) ou sim (presença de inibição) em sete isoformas.	Substrato e inibição do citocromo P450 (CYPs): Avalia se o composto é metabolizado por enzimas do citocromo P450 e se pode inibir essas enzimas, o que pode levar a interações medicamentosas.
Excreção	Clearance renal	baixo: < 5 mL/min/kg moderado: 5 - 15 mL/min/kg alto: > 15 mL/min/kg	Avalia a taxa na qual o composto é eliminado pelos rins.
Toxicidade	Toxicidade hepática	Alta/moderada/baixa	Avalia se o potencial composto pode causar danos ao fígado.
	Mutagenicidade (AMES test)	Sim/Não	Prediz se o composto pode causar mutações genéticas.
	Citotoxicidade	Baixo/moderado/alto	Avalia o efeito tóxico sobre as células. É avaliado toxicidade aguda do rato oral (LD50) indica a dose de um composto que é letal para 50% dos ratos testados, geralmente expressa em mol/kg e toxicidade crônica do rato oral (LOAEL) representa a menor dose em que efeitos adversos foram observados em ratos ao longo do tempo, expressa em log mg/kg_bw/dia (miligrama por quilograma de peso corporal por dia).

	Aceptadores de H	Ideal até 10	Número de átomos no composto que podem aceitar ligações de hidrogênio, influenciando a solubilidade e as interações moleculares.
	Doadores de H	Ideal até 5	Número de átomos no composto que podem doar ligações de hidrogênio, influenciando a solubilidade e as interações moleculares.

Fonte: pKCSM Pharmacokinetics (https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/).

Quadro 4: Demais parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos utilizados no estudo.

Farmacocinética	Parâmetro	Valor de referência	Observação
Absorção/Distribuição	Massa molar	<500 Da	Influencia a absorção, valores altos podem dificultar a passagem pela membrana celular.
	TPSA (Área de Superfície Polar Topológica):	Ideal <140 Å²	Impacta a permeabilidade e absorção;
	nrotb (Número de ligações rotativas)	ideal <10	Afeta a flexibilidade molecular, com impacto na absorção
	Absorção GI (Gastrointestinal)	Alta/baixa	Avalia a capacidade de absorção do composto no trato GI.
	logP consenso (octanol/água)	Ideal entre 0 e 5	Reflete a lipofilicidade, que afeta a permeabilidade
	Aceitadores de H	Ideal <5	Impactam a solubilidade e permeabilidade.
	Doadores de H	Ideal <10	Influenciam a solubilidade

			aquosa e a permeabilidade intestinal do composto.
Metabolismo	Inibição CYP	Ideal não inibir nenhuma das 5 isoformas avaliadas	Indica se o composto inibe enzimas do CYP, podendo interferir no metabolismo de outros fármacos.
Excreção	LogS	Ideal entre -4 e -6	Refere-se à solubilidade aquosa, importante para a absorção;

Fonte: SwissADME (http://www.swissadme.ch/)

A predição da atividade biológica antiparasitária e/ou anti-protozoária foi realizada na plataforma *online* gratuita Way2Drug (http://www.way2drug.com/, Filimonov et al., 2014) utilizando a ferramenta PASS Online. Como valor de referência uma atividade biológica acima de 30% foi considerada satisfatória. O PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) é um algoritmo que prevê a atividade biológica de substâncias com base em suas estruturas químicas. Ele analisa e compara a substâncias de interesse contra um extenso banco de dados de compostos conhecidos e suas respectivas atividades, aplicando métodos de aprendizado de máquina para estabelecer correlações entre a estrutura molecular e a atividade biológica. O algoritmo gera um espectro de atividades potenciais para cada composto, indicando a probabilidade de interação com diferentes alvos biológicos (Druzhilovskiy, et al, 2017).

2.3.2.5 Avaliação da seletividade *in silico* dos compostos promissores frente a proteínas de *Homo sapiens*

Para avaliar a seletividade *in silico* dos compostos promissores em relação à proteína ortóloga glutationa redutase (GSR) de *Homo sapiens*, ou seja, uma proteína que é encontrada em diferentes espécies e que possui uma função similar. Utilizou-se então a plataforma *online* gratuita Swiss Target Prediction (http://www.swisstargetprediction.ch/, Daina, et al., 2019). Essa ferramenta permite prever a probabilidade de interação entre os compostos analisados e proteínas de *H. sapiens*, calculando a afinidade com base em modelos estruturais e dados disponíveis. A probabilidade de interação é representada por um valor numérico, onde valores mais altos indicam uma maior chance de ligação entre o composto e proteínas humanas. Um valor de referência comumente utilizado para considerar uma interação relevante é superior a 0,3, embora esse limiar possa variar dependendo do contexto do estudo. Dessa forma, essa análise possibilita a identificação de compostos com potencial terapêutico, além de fornecer uma comparação sobre a seletividade dos mesmos em relação a alvos relevantes no hospedeiro humano (http://www.swisstargetprediction.ch/) (Daina, et al, 2019).

2.3.2.6 Avaliação da atividade inibitória *in vitro* dos compostos promissores contra formas promastigotas de *L. amazonensis*

2.3.2.6.1 Cultivo e manutenção de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio Schneider acrescidos de 20% de soro fetal bovino (do inglês *fetal bovine serum*) e antibióticos (100 µg/mL estreptomicina e 100 U/mL de penicilina) em frascos para cultura estéreis, mantidos a uma temperatura de 26 ºC ± 1ºC. As amostras foram mantidas por meio de duas passagens semanais. As concentrações iniciais e para repique eram de 5 x 10^6 promastigotas/ml. O crescimento do parasito foi avaliado qualitativa e quantitativamente por observações microscópicas da aparência e mobilidade de promastigotas e pela contagem em hemocitômetro.

2.3.2.6.2 Avaliação da atividade inibitória em promastigotas de *L. amazonensis*

O efeito dos fármacos promissores em promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliado utilizando o método da avaliação da viabilidade com o reagente resazurina. As células viáveis foram mensuradas em fluorímetro (Spectra Max GENINI XPS – Molecular Devices, Silicon Valley, EUA), com comprimento de onda de excitação de 560 nm e de emissão de 590 nm. Uma curva de dose-resposta foi realizada por meio da incubação de 1x10^6 parasitos/mL promastigotas de *L. amazonensis* submetidos a diferentes concentrações dos compostos (128 µM, 64 µM, 32 µM, 16 µM, 8 µM, 4 µM e 2 µM) em placas de 96 poços estéreis, com volume final de 200 µL, por 72 horas a 26 °C ± 1ºC. O cálculo da CI50 (concentração inibitória média) foi realizado por análise de regressão logarítmica não linear no software *GraphPad Prism* v.7.0 (https://www.graphpad.com/). Os controles utilizados incluíram: i) veículo DMSO (dimetilsulfóxido) 2%, solvente usado na solubilização dos compostos, e ii) negativo (apenas promastigotas de *L. amazonensis*). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.3.2.7 Determinação a atividade inibitória *in vitro* dos compostos promissores contra a enzima tripanotiona redutase de *L. amazonensis*

A atividade da TR de *L. amazonensis* foi avaliada pela reação de Ellman (HAMILTON et al., 2003), baseada na redução do DTNB (ácido 5,5’-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)) a 2TNB (2-nitro-5-ácido tiobenzóico) pela tripanotiona reduzida [$T(SH)_2$], levando à formação de tripanotiona oxidada [$T(S)_2$], que será regenerada

para $T(SH)_2$ pela TR. Para obter a fração solúvel, formas promastigotas de *L. amazonensis* foram centrifugadas a 17.500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em um coquetel inibidor de proteases contendo Tampão Tris-Hepes 40 mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 8,0, sacarose 250 mM, KCl 10 mM, PMSF 1 mM e E-64 10 µM. Após a ressuspensão, a solução foi submetida a choque térmico a baixa temperatura com nitrogênio líquido e, posteriormente, foi centrifugada a 17.500 g. O sobrenadante foi considerado como a fração solúvel. A concentração de proteína foi quantificada utilizando NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (ThermoScientific).

O meio de reação para avaliar a atividade enzimática foi composto por: Tampão Tris-Hepes 40 mM pH 7,5; EDTA 1 mM; NADPH 0,1 mM; tripanotiona oxidada ($T[S]_2$) 1 µM e DTNB 0,1 mM. Uma curva de cinética de inibição enzimática foi realizada na tentativa preliminar de identificar candidatos mais promissores entre os compostos testados. Para isso, a atividade enzimática foi avaliada após incubação da enzima tripanotiona redutase *L. amazonensis* com 500 µM de cada composto, em placas de 96 poços estéreis, durante 1 hora a 26°C ± 1ºC. A atividade enzimática foi avaliada colorimetricamente com comprimento de onda de 410nm (Spectra Max GENINI XPS – Molecular Devices, Silicon Valley, EUA).

Posteriormente, o composto mais promissor foi selecionado para avaliar atividade em diferentes concentrações (1.000 µM, 500 µM, 250 µM, 125 µM, 62 µM, 30 µM, 15 µM) A reação foi iniciada com a adição da fração solúvel na concentração final de 0,4 mg/mL. A atividade da TR (formação de 2TNB) foi avaliada colorimetricamente a 410 nm (Spectra Max GENINI XPS – Molecular Devices, Silicon Valley, EUA) em uma cinética de 30 minutos com intervalo de 15 segundos, com 5 minutos de reação. Os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando controles: i) veículo DMSO (dimetilsulfóxido) 2%, solvente usado na solubilização dos compostos, e ii) negativo (enzima). Os graficos foram construídos utilizando o software *GraphPad Prism* (https://www.graphpad.com/).

2.3.2.8 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos compostos promissores frente a células de linhagem humana

2.3.2.8.1 Cultivo Celular

Fibroblastos de *Homo sapiens* da linha celular CCD-1059Sk (pele normal) foram cultivados em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), enriquecido com L-glutamina (2 mM), 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB). O pH do meio foi meticulosamente ajustado para 7,2 a 7,4, criando um ambiente propício para o crescimento celular. As culturas foram mantidas em uma incubadora a 37 °C, sob uma atmosfera controlada de 5% de CO_2, garantindo condições ideais para a proliferação celular.

O meio de cultura foi renovado a cada dois dias, e as células foram subcultivadas ao atingirem 80% de confluência. Para a realização do subcultivo, o meio foi cuidadosamente removido, e as células aderentes foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em seguida, as células foram tratadas com 1 mL de tripsina a 0,05% e ácido tetracético etilenodiamina (EDTA) por 3 minutos. A ação da tripsina foi prontamente inativada com meio de cultura basal suplementado com SFB, e a suspensão celular obtida foi dividida em duas novas garrafas de cultura.

2.3.2.8.2 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos compostos frente a fibroblastos humanos

A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio colorimétrico com o sal de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), um método baseado na capacidade das enzimas desidrogenases presentes em células viáveis de converter o MTT em cristais de formazan, que se apresentam como um produto azul escuro insolúvel em água. A quantidade de cristais de formazan gerados é diretamente proporcional ao número de células viáveis, conforme demonstrado por Mosmann (1983).

Após o tratamento das células com os compostos por um período de 48 horas, o meio de cultura foi removido e substituído por uma solução de MTT a 0,5 mg/mL. As placas foram então incubadas em estufa a 37 °C, em um ambiente úmido e com 5% de CO_2, por 4 horas. Após esse tempo, as células foram examinadas sob um

microscópio óptico para a visualização dos cristais de formazan. Os cristais formados foram solubilizados com uma solução de isopropanol a 0,05 M de HCL, sob agitação por 5 minutos. A densidade óptica da solução foi mensurada em um espectrofotômetro a 570 nm, com a subtração do fundo a 645 nm.

A viabilidade celular foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{[(absorbância\ teste - absorbância\ branco) \times 100]}{(absorbância\ controle - absorbância\ branco)}$$

Para garantir a precisão dos resultados durante os experimentos com MTT, todos os ensaios foram conduzidos em condições de baixa luminosidade, os graficos foram construidos utilizando o software *GraphPad Prism* (https://www.graphpad.com/).

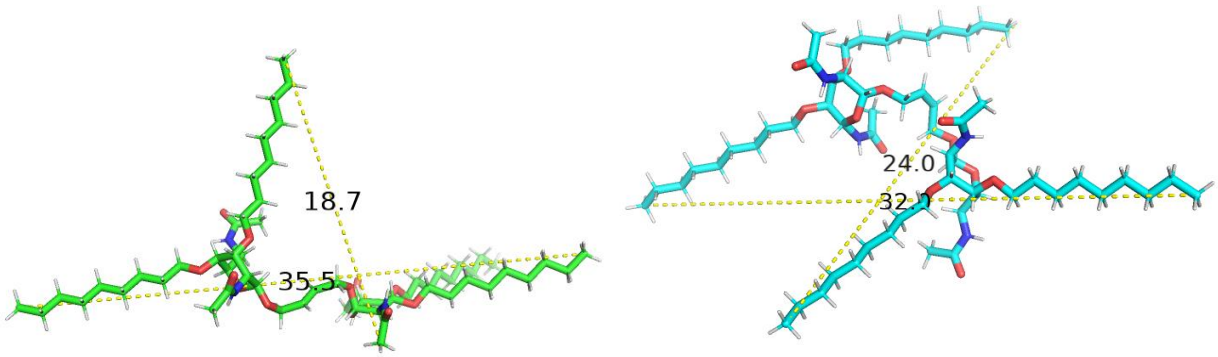
2.4 RESULTADOS

2.4.1 Avaliação das interações *in silico* entre compostos provenientes de uma biblioteca pública e a biomacromolécula alvo tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis*

Para cálculo do tamanho da caixa, o comprimento dos maiores compostos foram 35.5 Å e 24.0 Å. A Figura 10 mostra dois ligantes que apresentaram maior tamanho estrutural. Dessa forma, as dimensões da caixa foram definidas: X = 28, Y = 28 e Z = 34 para as quatro condições da LaTR no programa AutoDockVina e X= 24 Y=24 e Z=24 no Dockthor (maior tamanho da caixa permitida pela plataforma). O centro da caixa (de acordo com a localização do sítio catalítico) para a condição aberta e fechada tiveram as dimensões definidas também: X = -22.5681, Y = -3.3104 e Z = -6.8604. Para a condição 2/3 e condição 5 da LaTR as dimensões foram: X = -25.3416, Y = 2.4109 e Z = 5.9762.

Figura 10: Estrutura química dos ligantes BR010066 (A) e BR010067 (B) mostrando os maiores valores de comprimento em Å.

A B



Fonte: Autoria própria (2024).

O Quadro 5 mostra os resultados do atracamento molecular dos compostos promissores (n = 8) da BraCoLi frente as diferentes condições da enzima LaTR. Os Apêndices A, B, C, e D mostram os resultados do atracamento molecular de todos os 69 compostos analisados nesse estudo frente a enzima LaTR. Os oito compostos foram selecionados para as análises *in vitro*.

Quadro 5: Resultados da análise de atracamento molecular mostrando os compostos promissores (n = 8).

Condição da LaTR	Parâmetro	Controle positivo	Compostos BraCoLi							
			Derivados da L-glutamina					Derivados da papulacandina D		
		clomipramina	BR010016	BR010017	BR010023	BR010031	BR010032	BR010033	BR010034	BR010035
Fechada	Afinidade média AutoDock Vina	-7,424	-7,2667	-6,7222	-7,63333	-7,7111	-7,7111	-8,5222	-7,07778	-8,68889
	Afinidade média DockThor	-6,924	-6,405	-6,96	-6,916	-6,469	-8,139	-7,426	-9,086	-7,359
	cKi médio global	6,2593	12,4508	9,8646	5,5302	10,1733	1,6541	2,0847	3,3519	2,2309
	Z score médio global	-0,3925	-0,0861	-0,0912	-0,5145	-0,3343	-1,1494	-1,1973	-1,1974	-1,2460
Aberta	Afinidade média AutoDock Vina	-8,1334	-8,4333	-8,4888	-8,5	-8,3	-8,3444	-9,5777	-8,4444	-9,1333
	Afinidade média DockThor	-7,987	-6,727	-8,016	-7,906	-6,63	-7,753	-7,615	-8,995	-8,327
	cKi médio global	1,4931	6,1905	0,9651	1,0955	7,3162	1,4197	1,3571	0,4504	0,4946

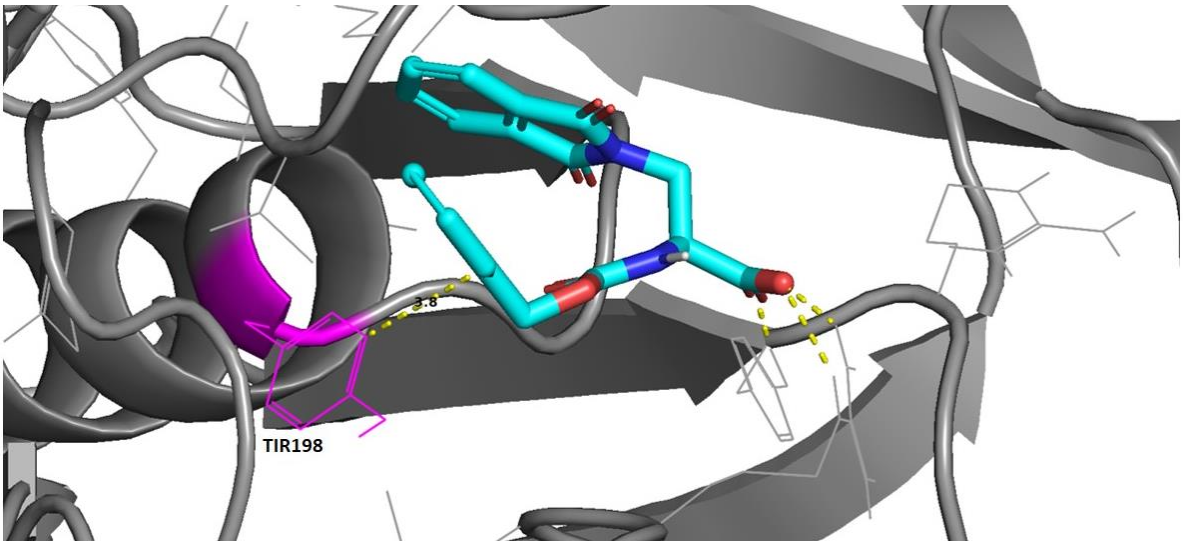
	Z score médio global	-0,3850	-0,0394	-0,6679	-0,6217	0,0682	-0,4774	-0,9893	-1,1047	-1,1145
2/3	Afinidade média AutoDock Vina	-6,874	-7,9333	-7,6444	-7,4	-7,8222	-7,8111	-8,3555	-7,61111	-9,3666
	Afinidade média DockThor	-6,554	-6,405	-6,96	-6,916	-6,469	-8,139	-7,426	-9,086	-7,359
	cKi médio global	13,0843	10,8585	5,2016	6,14291	9,9829	1,4812	2,1766	1,4277	2,0852
	Z score médio global	-0,2385	-0,2742	-0,4124	-0,2626	-0,2498	-1,1108	-1,0233	-1,4987	-1,5133
5	Afinidade média AutoDock Vina	-6,6654	-7,7666	-7,3555	-7,4	-7,76667	-6,8333	-8,3444	-7,67778	-8,6111
	Afinidade média DockThor	-6,945	-6,63	-7,237	-7,911	-7,092	-7,378	-7,464	-9,312	-8,34
	cKi médio global	11,6399	7,9178	4,5073	2,6768	4,1793	6,8520	2,0718	1,2524	0,6289
	Z score médio global	-0,3990	-0,0028	-0,0906	-0,4127	-0,2099	0,0809	-0,6358	-1,1655	-1,1481

Afinidade: Kcal/mol. cKi médio global: µM. Fonte: Autoria própria (2024).

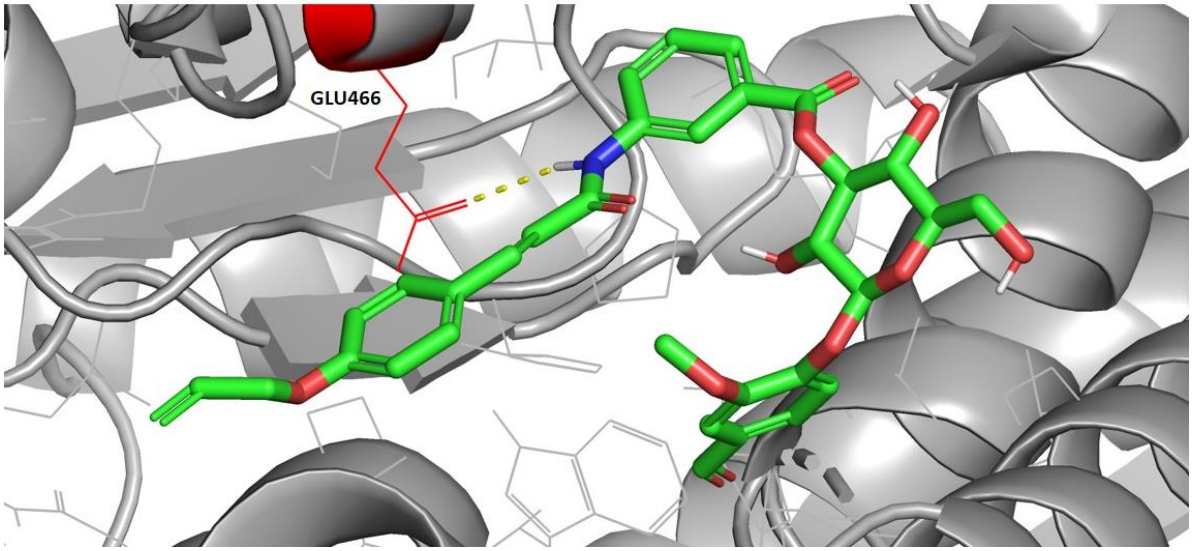
A Figura 11 mostra as interações entre dois compostos promissores e a enzima LaTR. Percebe-se que os dois compostos interagem com resíduos importantes para o sítio estudado: TYR198 para o composto BR010032 e GLU466 para o composto BR010034.

Figura 11. Interações entre dois compostos promissores.

A



B



(A) BR010032 na condição aberta realizando uma ligação do tipo *stacking* com TIR198 e (B) BR010034 na condição 3 realizando uma ligação de hidrogênio com GLU466 e a enzima LaTR visualizada no programa PyMol. Fonte: Autoria própria (2024).

2.4.2 Determinação do perfil farmacocinético *in silico* e potencial atividade biológica dos compostos promissores

Os Quadros 6 e 7 mostram as características físico-químicas e parâmetros farmacocinéticos dos compostos promissores usando as plataformas SwissADME e pkCSM Pharmacokinetics, respectivamente.

Quadro 6: Parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos dos compostos promissores (n = 8) pela plataforma Swiss ADME.

Composto	Massa molar (g/mol)	TPSA (Å)	nrotb	Aceptadores de H	Doadores de H	logP consenso (o/w)	Absorção GI	LogS	inibição CYP
BR010016	367,376	107,56	11	5	2	2.57	Alta	-4.37	Não/5
BR010017	425,412	133,86	13	7	2	2.57	Alta	-4.77	Não/4
BR010023	412,37	153,38	12	7	2	1.82	Baixa	-5.16	Não/4
BR010031	367,33	115,84	8	6	1	1.24	Alta	-3.79	Não/4
BR010032	412,33	161,66	9	8	1	0.84	Baixa	-4.58	Não/4
BR010033	619,62	170,0	15	11	4	4.07	Baixa	-6.55	Não/3
BR010034	402,39	103,68	5	8	2	2.63	Alta	-.289	Não/5
BR010035	707,72	148,08	15	11	2	4.99	Baixa	-8.09	Não/1
Controle positivo (clomipramina)	314,85	6,48	4	1	0	4.29	Alta	-5.20	Não/2

TPSA: área de superfície polar. nrotb: número de reações rotativas. logP: Coeficiente de partição octanol-água. Absorção GI: potencial de absorção gastrointestinal. LogS: solubilidade do composto. Inibição CYP: potencial inibidor de enzimas do citocromo P450. Fonte: Autoria própria (2024).

Quadro 7: Parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos dos compostos promissores (n = 8) pela plataforma pkCSM Pharmacokinetics.

Composto	Absorção				Metabolismo	Distribuição				Excreção	Toxicidade				
	Absorção intestinal	Permeabilidade Caco2	Solubilidade da água	logP	CYP's	Volume de distribuição	Massa molar (g/mol)	TPSA (Å)	nrotb	Clearance renal	Toxicidade hepática	Mutagenicidade	Citotoxicidade LD50/ LOAEL	Aceptadores de H	Doadores de H
BR01001 6	52.778	0.815	-3.365	0.8606	Não/6	-0.622	367.381	156.211	8	0.412	Sim	Não	Baixa/ moderado	5	2
BR01001 7	54.891	0.162	-3.538	0.6474	Não/6	-2.036	425.417	178.215	9	0.45	Sim	Não	Alta/ baixa	7	2
BR01002 3	50.169	-0.069	-4.847	0.7691	Não/6	0.332	412.378	170.863	9	0.332	Sim	Não	Baixa/ Alta	7	2
BR01003 1	58.173	1.1	-3.57	0.3275	Não/6	-1.026	367.337	153.901	6	0.103	Sim	Não	Alta/ Alta	6	1
BR01003 2	55.401	0.178	-4.295	0.2357	Não/6	-1.057	412.334	168.554	7	-0.049	Sim	Não	Baixo/ alto	8	1
BR01003 3	54.448	0.508	-3.932	2.7678	Não/5	-0.345	619.623	258.620	13	-0.104	Não	Não	Baixa/ Baixa	11	4

BR0100034	74.233	1.368	-4.498	1.4474	Não/7	-0.617	402.399	167.079	5	0.206	Não	Sim	Baixa/Baixa	8	2
BR0100035	88.51	0.651	-3.496	5.5288	Não/6	-1.048	707.732	299.674	13	0.05	Não	Não	Baixa/moderado	11	2
Controle (clomipramina)	94.742	1.519	-4.903	4.5284	Não/5	1.725	314.86	137.86	4	0.809	Sim	Não	Baixo/alto	2	0

TPSA: área de superfície polar. nrotb: número de reações rotativas. logP: coeficiente de partição octanol-água. Absorção intestinal: capacidade de absorção no trato gastrointestinal. Permeabilidade Caco-2: medida da permeabilidade em células Caco-2. Solubilidade da água: capacidade de se dissolver em água. CYP's: enzimas do citocromo P450. Volume de distribuição: medida da distribuição nos tecidos. Massa molar (g/mol): peso molecular do composto. Clearance renal: taxa de eliminação pelos rins. Toxicidade hepática: potencial de danos ao fígado. Mutagenicidade: capacidade de causar mutações. Citotoxicidade: toxicidade em células. LD50/LOAEL: dose letal média ou nível de efeito adverso mais baixo. Aceptadores de H: número de átomos que aceitam hidrogênio. Doadores de H: número de átomos que doam hidrogênio. Fonte: Autoria própria (2024).

Dentre os oito compostos promissores, apenas um demonstrou potencial atividade biológica antiparasitária ou antiprotozoária (Quadro 8). A plataforma utilizada Way2drug não mostrou resultados para cinco compostos analisados.

Quadro 8: Predição da atividade biológica dos compostos promissores.

Composto	Potencial atividade	
	Antiparasitária	Anti-protozoária
BR010033	✓	×
BR010034	×	×
BR010035	×	×
BR010036	×	×
BR010037	×	×
Controle (clomipramina)	×	✓ *

* atividade anti-*Leishmania*, anti-*Entamoeba* e anti-*Trypanosoma.* Fonte: Autoria própria (2024).

2.4.3 Avaliação da seletividade *in silico* dos compostos frente a proteínas de *Homo sapiens*

Os oito compostos foram submetidos à plataforma Swiss Target Prediction para avaliação *in silico* da sua interação com a proteína ortóloga glutationa redutase (GSR) em *Homo sapiens*. Apenas um composto demonstrou probabilidade de interagir com a proteína ortóloga humana (Quadro 9).

Quadro 9: Resultado da avaliação da seletividade frente a proteína ortóloga glutationa redutase (GSR) de *Homo sapiens*

Composto BraCoLi	Uniprot ID	Família enzimática	Probabilidade de afinidade (%)	Contagem de	
				Ativo	Inativo
BR010031	P00390	Oxidoredutase	11,3	4	0

Fonte: Autoria própria (2024).

2.4.4 Avaliação da atividade inibitória *in vitro* dos compostos promissores contra formas promastigotas de *L. amazonensis*

Promastigotas de cultura foram submetidos à incubação em placas de 96 poços por 72 horas com os oito compostos promissores nas concentrações 128 µM, 64 µM, 32 µM, 16 µM, 8 µM, 4 µM e 2 µM para avaliação da proliferação celular. A CI50 foi calculada e está apresentada no Quadro 10. O composto BR010034 apresentou o melhor desempenho nesse ensaio, demonstrando uma CI50 de 82,78 µM (R2 = 0,9450). Os compostos BR010033 e BR010035 precipitaram durante o experimento e os resultados não foram considerados satisfatórios. Os controles negativo (apenas promastigotas) e veículo (DMSO) apresentaram resultados esperados, atividade basal sem adição de compostos e o solvente não impactou diretamente na atividade do parasito, respectivamente.

Quadro 10. Resultados de CI50 dos compostos promissores frente à promastigotas de *L. amazonensis*.

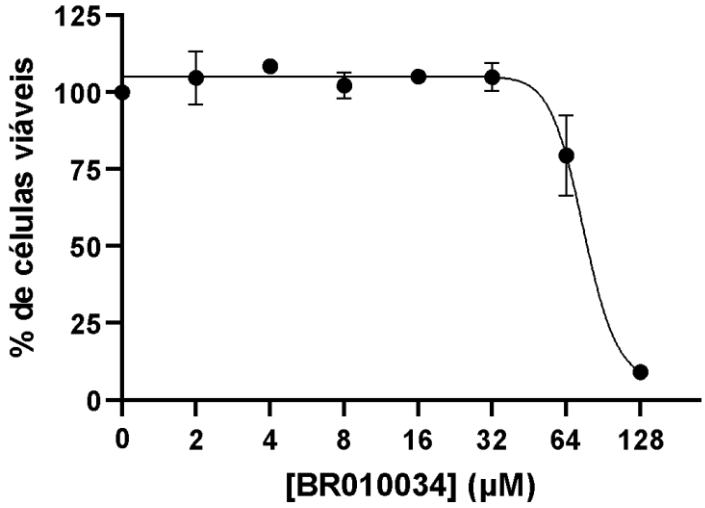
Grupo químico BraCoLi	Composto BraCoLi	CI50 (µM)	R^2
Derivados da L-glutamina	BR010016	191,4	-0,18
	BR010017	101,2	0,593
	BR010023	99,31	0,6052
	BR010031	*	*
	BR010032	*	*
Derivados da papulacandina D	BR010033	625,8	-0,3043
	BR010034	82,78	0,9450
	BR010035	2.476	0,01450

*: ensaios a serem repetidos. Fonte: Autoria própria (2024).

Foi avaliado o efeito do composto BR010034 sobre a viabilidade celular de formas promastigotas de *L. amazonensis* por meio de uma curva de dose-resposta (Figura 12). Nas concentrações mais baixas (0 a 32 µM), a viabilidade celular permaneceu alta, próxima de 100%. Isso sugere que o composto BR010034 não apresenta atividade inibitória no crescimento do parasito em baixas concentrações.

Percebeu-se que houve um declínio na viabilidade celular em aproximadamente 64 µM, observou-se uma queda acentuada na viabilidade celular, indicando um efeito do composto sobre o parasito.

Figura 12. Efeito do composto BR010034 na viabilidade de promastigotas de *Leishmania amazonensis*: curva de dose-resposta

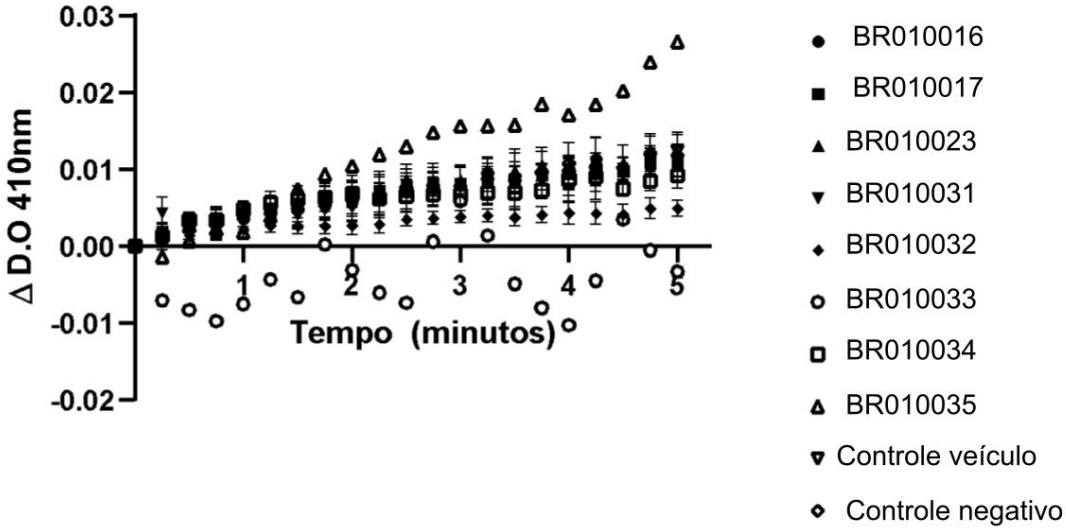


Fonte: Autoria própria (2024).

2.4.5 Determinação a atividade inibitória *in vitro* dos compostos promissores contra a enzima tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis*

A análise da atividade inibitória dos compostos (n = 8) frente a enzima LaTR foi realizada por meio de um ensaio cinético expondo a enzima isolada *in vitro* aos compostos na concentração de 500 µM por 1 hora. A Figura 13 apresenta a cinética de inibição enzimática nos primeiros cinco minutos de exposição aos compostos promissores, período em que se observou maior atividade inibitória na concentração avaliada. Os compostos BR010033 e BR010035 precipitaram durante o experimento. Esses dois compostos apresentaram resultados discrepantes frente aos outros compostos testados e aos controles (negativo e veículo). os controles negativo e veículo apresentaram resultado esperado (sem inibição enzimática).

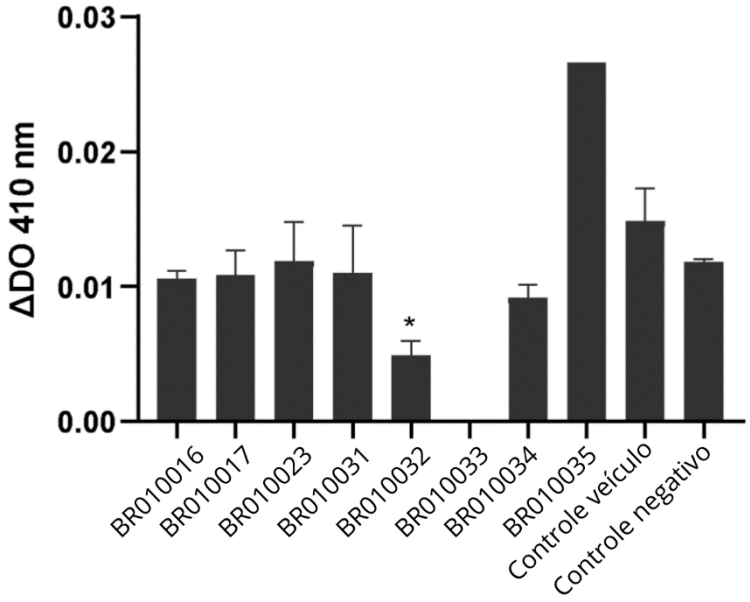
Figura 13. Curva da cinética da atividade enzimática de LaTR frente aos compostos testados a 500 µM por tempo



Fonte: Autoria própria (2024).

A Figura 14 mostra os valores de densidade óptica representando a possibilidade de cada um dos compostos testados em inibir a enzima LaTR. O composto BR010032 apresenta uma redução na absorbância, sugerindo uma maior inibição da enzima LaTR em comparação aos demais compostos e aos controles. Os controles (negativo e veículo) demonstraram resultados esperados e garantem que os efeitos observados são atribuíveis aos compostos testados.

Figura 14. Inibição da atividade enzimática da tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis*



*: p < 0,05. Fonte: Autoria própria (2024).

O Quadro 11 mostra os valores de percentual de inibição enzimática calculado para os compostos testados. O composto BR010032 apresentou melhor desempenho no teste de inibição enzimática LaTR com um percentual de 63,9%.

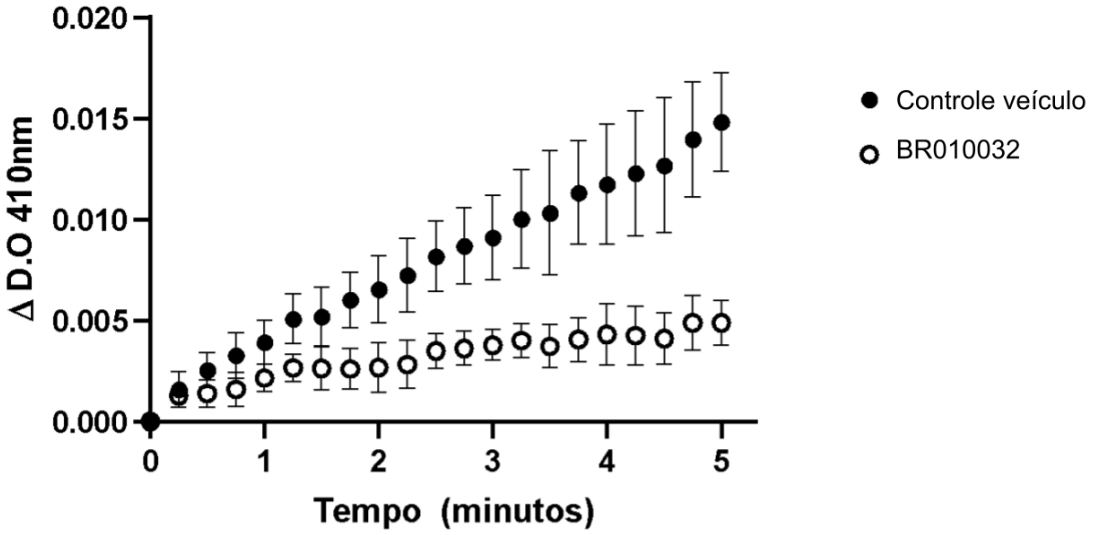
Quadro 11. Resultados do teste de inibição enzimática da LaTR dos compostos da BraCoLi

Grupo químico BraCoLi	Composto BraCoLi	Densidade ótica média	Percentual de atividade enzimática da LaTR (%)	Percentual de inibição enzimática da LaTR (%)
Derivados L-glutamina	BR010016	0,0084	77,8	22,2
	BR010017	0,0084	77,8	22,2
	BR010023	0,0097	89,8	10,2
	BR010031	0,0086	79,62	20,4
	BR010032	0,0039	36,1	63,9
Derivados papulacandina D	BR010033	0,0769	*	*
	BR010034	0,0078	72,2	27,8
	BR010035	0,0271	*	*
Controle veículo		0,0108	100	

*: resultados discrepantes. Fonte: Autoria própria (2024).

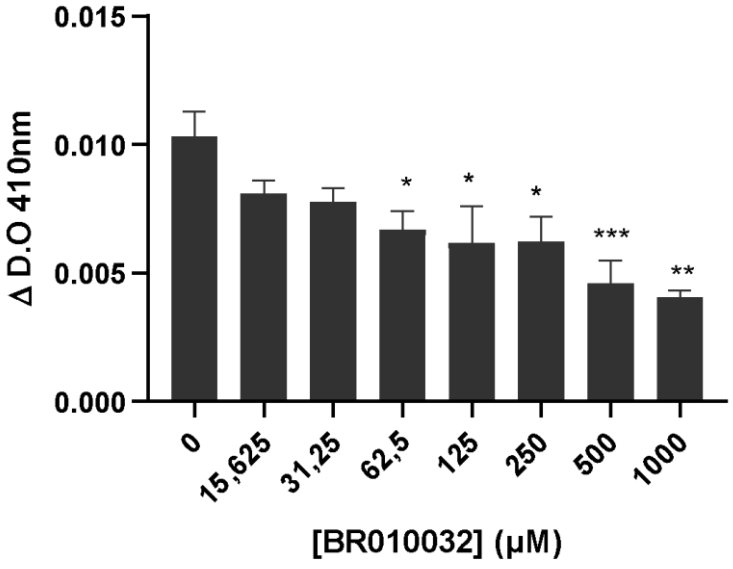
As Figuras 15 e 16 mostram a inibição da atividade enzimática da LaTR do composto BR010032 nos primeiros cinco minutos do teste e com diferentes concetrações, respectivamente. A inibição enzimática é mais pronunciada em concentrações mais altas, com significância estatística crescente, a partir de 62,5 µM.

Figura 15. Inibição da atividade enzimática da LaTR do composto BR010032 ao longo do tempo.



Fonte: Autoria própria (2024).

Figura 15. Avaliação da inibição da enzima LaTR do composto BR010032 considerando diferentes concentrações.



Controle negativo representado pelo “zero”. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$. Fonte: Autoria própria (2024).

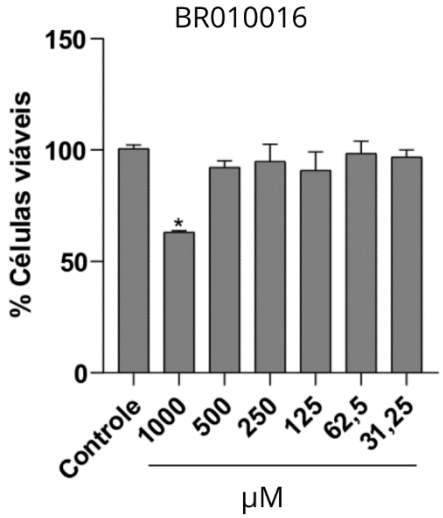
2.4.6 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos compostos promissores frente a linhagem de células humanas

Um ensaio de citotoxicidade foi realizado afim de verificar o efeito dos compostos em células de linhagem humana (fibloblastos). A Figura 17 mostra que a maioria dos compostos mostrou pouca ou nenhuma redução significativa na viabilidade celular em concentrações baixas (31,25 µM e 62,5 µM). Já em concentrações intermediárias (125 µM a 500 µM), os compostos BR010023, BR010033 e BR010034 apresentaram efeitos citotóxicos moderados.

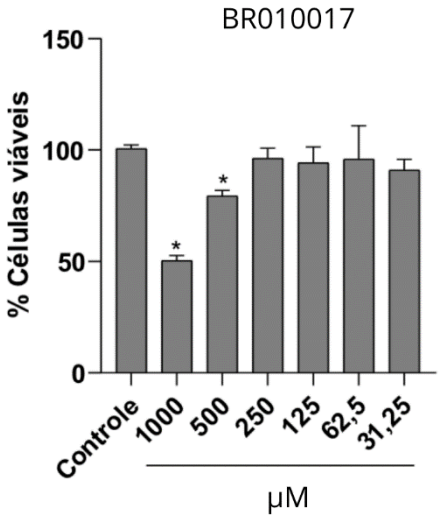
Observou-se redução significativa na viabilidade quando as células humanas foram expostas aos compostos em concentrações superiores a 500 µM, indicando efeito tóxico nessas ou acima dessas concentrações.

Figura 17. Avaliação da citotoxicidade de diferentes concentrações dos compostos promissores frente a células de linhagem humana de fibroblastos.

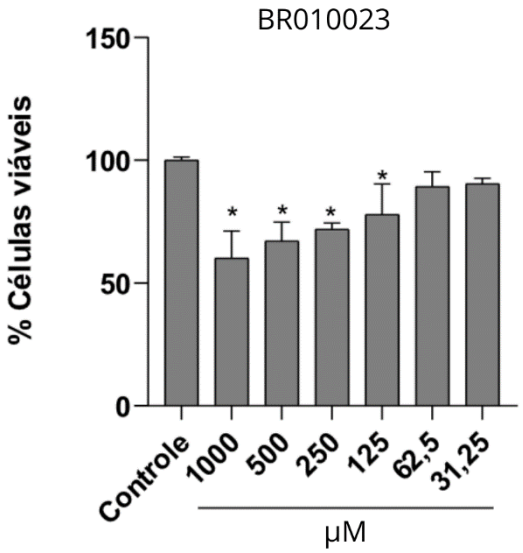
A



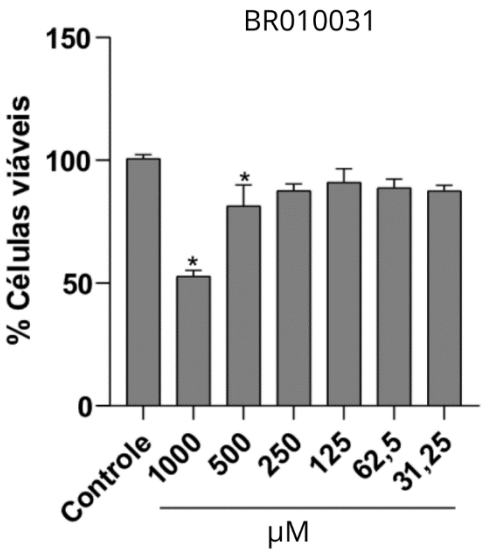
B



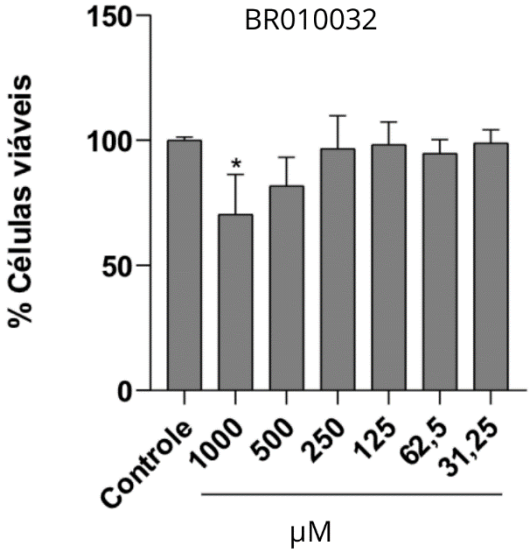
C



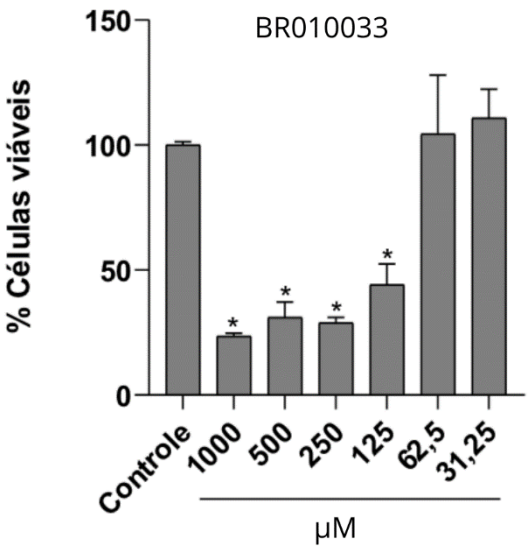
D



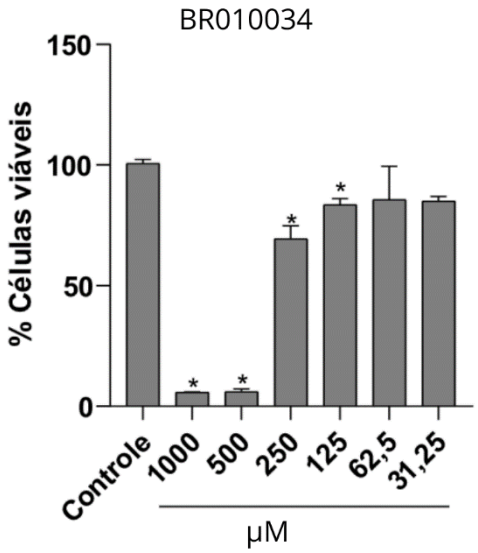
E



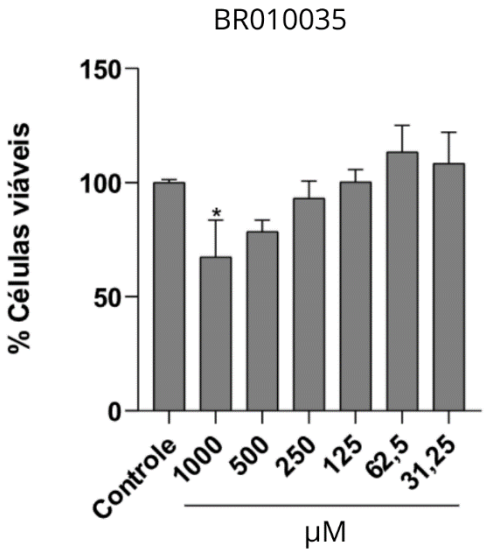
F



G



H



*: $p < 0,05$. Fonte: Autoria Própria (2024).

O Quadro 12 mostra os valores de CI50 para os compostos promissores frente a células de linhagem fibroblastos. A maioria dos compostos mostrou CI50 acima de 100 µM, e dois deles, derivados da L-glutamina, valores acima de 1.000 µM (compostos BR010016 e BR010017). Esses resultados indicam que os compostos estudados apresentam baixa toxicidade frente a células humanas *in vitro*. Destaca-se que os compostos BR010032 e BR010034, promissores nos testes de atividade biológica antiparasitária, demonstraram valores altos de CI50 de 392,2 µM e 288,6 µM, respectivamente.

Quadro 12. Resultados de CI50 dos compostos promissores frente a células de linhagem humana de fibroblastos

Grupo químico BraCoLi	Composto BraCoLi	CI50 (µM)	R^2
Derivados da L-glutamina	BR010016	>1.000	0,8501
	BR010017	>1.000	0,8696
	BR010023	168,7	0,8600
	BR010031	619,2	0,9553
	BR010032	392,2	0,5027
Derivados da papulacandina D	BR010033	97,12	0,9336
	BR010034	288,6	0,9804
	BR010035	232,3	0,7512

Fonte: Autoria própria (2024).

2.5 DISCUSSÃO

No presente estudo, realizou-se uma triagem virtual de compostos da biblioteca pública BraCoLi frente à enzima alvo LaTR utilizando metodologias de modelagem molecular para avaliar as possíveis interações existentes entre ligante-receptor e selecionar compostos promissores para avaliação *in vitro* da atividade anti-*Leishmania* e inibição enzimática específica. A integração das análises *in silico* com ensaios *in vitro* podem revelar a eficácia de diferentes compostos, sugerir mecanismos de ação, predizer perfis farmacocinéticos e, consequentemente, diminuir financeiramente o custo da pesquisa pelo “afunilamento” dos resultados.

As análises de atracamento molecular foram realizadas para quatro condições diferentes da LaTR: aberta, fechada e duas variações catalíticas. Definiu-se uma caixa no sítio de ligação, com dimensões baseadas nos maiores ligantes, e as coordenadas foram escolhidas para coincidir com o sítio catalítico, simulando condições fisiológicas, conforme Silva et al. (2021). A escolha dessas condições visou simular a flexibilidade da enzima, que é crucial na defesa antioxidante do parasito. As variações conformacionais podem expor sítios catalíticos ou regiões de interação, melhorando a precisão das interações. (SILVA, et al 2021, SILVA, et al, 2022).

A seleção de compostos com maior potencial inibitório *in silico* contra a LaTR é um passo inicial essencial na busca por novos agentes com atividade biológica. A pesquisa envolveu uma triagem virtual utilizando a biblioteca BraCoLi na íntegra, na qual contém 1.176 compostos. Durante este processo, foram identificados e selecionados grupos químicos que ainda não haviam sido testados contra *Leishmania* spp. Os testes *in vitro* foram realizados com oito compostos pertencentes à três grupos químicos diferentes: os derivados da L-glutamina, os derivados da glicosamina e os derivados da papulacandina D. Entre os resultados obtidos, dois grupos químicos se destacaram por apresentarem resultados promissores. Essa escolha foi fundamentada por meio da análise dos valores de Z Score e cKi, priorizando aqueles com melhor desempenho nas diferentes condições da enzima-alvo. Essa abordagem é relevante porque cada conformação representa condições fisiológicas distintas, permitindo identificar compostos eficazes em contextos variados de flexibilidade enzimática. A escolha dos compostos que tiveram menor valor médio nessas métricas indica uma estabilidade de interação maior, sugerindo que esses ligantes têm potencial para inibir a LaTR de forma mais consistente em condições reais, como

observado em estudos como de de Singh e colaboradores (2024) que discutem sobre inibidores de enzimas como um mecanismo terapêutico como principal alvo no desenvolvimento de fármacos. A afinidade de ligação e o cKi são métricas que trazem uma visão complementar sobre a interação ligante-receptor. A afinidade média representa a energia de ligação média entre um ligante e um receptor, mas essa métrica isolada não garante eficácia inibitória (SUWITONO, et al, 2016). O cKi, por outro lado, é uma medida da potência inibitória e é influenciado por fatores como as propriedades físico-químicas dos ligantes e o encaixe conformacional (CER, et al, 2009). Em um estudo prévio de 2019, observou-se que, muitas vezes, um valor baixo de cKi está associado à capacidade do composto de interagir de forma eficaz com o sítio ativo em condições fisiológicas simuladas (Cheng et al., 2019). Ao comparar os compostos entre diferentes condições, obtemos uma visão sobre quais condições enzimáticas favorecem interações mais fortes, indicando compostos que podem apresentar maior eficácia em ensaios biológicos. O cálculo do Z Score forneceu uma métrica estatística importante para avaliar a confiabilidade dos dados. Em estudos de atracamento molecular, a variabilidade nas interações entre diferentes condições enzimáticas e no atracamento molecular podem ter incertezas nos resultados. O Z Score é útil porque permite avaliar quais compostos apresentam interações consistentes entre as condições, uma prática essencial para a triagem de inibidores em potencial com base em sua estabilidade de interação (CHAUDARI, et al, 2017). Ao cruzar esses dados com o uso de duas plataformas de atracamento molecular, como AutoDock Vina e DockThor, complementa e aumenta-se a confiabilidade dos resultados e melhora a precisão. Essa mescla de dados é crucial para garantir que os compostos selecionados sejam realmente promissores para testes experimentais (HOUSTON, et al, 2013). Dado o papel fundamental da enzima LaTR no equilíbrio redox de *L. amazonensis*, os compostos identificados no presente estudo podem representar alternativas para o desenvolvimento de novos fármacos mais específicos e menos tóxicos.

A análise do perfil farmacocinético e da potencial atividade biológica dos compostos é essencial para prever sua confiabilidade como candidatos terapêuticos. A avaliação detalhada de parâmetros como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME-T) por meio de plataformas *online* fornece uma base sólida para compreender o comportamento desses compostos no organismo (Ranjith, et al, 2019) e modifica-las para que melhorem algum parâmetro interessante para

determinada condição de saúde. Esse tipo de análise é crítico e importante para o desenvolvimento do trabalho e a descoberta de novos fármacos, uma vez que limitações farmacocinéticas são uma das principais razões para o insucesso de candidatos a fármacos em fases avançadas de desenvolvimento clínico como no estudo de Mathialagan e colaboradores (2017) que há uma previsão da depuração renal pelo perfil farmacocinético para entender como ele seria eliminado pelo corpo humano (Mathilagan, et al, 2017).

A capacidade de absorção é um parâmetro essencial para avaliar a biodisponibilidade de compostos administrados por via oral. Nossos dados indicam que os compostos BR010016, BR010017, BR010031 e BR010034 apresentaram valores ideais de absorção gastrointestinal (GI), demonstrando alta absorção comparável ao controle positivo, a clomipramina. E em relação à permeabilidade Caco-2, nenhum composto atingiu níveis significativos, o que pode sugerir limitações em sua absorção em células intestinais. A solubilidade dos compostos também desempenha um papel crucial na absorção, pois afeta a dissolução no trato gastrointestinal. Todos os compostos apresentaram baixa solubilidade em água, o que pode limitar a biodisponibilidade, mas os valores de Log P para BR010033 e BR010034 estão dentro do intervalo ideal (menor que 5), o que sugere um balanço adequado entre lipofilia e hidrofilia, permitindo absorção sem alta retenção em tecidos lipídicos.

O volume de distribuição (VD) fornece uma medida da extensão da distribuição dos compostos pelos tecidos. O composto BR010023 e a clomipramina destacam-se com valores de VD elevados, indicando uma possível penetração e retenção em tecidos além do plasma, o que pode ser vantajoso para a ação em sítios específicos. Em termos de massa molar, todos os compostos ficaram entre 200 e 500 Da (dentro do ideal), exceto BR010033 e BR010035, que ultrapassaram esse limite, o que pode restringir sua distribuição eficaz e atravessamento de barreiras biológicas. A TPSA (Topological Polar Surface Area) e o número de ligações rotativas (nrotb) influenciam diretamente a permeabilidade dos compostos, especialmente em barreiras seletivas como a hematoencefálica. A clomipramina apresentou o TPSA ideal, favorecendo seu potencial de permeabilidade. A flexibilidade molecular também foi adequada em todos os compostos, exceto BR010033 e BR010035, que têm maior número de ligações rotativas, sugerindo menor probabilidade de atravessar essas barreiras.

Em relação à interação com as enzimas do citocromo P450 (CYP450), o composto BR010034 destacou-se por não inibir as sete isoformas principais, reduzindo o risco de interações medicamentosas. Essa característica é vantajosa para o desenvolvimento de um fármaco seguro, uma vez que a inibição de CYP450 pode interferir no metabolismo de outros medicamentos. Além disso, os compostos apresentaram clearance renal baixo, o que indica uma eliminação mais lenta via rins. Isso pode significar uma meia-vida mais longa no organismo, favorecendo o potencial terapêutico para ação prolongada, embora essa característica também possa aumentar o risco de acumulação em tratamentos de longo prazo.

Já sobre a toxicidade hepática, observou-se que os compostos BR010033, BR010034 e BR010035 são menos propensos a provocar hepatotoxicidade, uma vantagem importante na avaliação de segurança para candidatos a fármacos. Em contrapartida, a citotoxicidade foi mais alta para o composto BR010031. Já em termos de mutagenicidade, apenas o composto BR010034 apresentou risco, o que será importante monitorar em estudos adicionais.

A análise antiparasitária *in silico* dos compostos com base na plataforma PASS Online revelou que apenas o composto BR010033 apresentou atividade significativa contra parasitos, o que se alinha com a complexidade observada em estudos sobre o desenvolvimento de agentes antiparasitários. A literatura aponta que a eficácia antiparasitária envolve interações específicas com alvos críticos nos parasitos, como enzimas essenciais para o metabolismo e a replicação celular, além de considerações sobre a penetração e a estabilidade do composto no ambiente celular dos parasitos (RAMOS, et al, 2024). Esse fato de BR010033 ter demonstrado atividade pode estar relacionado a características estruturais que promovem uma interação eficiente. A clomipramina, utilizada como controle positivo, destaca-se na literatura como um composto com eficácia antiparasitária comprovada contra parasitos dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* cruzi devido à sua capacidade provocar estresse oxidativo e alterações estruturais nas mitocôndrias deles, levando à morte celular por uma via apoptótica, com um efeito seletivo contra parasitos e baixa toxicidade para as células do hospedeiro (RODRIGUES, et al, 2017).

A seletividade *in silico* dos compostos estudados frente a enzima do parasito (LaTR) em comparação a glutationa redutase humana (GSR) é uma análise essencial no desenvolvimento de novas terapias antiparasitárias, com o objetivo de reduzir a toxicidade em hospedeiros humanos. A baixa probabilidade de interação com a GSR,

conforme evidenciado na plataforma SwissTargetPrediction para o único composto BR010031 com resultado na plataforma, é um resultado interessante. Essa seletividade indica que o composto é mais propenso a interagir especificamente com a TR de *L. amazonensis*, reduzindo a probabilidade de efeitos colaterais que poderiam ocorrer pela inibição da GSR em células humanas. Na literatura, estudos relatam que inibidores de TR com alta especificidade para enzimas de patógenos e baixa interação com enzimas humanas são preferíveis para evitar efeitos adversos. Um estudo realizado por Jaishankar e colaboradores (2008) no desenvolvimento de inibidores seletivos da enzima cruzaína de *Trypanosoma cruzi,* foram utilizadas técnicas avançadas de planejamento de fármacos para obter compostos mais eficazes e menos tóxicos, com a seletividade sendo um fator chave para garantir sua segurança e eficácia terapêutica (Jaishankar et al., 2008, FUJI, et al 2018). A GSR é uma enzima crucial no sistema antioxidante humano, e sua inibição poderia causar um aumento no estresse oxidativo celular, prejudicando tecidos saudáveis (Stoll, et al, 1997). Assim, compostos que demonstram seletividade para LaTR sem afetar GSR, como observado para BR010031, apresentam uma vantagem significativa em termos de segurança e eficácia.

As análises *in vitro* ressaltaram a importância de avaliar compostos promissores *in silico* contra formas parasitárias reais de parasitos para validar seu potencial terapêutico. Durante os testes, os promastigotas foram incubados por 72 horas com os oito compostos selecionados, em concentrações variando de 128 µM a 2 µM. O composto BR010034 destacou-se com uma CI50 de 82,78 µM (R^2 = 0,9450). Adicionalmente, a curva dose-resposta para esse composto revelou que concentrações abaixo de 32 µM mantiveram a viabilidade celular próxima de 100% e que, a partir de 64 µM, observou-se uma redução acentuada na viabilidade celular de *L. amazonensis*, indicando uma atividade antiparasitária a partir dessa concentração. Um estudo interessante realizado por Saccoliti e colegas (2017) demonstrou atividade antiparasitária contra promastigotas de *L. infantum* de compostos sintéticos derivados de sulfeto de diaril com CI50 de 29,43 µM. Apesar de o composto apresentar uma potência inferior a fármacos já estabelecidos, como miltefosina (CI50 de 19,9 µM) (Trinconi et al., 2014), sua ação sugere um perfil de segurança interessante. Outros trabalhos, como o de Barrinuevo et al. (2023), que relatam CI50 de 0,30 µM para anfotericina B e 4,03 µM para clomipramina, reforçam a necessidade de equilíbrio entre potência e segurança no desenvolvimento de novos compostos. Nesse contexto,

embora BR010034 apresente uma CI50 maior que os fármacos conhecidos, sua baixa toxicidade em concentrações menores destaca seu potencial como um candidato promissor para futuras investigações em terapias antiparasitárias.

A atividade inibitória dos compostos frente à LaTR foi avaliada por ensaio cinético com exposição dos compostos (500 µM) por 1 hora. O composto BR010032 demonstrou o melhor desempenho, com uma redução significativa da atividade enzimática de 63,9%, indicando excelente inibição da enzima alvo. A dependência da concentração foi confirmada nos testes, onde concentrações superiores a 62,5 µM apresentaram inibição ($p < 0,05$). Esse comportamento é consistente com estudos anteriores, que relacionam a eficácia inibitória de compostos com sua concentração no ambiente de reação (Singh et al., 2016). Um estudo anterior avaliou o percentual de inibição enzimática do composto epigalocatequina-3-galato frente à TR de *L. braziliensis*. O estudo mostrou apenas 46% de inibição enzimática (INACIO, 2013). Já o estudo de Madia e colaboradores (2023) identificou uma inibição superior a 75% da TR de *L. infantum* quando testou compostos sintéticos derivados de aminopropanona. A análise da atividade inibitória dos compostos contra a TR de *Leishmania* representa um importante avanço no desenvolvimento de agentes antiparasitários, uma vez que a TR é fundamental para a sobrevivência do parasito no hospedeiro, atuando na manutenção do equilíbrio redox intracelular. Dessa forma, a inibição de TR pode levar ao acúmulo de radicais livres nos parasitos, o que compromete sua sobrevivência e proliferação (Wilkinson, et al, 2009). Por outro lado, o composto BR010032 apresentou bom desempenho no teste de inibição enzimática, mas não em promastigotas (resultados em fase de repetição). Esses resultados sugerem que esse composto pode não ter a capacidade de atravessar ou penetrar em membranas. A enzima TR está situada no citosol da célula do parasito e para que o composto atue inibindo a atividade da enzima é necessário que penetre em membranas biológicas. Nossos resultados do perfil farmacocinético *in silico* corroboram com isso, no qual mostraram valor de TPSA acima do desejável, indicando uma baixa capacidade em atravessar membranas biológicas. Estudos da relação estrutura-atividade do composto BR010032 devem ser realizados afim de modificar ou melhorar a estrutura química, sem perder a atividade biológica, para que o composto consiga chegar ao local alvo.

O uso de controles, incluindo negativo e veículo, assegurou a validade dos resultados, pois garantiu que as alterações na atividade enzimática fossem devidas

exclusivamente à ação dos compostos testados e não a interferências do solvente, por exemplo. Esse cuidado metodológico é essencial, como apontado por Piccirilo e colaboradores (2019), pois a variabilidade experimental pode impactar a interpretação dos dados sobre a eficácia dos compostos. Em síntese, o perfil inibitório de BR010032 contra a TR coloca-o como um candidato promissor para estudos posteriores, alinhando-se com a literatura que destaca a relevância de compostos que exibem seletividade pela TR, reduzindo também, a probabilidade de efeitos colaterais indesejados em células hospedeiras (Piccirio, et al, 2019).

Apesar do composto BR010034 mostrar interações *in silico* interessantes e uma inibição do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* (com CI50 satisfatório), não mostrou uma inibição enzimática desejável (inibição de 27,8%). Este fato pode ser explicado pelo possível mecanismo de ação do composto. Provavelmente, o composto BR010034 atua inibindo outra enzima ou atua em outra via metabólica que não a tripanotiona redutase. Mais estudos são necessários para determinar o real mecanismo de ação do composto.

Durante todos os experimentos *in vitro* realizados, foi observada a precipitação dos compostos BR010033 e BR010035. Um estudo realizado por Bretas (2013), que sintetizou esses compostos e os aplicou em testes *in vitro* contra diversos microrganismos, incluindo *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii*, *Candida albicans*, *Ca. tropicalis*, *Ca. krusei*, *Ca. parapsilosis* e *Paracoccidioides brasiliensis*, não relatou dificuldades semelhantes. Isso levanta a hipótese de que a precipitação observada possa estar relacionada a condições experimentais específicas no nosso estudo. Uma hipótese aventada é uma possível incompatibilidade desses compostos com os meios de cultura utilizados neste estudo, como o meio Schneider para promastigotas e o meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) para células de linhagem humana. Embora os compostos BR010033 e BR010035 tenham precipitado durante os ensaios, os controles negativo e veículo garantiram a ausência de interferências externas.

Apesar de algumas limitações experimentais, como precipitação de compostos durante os ensaios, os dados obtidos no presente estudo reforçam a relevância dos compostos derivados da L-glutamina e papulacandina D como candidatos para o desenvolvimento de novos agentes antiparasitários. Além disso, efeito encontrado aqui é comparável com o efeito de outros compostos sintéticos com ação

leishmanicida, onde a inibição é totalmente dependente da concentração e consequentemente um indicativo de um candidato a fármaco.

A avaliação da citotoxicidade in vitro de compostos promissores frente a células humanas é um passo fundamental na pesquisa de novos fármacos, pois permite determinar a segurança e a viabilidade desses compostos para o uso terapêutico. Segundo Anyasor e colaboradores (2019), é essencial analisar a resposta das células humanas a diferentes concentrações para identificar compostos que apresentem efeitos adversos mínimos nas dosagens previstas para o tratamento. No presente estudo, os compostos demonstraram baixa citotoxicidade frente a células de linhagem humana *in vitro*, com valores de CI50 superiores a 1.000 µM para os compostos BR010016 e BR010017, indicando que a viabilidade celular permaneceu elevada até as maiores concentrações testadas. Esse perfil é considerado ideal para que testes pré-clínicos sigam o fluxo normal (testes in vivo, por exemplo), pois sugere que esses compostos possuem um potencial terapêutico com risco mínimo de toxicidade em células humanas. Um estudo sugeriu que compostos com baixa citotoxicidade em concentrações terapêuticas têm maior probabilidade de sucesso em ensaios pré-clínicos e clínicos, tornando-os candidatos promissores (TILAOUI, et al, 2021).

Por outro lado, o composto BR010023 apresentou um CI50 de 168,7 µM, indicando citotoxicidade moderada. A literatura aponta que compostos com esse perfil podem ter sua aplicação limitada a concentrações mais baixas ou exigir ajustes na formulação caso se torne um fármaco promissor (PICCIRILLO, et al, 2018). Esse comportamento sugere que o composto poderia ser considerado para uso terapêutico, mas com precaução, especialmente em doses elevadas.

Já o composto BR010033, derivado da papulacandina D, apresentou uma citotoxicidade considerável, com um CI50 de 97,12 µM e teve uma redução significativa na viabilidade celular em concentrações a partir de 250 µM. Esse resultado pode restringir sua aplicabilidade clínica. Segundo Fontes e colaboradores (1997), modificações estruturais podem ser necessárias para reduzir a toxicidade, mantendo a eficácia terapêutica, como sugerem estudos em desenvolvimento de compostos para tratamento de câncer. A adaptação de compostos citotóxicos visa manter eficácia em dosagens seguras, geralmente ajustando ou otimizando interações moleculares para preservar atividades específicas, reduzindo efeitos

colaterais. Essa abordagem pode incluir mudanças nas ligações moleculares para minimizar a toxicidade, especialmente em fases pré-clínicas e clínicas, onde o perfil de segurança é fundamental para avanços futuros em estudos clínicos (FONTES, et al, 1997). Por fim, o composto BR010035, com CI50 de 232,3 µM, mostrou baixa citotoxicidade em concentrações mais altas, o que é desejável desde que o composto se mostre seguro em dosagens terapêuticas. De acordo com Soares (2008), compostos que não afetam significativamente a viabilidade celular em concentrações terapêuticas são considerados candidatos seguros (SOARES, et al, 2008).

3 CONCLUSÃO

Oito compostos derivados da L-glutamina e papulacandina D, provenientes da biblioteca pública BraCoLi, demonstraram ser promissores por meio de triagem virtual para atuar contra as diferentes condições da enzima tripanotiona redutase de *Leishmania amazonensis*. Quatro compostos (BR010016, BR010017, BR010031 e BR010034) mostraram potencial de serem bem absorvidos por via oral por meio de ensaios *in silico*. O composto BR010033 demonstrou potencial atividade biológica antiparasitária *in silico* contra *Leishmania*. Os compostos demonstraram ser seletivos *in silico* frente a enzima ortóloga glutationa redutase de *Homo sapiens*.

O composto BR010034 demonstrou melhor desempenho no ensaio de atividade inibitória de formas promastigotas de *L. amazonensis in vitro*, mostrando um CI50 de 82,78 µM. Entretanto, não mostrou boa atividade inibitória enzimática, podendo haver outro mecanismo de ação para a atividade anti-parasitária que não a inibição da LaTR. O composto BR010032 mostrou maior redução da atividade enzimática da LaTR *in vitro*, com inibição da atividade enzimática de 63,9%. Entretanto, não mostrou atividade satisfatória contra promastigotas, possivelmente devido sua característica de baixa permeabilidade em membranas biológicas. Os oito compostos testados não demonstraram ser tóxicos *in vitro* frente a células de linhagem humana de fibroblastos nas concentrações estudadas, com a maioria apresentando CI50 superior a 100 µM.

4 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como continuidade desse trabalho, finalizar os testes *in vitro* com promastigotas e com a enzima TR de três compostos adicionais da BraCoLi, além de expandir as análises para outras famílias químicas *in vitro*. Para os compostos que demonstraram atividade contra promastigotas, especialmente o BR010034, poderão ser realizados testes em formas amastigotas de *L. amazonensis*, visando avaliar sua eficácia contra a forma clinicamente relevante do parasito.

É importante investigar o mecanismo de ação alternativo do composto BR010032, bem como desenvolver modificações estruturais visando melhorar sua permeabilidade em membranas biológicas, mantendo sua capacidade de inibição da LaTR, através de estudos de química medicinal e relação estrutura-atividade.

Adicionalmente, pode-se investigar a atividade dos compostos contra outras espécies de *Leishmania* e diferentes cepas de *L. amazonensis*, expandindo assim o conhecimento sobre o espectro de ação desses compostos.

5 REFERÊNCIAS

Abadías-Granado, I., et al. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, v. 112, n. 7, p. 601-618, 2021.

Alves-Ferreira, Marcelo, et al. Abordagens genômicas, transcriptômicas e proteômicas aplicadas ao estudo de *Leishmania* spp. In: Título do livro. Leishmanioses do continente americano. 2014.

Andrade-Neto, Valter Viana, et al. Efficacy of spironolactone treatment in murine models of cutaneous and visceral leishmaniasis. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, e636265, 2021.

Andrei, C. *Da química medicinal à química combinatória e modelagem molecular: um curso prático*. 2. ed. São Paulo: Manole, 2012.

Anyasor, Godswill Nduka; Okanlawon, Azeezat Adenike; Ogunbiyi, Babafemi. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Justicia secunda Vahl* leaf extract using in vitro and in vivo inflammation models. *Clinical Phytoscience*, v. 5, p. 1-13, 2019.

Barrionuevo, C. N., et al. Efecto sinérgico de clomipramina y anfotericina sobre promastigotes de *Leishmania amazonensis*. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba*, v. 80, [ano não informado].

BATTISTA, Theo et al. Targeting trypanothione reductase, a key enzyme in the redox trypanosomatid metabolism, to develop new drugs against leishmaniasis and trypanosomiases. Molecules. 2020.

Beig, Mathias, et al. Trypanothione reductase: a target protein for a combined in vitro and in silico screening approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 6, e0003773, 2015.

Belloti, Célia Maia Fragoso. Eficácia terapêutica dos antiparasitários intestinais: revisão bibliográfica dos últimos 10 anos. [Trabalho acadêmico]. 2019.

Bona, Eliana Almeida Mira de, et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 81, p. 218-225, 2014.

Bootsma, Andrea N.; Doney, Analise C.; Wheeler, Steven E. Predicting the strength of stacking interactions between heterocycles and aromatic amino acid side chains. *Journal of the American Chemical Society*, v. 141, n. 28, p. 11027-11035, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública. [Brasília]: Ministério da Saúde, 22 jun. 2022. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svsa/notificacao-compulsoria/lista-nacional-de-notificacao-compulsoria-de-doencas-agravos-e-eventos-de-saude-publica. Acesso em: 21 nov. 2024.

Bretas, A. C. O. Síntese de inibidores potenciais de glicosamina-6-fosfato sintase e de (1,3)-β-D-glicana sintase e de análogos da neamina. 2013. 304 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

Brianez, L. R., et al. Volume gástrico residual após ingestão de maltodextrina e glutamina: estudo randomizado, duplo-cego, cruzado. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 51, n. 2, p. 123-127, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0004-28032014000200010. Acesso em: 21 nov. 2024.

Cáceres, Elena L.; Tudor, Matthew; Cheng, Alan C. Deep learning approaches in predicting ADMET properties. *Future Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 22, p. 1995-1999, 2020.

Carvalho, D. T. Síntese de derivados de D-galactose inibidores potenciais de interação lectina-carboidrato. 2008. 236 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

Carvalho, Livia Martins Veloso de, et al. Sporotrichoid leishmaniasis: a cross-sectional clinical, epidemiological and laboratory study in Rio de Janeiro State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 59, 2017.

Cer, Regina Z., et al. IC50-to-Ki: a web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. *Nucleic Acids Research*, v. 37, suppl. 2, p. W441-W445, 2009.

Chagas, Ana Flávia da Silva, et al. Estudo pré-clínico com complexos e nanopartículas metálicas para o tratamento da leishmaniose cutânea. 2021.

Chaudhari, Rajan, et al. Computational polypharmacology: a new paradigm for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 12, n. 3, p. 279-291, 2017.

Chen, Vincent B., et al. "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 66.1 (2010)

Compounds Using the PASS Online Web Resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, v. 50, n. 3, p. 444-457, 2014.

Conte, Federica, et al. Galactose in human metabolism, glycosylation and congenital metabolic diseases: time for a closer look. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1865, n. 8, p. 129898, 2021.

Costa, Natáli Tereza Capistrano. Análise *in silico* e *in vitro* do potencial leishmanicida de novos derivados sintéticos híbridos isoxazolinas de seis membros/tiazolidina-2,4-diona. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

Cruzat, Vinicius, et al. Glutamine: metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. *Nutrients*, v. 10, n. 11, p. 1564, 2018.

Cunha, V. L. S. Síntese de inibidores potenciais de fosfofrutoquinase de *Trypanosoma brucei* derivados de 2,5-anidro-D-manitol. 2015. 26 f. Projeto de Pesquisa (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

Da Luz, Rogério; Lima Junior, Emilton. Associação de glutamina e GLP-1 nos processos inflamatórios: revisão de escopo. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 15, p. e01101522335, 2021.

Da Silva, Adilson D., et al. Insights about resveratrol analogs against trypanothione reductase of *Leishmania braziliensis*: molecular modeling, computational docking and *in vitro* antileishmanial studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 37, n. 11, p. 2960-2969, 2019.

Daina, Antoine; Michielin, Olivier; Zoete, Vincent. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Research*, v. 47, supl. W1, p. W357-W364, 2019.

Daina, Antoine; Michielin, Olivier; Zoete, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017.

De Farias, Roberto Coelho, et al. Estudo comparativo entre metodologias para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana: uma revisão integrativa. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 9, p. 71398-71409, 2020.

De Freitas, Roberta Carvalho; Marcili, Arlei. Alterações cutâneas secundárias à infecção por *Leishmania sp.*: revisão de literatura. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 4, p. 19328-19346, 2020.

De Medeiros, Herbert Igor Rodrigues, et al. Planejamento racional de um candidato a fármaco: estudos *in silico*, síntese e elucidação estrutural. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 11, p. e77391110605, 2020.

De Oliveira, Renata B., et al. Arylfurans as potential *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 169-173, 2006.

De Sousa Oliveira, Romário, et al. Ocorrência da coinfecção leishmaniose tegumentar americana/HIV no estado do Maranhão. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 11, n. 11, p. e487, 2019.

De Souza, Thiago Belarmino. Síntese de análogos da papulacandina D por simplificação molecular e avaliação de sua atividade antifúngica. 2010. [Dissertação/Tese não especificada].

Díaz Hernández, María José. Estudio de la reacción de Hiyama y su aplicación a la síntesis de fármacos. 2023. [Dissertação/Tese não especificada].

Dos Santos, Valmore Henrique Pereira, et al. Biotransformation of hydroxychloroquine to evaluate the cytotoxicity of its metabolites and mimic mammalian metabolism. *Results in Chemistry*, v. 5, p. 100761, 2023.

Druzhilovskiy, D. S., et al. Computational platform Way2Drug: from the prediction of biological activity to drug repurposing. *Russian Chemical Bulletin*, v. 66, p. 1832-1841, 2017.

Eberhardt, J.; Santos-Martins, D.; Tillack, A. F.; Forli, S. Autodock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and Python bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 61, n. 8, p. 3891-3898, 2021. DOI: 10.1021/acs.jcim.1c00203.

Escobar, Taiane Acunha. Identificação molecular e avaliação clínica, bioquímica e hematológica em equinos e caninos com leishmaniose. 2019. [Dissertação/Tese não especificada].

Espada, Caroline R., et al. Identification of *Leishmania (Viannia)* species and clinical isolates of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from Brazil using PCR-RFLP of the heat-shock protein 70 gene reveals some unexpected observations. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 91, n. 4, p. 312-318, 2018.

Fan, Jiyu; Fu, Ailing; Zhang, Le. Progresso no acoplamento molecular. *Biologia Quantitativa*, v. 7, p. 83-89, 2019.

Faria e Silva, A. L. Síntese de potenciais inibidores do transportador de hexoses do *Plasmodium falciparum* (PfHT1) derivados de D-glicosamina. 2013. 26 f. Relatório técnico-científico final de iniciação científica (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

Ferreira, Leonardo L. G.; Andricopulo, Adriano D. ADMET modeling approaches in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 24, n. 5, p. 1157-1165, 2019.

Figueiredo, K. A., et al. Prospecção de alvos bioquímicos para estudo *in silico* na quimioterapia antileishmania. *Revista Virtual de Química*, v. 10, 2018.

Filimonov, D. A., et al. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, v. 50, p. 444-457, 2014.

Fischer, E. Influence of configuration on the action of enzymes. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, v. 27, p. 2985–2993, 1894.

Fonseca, N. C. Síntese e avaliação da atividade de potenciais inibidores de cisteíno proteases. 2013. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

Fontes, Ana Paula Soares; Almeida, Sérgio Gama de; Nader, Letícia de Andrade. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. *Química Nova*, v. 20, p. 398-406, 1997.

Franco, Lucas L., et al. Estudo da glicosilação do ciclo-hexanol com diferentes derivados de D-glicosamina e promotores de glicosilação pelo método de Koenigs-Knorr. Química Nova, v. 39, p. 9-13, 2016.

Fonseca, Myslene Soares da. Papel biológico da tripanotiona redutase na virulência de Leishmania infantum. Diss. 2021.

Fujii, Drielli Gomes Vital. Aplicação de planejamento baseado na estrutura do receptor na busca de inibidores de cisteíno-proteases parasitárias (cruzaína (*T. cruzi*) e PCB (Leishmanioses)). 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Furini, Júnior. Estratégias terapêuticas usando o ácido ursólico sobre infecções determinadas por tripanosomatídeos. 2016. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Galvis-Ovallos, Fredy, et al. Leishmanioses no Brasil: aspectos epidemiológicos, desafios e perspectivas. In: Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Protozoários. Rio Branco: Strictu Sensu, 2020. p. 227-252.

Gontijo, Bernardo; Carvalho, Maria de Lourdes Ribeiro de. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, p. 71-80, 2003.

Goodwin, L. G.; Page, J. E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochemical Journal*, v. 22, p. 236–240, 1943.

Guedes, I. A., et al. New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 3198, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-82410-1.

Guedes, I. A., et al. DockThor-VS: a free platform for receptor-ligand virtual screening. *Journal of Molecular Biology*, 2024, p. 168548. DOI: 10.1016/j.jmb.2024.168548.

Hefnawy, Aya, et al. Exploiting knowledge on *Leishmania* drug resistance to support the quest for new drugs. *Trends in Parasitology*, v. 33, n. 3, p. 162-174, 2017.

Holeček, Milan. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutrition & Metabolism*, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2018.

Houston, Douglas R.; Walkinshaw, Malcolm D. Consensus docking: improving the reliability of docking in a virtual screening context. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 53, n. 2, p. 384-390, 2013.

Hsu, Ju-Yu, et al. Divergence of trypanothione-dependent tryparedoxin cascade into cytosolic and mitochondrial pathways in arsenite-resistant variants of *Leishmania amazonensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 157, n. 2, p. 193-204, 2008.

Iatta, Roberta, et al. *Leishmania tarentolae* and *Leishmania infantum* in humans, dogs and cats in the Pelagie archipelago, southern Italy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 9, p. e0009817, 2021.

Ilari, A.; Fiorillo, A.; Genovese, I.; Colotti, G. An update on structural insights into the enzymes of the polyamine-trypanothione pathway: targets for new drugs against leishmaniasis. *Future Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 1, p. 61-77, 2017.

Ilari, Andrea, et al. A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: the X-ray structure of trypanothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. *Amino Acids*, v. 42, p. 803-811, 2012.

Inácio Filho, Job Domingos. Estudo do efeito da EGCG *in vitro* e *in vivo*, suas associações e mecanismo molecular de ação em *Leishmania infantum*. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Inácio, Job D. F., et al. Epigallocathechin-O-3-Gallate inhibits trypanothione reductase of *Leishmania infantum*, causing alterations in redox balance and leading to parasite death. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, p. 241, 2021.

Jain, K.; Jain, N. K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 23-24, p. 1272-1281, 2013.

Jaishankar, Priyadarshini, et al. Potency and selectivity of P2/P3-modified inhibitors of cysteine proteases from trypanosomes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 18, n. 2, p. 624-628, 2008.

Kim, Stephanie S.; Aprahamian, Melanie L.; Lindert, Steffen. Improving inverse docking target identification with Z-score selection. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 93, n. 6, p. 1105-1116, 2019.

Kirkham, S. G.; Samarasinghe, R. K. Glucosamine. *Journal of Orthopaedic Surgery*, v. 17, n. 1, p. 72-76, 2009.

Krauth-Siegel, Luise R.; Comini, Marcelo A.; Schlecker, Tanja. The trypanothione system. In: Peroxiredoxin Systems: Structures and Functions. [S.l.]: Springer, 2007. p. 231-251.

Krauth-Siegel, R. Luise; Inhoff, Oliver. Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. *Parasitology Research*, v. 90, p. S77-S85, 2003.

Lavorato, S. N. Planejamento racional por modelagem molecular, síntese e caracterização de glicosídeos com atividade inibitória potencial da acetilcolinesterase. 2012. 284 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

Laskowski R A, MacArthur M W, Moss D S, Thornton J M (1993). PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.*, **26**, 283-291.

Leandro, Carol Góis, et al. Efeito da L-glutamina sobre o perfil leucocitário e a função fagocítica de macrófagos de ratos estressados. *Revista de Nutrição*, v. 19, p. 437-444, 2006.

Lindoso, José Angelo Lauletta. Clinical diversity and treatment of visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 77, p. e1755, 2018.

Lounnas, V.; Ritschel, T.; Kelder, J.; McGuire, R.; Bywater, R. P.; Foloppe, N. Current progress in structure-based rational drug design marks a new mindset in drug discovery. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 5, p. 1–14, 2013.

Madia VN, Ialongo D, Patacchini E, Exertier C, Antonelli L, Colotti G, Messore A, Tudino V, Saccoliti F, Scipione L, Ilari A, Costi R, Di Santo R. Inhibition of *Leishmania infantum* Trypanothione Reductase by New Aminopropanone Derivatives Interacting with the NADPH Binding Site. *Molecules*, v.28, p. 338, 2023.

Mariné-Casadó, Roger, et al. Effects of the oral administration of glycosaminoglycans with or without native type II collagen on the articular cartilage transcriptome in an osteoarthritic-induced rabbit model. *Genes & Nutrition*, v. 19, n. 1, p. 19, 2024.

Markus, David Volfchuk, et al. Análise *in silico* de catepsina L-like de *Leishmania braziliensis*: busca de um novo alvo para o diagnóstico molecular. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 6, p. 33264-33274, 2020.

Martins, L. C. Síntese, ensaios *in vitro* e estudos computacionais de aminoquinolinas possíveis inibidoras da cruzaína e rodesaína. 2016. 217 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

Mathialagan, Sumathy, et al. Quantitative prediction of human renal clearance and drug-drug interactions of organic anion transporter substrates using *in vitro* transport data: a relative activity factor approach. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 45, n. 4, p. 409-417, 2017.

Mikovski, Daniele, et al. Química medicinal e a sua importância no desenvolvimento de novos fármacos. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, v. 12, n. 13, p. 29-43, 2018.

Mittal, M. K., et al. Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 76, n. 4, p. 681-688, 2007.

Morris, G. M.; Huey, R.; Olson, A. J. Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 24, n. 1, 2008. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1002/0471250953.bi0814s24. Acesso em: 21 nov. 2024.

Morris, G. M.; Lim-Wilby, M. Molecular docking. *Methods in Molecular Biology*, v. 443, p. 365–382, 2008.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

Ndjonka, D.; Rapado, L. N.; Silber, A. M.; Liebau, E.; Wrenger, C. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 2, p. 3395–3439, 2013.

Newsholme, Philip. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, post-injury, surgery or infection? *The Journal of Nutrition*, v. 131, n. 9, p. 2515S-2522S, 2001.

Oliveira, Mirella Castro. Avaliação hematológica de cães sororreagentes para *Leishmania spp* nos municípios de Manaus e Presidente Figueiredo. 2019. [Dissertação/Tese não especificada].

Oliveira, Renata B. de, et al. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotiona redutase. *Química Nova*, v. 31, p. 261-267, 2008.

Piccirillo, Erika; Amaral, Antonia Tavares do. Virtual screening of bioactive compounds: concepts and applications. *Química Nova*, v. 41, p. 662-677, 2018.

Pinheiro, Liliane Sena, et al. Biological effects of trans, trans-farnesol in *Leishmania amazonensis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 13, 2023.

Pinheiro, Cristian Vicson Gomes. "Atividade anti-Leishmania spp in silico e in vitro de oxadiazóis sintéticos." (2024).

Pires, Douglas E. V.; Blundell, Tom L.; Ascher, David B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015.

Pirolli, D., et al. Targeting SARS-CoV-2 spike protein/ACE2 protein-protein interactions: computational study. *Molecular Informatics*, v. 40, n. 6, p. e2060080, 2021. DOI: 10.1002/minf.202060080.

Porcino, Gabriane Nascimento. NTPDase 1 de *Leishmania braziliensis* como um alvo terapêutico: imunolocalização em formas promastigotas e amastigotas e susceptibilidade à leishmanicidas. 2016. [Dissertação/Tese não especificada].

Pradhan, Swetalina, et al. Treatment options for leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 47, n. 3, p. 516-521, 2022.

Ramos, Gabriela Silva. Planejamento racional por modelagem molecular e semissíntese de derivados cardenolídeos com potencial atividade citotóxica. 2021. [Dissertação/Tese não especificada].

Ramos-Soriano, Javier, et al. Probing the binding and antiparasitic efficacy of azobenzene G-quadruplex ligands to investigate G4 ligand design. *Chemical Communications*, v. 60, n. 81, p. 11520-11523, 2024.

Ranjith, D.; Ravikumar, C. SwissADME predictions of pharmacokinetics and drug-likeness properties of small molecules present in *Ipomoea mauritiana Jacq. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 8, n. 5, p. 2063-2073, 2019.

Rath, Susanne, et al. "Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte." *Química nova* 26 (2003): 550-555.

REIS, Flávia Mylla de Sousa. *Estudos de docking molecular entre terpenos e o receptor GABA-A na elucidação de seus mecanismos de ação anticonvulsivante*. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Biológicas, 2019.

Richardson, John L., et al. Improved tricyclic inhibitors of trypanothione reductase by screening and chemical synthesis. *ChemMedChem*, v. 4, n. 8, p. 1333-1340, 2009.

Rodrigues, Jean Henrique da Silva. Aspectos celulares e bioquímicos do mecanismo de ação do antidepressivo clomipramina em protozoários tripanosomatídeos. 2017. [Dissertação/Tese não especificada].

Rogero, Sizue Ota, et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, v. 6, p. 317-320, 2003.

Saccoliti F, Angiulli G, Pupo G, Pescatori L, Madia VN, Messore A, Colotti G, Fiorillo A, Scipione L, Gramiccia M, Di Muccio T, Di Santo R, Costi R, Ilari A. Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by diaryl sulfide derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medcinal Chemistry,* v. 32, p. 304-310, 2017.

Santiago, Alexandre Silva, Samuel Silva da Rocha Pita, and Elisalva Teixeira Guimarães. "Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual ea necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa." *Research, Society and Development* 10.7 (2021)

Salum, L. B.; Polikarpov, I.; Andricopulo, A. D. Structure-based approach for the study of estrogen receptor binding affinity and subtype selectivity. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 48, p. 2243–2253, 2008.

Santos, Lucianna H. S.; Ferreira, Rafaela S.; Caffarena, Ernesto R. Integrating docking molecular and molecular dynamics simulations. In: Docking Screens for Drug Discovery. [S.l.]: [Editora não informada], 2019. p. 13-34.

Serafim, Tiago D.; Iniguez, Eva; Oliveira, Fabiano. *Leishmania infantum*. *Trends in Parasitology*, v. 36, n. 1, p. 80-81, 2020.

Shaikh, Faraz, et al. LigTMap: Ligand and structure-based target identification and activity prediction for small molecules. 2020. [Artigo/Tese não especificada].

Silva, B. L. Síntese de galactosídeos de arila inibidores potenciais de trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi*. 2012. 169 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

Silva, Filipe Rodrigues de Oliveira. Planejamento de inibidores da enzima tripanotiona redutase utilizando ferramentas *in silico*. 2022. [Dissertação/Tese não especificada].

Silva, Gleice Rayanne, et al. Pharmacological properties of new chalcones for treatment of leishmaniasis: *in silico* and *in vitro* studies. 2023. [Artigo/Tese não especificada].

Silva, Lucicleide Ribeiro da; Ferreira, Márcia. Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. *Química Nova*, v. 26, p. 312-318, 2003.

Silva, Marivaldo Cavalcante da. Leishmaniose visceral: fatores determinantes e condicionantes de uma epidemia anunciada em Araguaína-TO. 2013. [Dissertação/Tese não especificada].

Silva, Taylon Felipe, et al. Phenotypical and genotypical differences among *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isolates that caused different clinical frames in humans and dogs: a systematic review. *Acta Tropica*, v. 221, p. 106018, 2021.

Simão, Joana Sofia Correia. Tratamento e prevenção da leishmaniose em cães domésticos (*Canis familiaris*): avaliação de diferentes cenários. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2018.

Singh, Kuldeep, et al. Recent advances in enzyme inhibition: a pharmacological review. *Current Enzyme Inhibition*, v. 20, n. 1, p. 2-19, 2024.

Soares, Paula Roberta Otaviano. Atividade antiproliferativa de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas em células de melanoma humano (*sk-mel-37*). 2008.

Souza, T. B. Planejamento, síntese e avaliação da atividade citotóxica e antitumoral de benzamidinas e arilguanidinas derivadas de carboidratos. 2014. 409 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

Stoll, V. S. et al. Glutathione reductase turned into trypanothione reductase: structural analysis of an engineered change in substrate specificity. Biochemistry, v. 36, n. 21, p. 6437-6447, 1997.

Suwitono, M. R.; Lizki, A. C. Docking study of Cyclomulberrin, Cyclomorusin and Engeletin into p50 NF-kβ Transcription Factor with AutoDock Vina. Journal of International Scholars Conference-Science & Engineering, v. 1, n. 4, 2016.

Hou, T. et al. ADME evaluation in drug discovery. 6. Can oral biavailability in humans be effectively predicted by simple molecular property-based rules? Journal of Chemical Information and Modeling, v. 47, n. 2, p. 460-463, 2007.

Taft, C. S.; Enderlin, C. S.; Selitrennikoff, C. P. A high throughput in vitro assay for fungal (1, 3) β-glucan synthase inhibitors. The Journal of Antibiotics, v. 47, n. 9, p. 1001-1009, 1994.

Tan, H. W. S.; Sim, A. Y. L.; Long, Y. C. Glutamine metabolism regulates autophagy-dependent mTORC1 reactivation during amino acid starvation. Nature Communications, v. 8, n. 1, p. 338, 2017.

Tilaoui, M.; Mouse, H. A.; Zyad, A. Update and new insights on future cancer drug candidates from plant-based alkaloids. Frontiers in Pharmacology, v. 12, p. 719694, 2021.

Tolomeu, H. V. Síntese de derivados glicosiltriazólicos de paclitaxel como potenciais antitumorais. 2018. 266 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituição, Cidade, 2018.

Toropova, M. A. Drug metabolism as an object of computational analysis by the Monte Carlo method. Current Drug Metabolism, v. 18, n. 12, p. 1123-1131, 2017.

Torres, P. H. M. et al. Key topics in molecular docking for drug design. International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.

Tovar, J. et al. Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in Leishmania by targeted replacement of the tryA gene locus. Molecular Microbiology, v. 29, p. 653, 1998.

Trinconi, C. T. et al. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 58, n. 5, p. 2608-2613, 2014.

Trott, O.; Olson, A. J. Autodock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Journal of Computational Chemistry, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

UNIPROT. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2025. Disponível em: https://www.uniprot.org/.

Varjão, B. M. et al. Spatial distribution of canine Leishmania infantum infection in a municipality with endemic human leishmaniasis in Eastern Bahia, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 30, 2021.

Vasconcelos, J. M. et al. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. RBAC, v. 50, n. 3, p. 221-227, 2018.

Veríssimo, G. C. et al. The Brazilian Compound Library (BraCoLi) Database: a Brazilian repository of chemical and biological information for drug design. 2021.

Wilkinson, S. R.; Kelly, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. Expert Reviews in Molecular Medicine, v. 11, p. e31, 2009.

APÊNDICE A

Quadro 9: Resultados do atracamento molecular dos compostos da biblioteca BraCoLi (n = 69) frente a LaTR na condição fechada.

Composto BraCoLi	Resultado por algoritmo						Resultado consenso	
	AutodockVina			DockThor				
	Afinidade média (Kcal/mol)	cKi médio	Zscore Médio Local	Afinidade média (Kcal/mol)	cKi médio	Zscore Médio Local	cKi Médio Global	Zscore Médio Global
BR01001	-5,9333	44,7515	0,7956	-7,2200	5,1011	-0,4609	24,9263	0,16733
BR01002	-6,2222	27,4820	0,5135	-6,1500	31,0446	0,5840	29,2633	0,54873
BR01003	-6,1889	29,0723	0,5460	-6,6010	14,5010	0,1436	21,7867	0,34479
BR01004	-6,2222	27,4820	0,5135	-6,1670	30,1665	0,5674	28,8243	0,54043
BR01005	-5,7000	66,3500	1,0235	-6,1410	31,5198	0,5928	48,9349	0,80812
BR01006	-5,8556	51,0286	0,8715	-6,4020	20,2893	0,3379	35,659	0,60472
BR01007	-6,2333	26,9715	0,5026	-6,4380	19,0932	0,3027	23,0323	0,40268
BR01008	-6,0444	37,0991	0,6871	-6,0020	39,8540	0,7285	38,4765	0,7078
BR01009	-5,8667	50,0807	0,8607	-6,5720	15,2285	0,1719	32,6546	0,51628
BR010010	-5,7444	61,5554	0,9801	-6,9700	7,7789	-0,2168	34,6671	0,38163
BR010011	-5,8000	56,0454	0,9258	-6,6550	13,2378	0,0908	34,6416	0,50831
BR010012	-5,6889	67,6059	1,0343	-6,5970	14,5993	0,1475	41,1026	0,59088
BR010013	-5,8222	53,9824	0,9041	-6,9680	7,8052	-0,2148	30,8938	0,34463
BR010014	-6,0111	39,2459	0,7196	-6,8900	8,9035	-0,1387	24,0747	0,29048

BR010015	-5,5333	87,9047	1,1862	-7,4800	3,2891	-0,7148	45,5969	0,23569
BR010016	-7,2667	4,7147	-0,5065	-6,4050	20,1869	0,3350	12,4508	-0,0858
BR010017	-6,7222	11,8180	0,0252	-6,9600	7,9113	-0,2070	9,86464	-0,0909
BR010018	-6,2667	25,4956	0,4701	-7,2310	5,0073	-0,4717	15,2515	-0,0008
BR010019	-8,2778	0,8557	-1,4939	-7,5950	2,7089	-0,8272	1,78226	-1,1605
BR010020	-6,1778	29,6226	0,5569	-7,7260	2,1715	-0,9551	15,8971	-0,1991
BR010021	-6,4444	18,8868	0,2965	-7,3530	4,0754	-0,5908	11,4811	-0,1472
BR010022	-7,4667	3,3640	-0,7018	-8,3540	0,7524	-1,5684	2,05818	-1,1351
BR010023	-7,6333	2,5392	-0,8646	-6,9160	8,5212	-0,1641	5,53018	-0,5143
BR010024	-5,1667	163,2215	1,5443	-7,4250	3,6091	-0,6611	83,4153	0,44158
BR010025	-5,2667	137,8721	1,4466	-6,5830	14,9483	0,1611	76,4102	0,80388
BR010026	-5,2000	154,2930	1,5117	-6,7920	10,5049	-0,0430	82,399	0,73439
BR010027	-5,6889	67,6059	1,0343	-6,6120	14,2343	0,1328	40,9201	0,58356
BR010028	-5,0111	212,2289	1,6962	-6,5160	16,7380	0,2266	114,483	0,96139
BR010029	-4,9889	220,3393	1,7179	-6,7060	12,1460	0,0410	116,243	0,87946
BR010030	-5,4556	100,2347	1,2622	-6,7530	11,2197	-0,0049	55,7272	0,62864
BR010031	-7,7111	2,2268	-0,9405	-6,4690	18,1199	0,2725	10,1733	-0,334
BR010032	-7,7111	2,2268	-0,9405	-8,1390	1,0815	-1,3584	1,65414	-1,1495
BR010033	-8,5222	0,5664	-1,7327	-7,4260	3,6030	-0,6621	2,0847	-1,1974
BR010034	-7,0778	6,4851	-0,3220	-9,0860	0,2187	-2,2832	3,35189	-1,3026

BR010035	-8,6889	0,4275	-1,8954	-7,3590	4,0344	-0,5967	2,23095	-1,246
BR010036	-8,1889	0,9942	-1,4071	-9,1070	0,2111	-2,3037	0,60263	-1,8554
BR010037	-7,4778	3,3015	-0,7127	-8,9680	0,2669	-2,1680	1,7842	-1,4403
BR010038	-4,8111	297,4449	1,8915	-9,3450	0,1413	-2,5362	148,793	-0,3223
BR010039	-5,2444	143,1434	1,4683	-5,9730	41,8533	0,7568	92,4983	1,11259
BR010040	-6,6667	12,9796	0,0794	-6,2900	24,5112	0,4473	18,7454	0,26335
BR010041	-5,6667	70,1895	1,0560	-7,5250	3,0486	-0,7588	36,619	0,1486
BR010042	-5,1889	157,2135	1,5226	-6,0580	36,2596	0,6738	96,7366	1,09821
BR010043	-7,2556	4,8040	-0,4957	-6,8800	9,0550	-0,1289	6,92948	-0,3123
BR010044	-5,0667	193,2317	1,6419	-7,4550	3,4309	-0,6904	98,3313	0,47576
BR010045	-4,8778	265,7889	1,8264	-6,8390	9,7038	-0,0889	137,746	0,86877
BR010046	-5,3111	127,9091	1,4032	-5,8720	49,6322	0,8555	88,7706	1,12936
BR010047	-6,4444	18,8868	0,2965	-6,7640	11,0133	-0,0156	14,9501	0,14042
BR010048	-6,2889	24,5572	0,4484	-7,1460	5,7797	-0,3887	15,1685	0,02984
BR010049	-6,5222	16,5632	0,2205	-7,0150	7,2100	-0,2607	11,8866	-0,0201
BR010050	-6,3444	22,3594	0,3941	-8,0990	1,1570	-1,3193	11,7582	-0,4626
BR010051	-5,9333	44,7515	0,7956	-7,0650	6,6265	-0,3096	25,689	0,24301
BR010052	-5,9889	40,7457	0,7413	-7,2740	4,6567	-0,5137	22,7012	0,11383
BR010053	-5,9556	43,1035	0,7739	-6,6220	13,9961	0,1231	28,5498	0,44847
BR010054	-5,4556	100,2347	1,2622	-7,2830	4,5865	-0,5225	52,4106	0,36985

BR010055	-6,1667	30,1833	0,5677	-7,3300	4,2368	-0,5684	17,21	-0,0003
BR010056	-6,1889	29,0723	0,5460	-7,0550	6,7393	-0,2998	17,9058	0,12311
BR010057	-6,0444	37,0991	0,6871	-7,3740	3,9335	-0,6113	20,5163	0,03788
BR010058	-5,5444	86,2717	1,1754	-7,1230	6,0085	-0,3662	46,1401	0,40458
BR010059	-5,4333	104,0670	1,2839	-5,9650	42,4222	0,7647	73,2446	1,02427
BR010060	-5,5222	89,5686	1,1971	-6,7070	12,1255	0,0400	50,847	0,61856
BR010061	-5,2444	143,1434	1,4683	-6,6130	14,2103	0,1318	78,6768	0,80009
BR010062	-6,0444	37,0991	0,6871	-6,5430	15,9924	0,2002	26,5457	0,44364
BR010063	-5,4778	96,5452	1,2405	-6,9090	8,6225	-0,1572	52,5838	0,54162
BR010064	-5,9889	40,7457	0,7413	-7,6650	2,4070	-0,8955	21,5763	-0,0771
BR010065	-5,7444	61,5554	0,9801	-7,0120	7,2466	-0,2578	34,401	0,36112
BR010066	-5,8778	49,1503	0,8498	-7,9970	1,3744	-1,2197	25,2624	-0,1849
BR010067	-5,2778	135,3109	1,4358	-7,9240	1,5546	-1,1484	68,4327	0,14367
BR010068	-6,1778	29,6226	0,5569	-9,1260	0,2044	-2,3223	14,9135	-0,8827
BR010069	-3,9444	1284,3538	2,7379	-7,6190	2,6013	-0,8506	643,478	0,94365
clomipramina	-7,4	3,76464	-0,6367	-6,9	8,75444	-0,1484	6,25954	-0,3926

APÊNDICE B

Quadro 10: Resultados do atracamento molecular dos compostos da biblioteca BraCoLi (n = 69) frente a LaTR na condição aberta.

Composto BraCoLi	Resultado por algoritmo						Resultado consenso	
	AutodockVina			DockThor				
	Afinidade média (Kcal/mol)	cKi médio	Zscore Médio Local	Afinidade média (Kcal/mol)	cKi médio	Zscore Médio Local	cKi Médio Global	Zscore Médio Global
BR01001	-6,6333	13,7309	0,8464	-7,4950	3,2069	0,0406	8,4689	0,4435
BR01002	-6,8333	9,7971	0,6594	-7,2960	4,4870	0,2267	7,1421	0,4430
BR01003	-7,0000	7,3948	0,5035	-7,0640	6,6377	0,4436	7,0162	0,4736
BR01004	-7,0333	6,9903	0,4723	-6,9420	8,1553	0,5577	7,5728	0,5150
BR01005	-6,6444	13,4759	0,8360	-6,9840	7,5972	0,5185	10,5366	0,6772
BR01006	-6,4667	18,1913	1,0023	-7,0600	6,6826	0,4474	12,4370	0,7248
BR01007	-6,9000	8,7544	0,5970	-7,0650	6,6265	0,4427	7,6905	0,5199
BR01008	-6,8333	9,7971	0,6594	-6,7750	10,8107	0,7139	10,3039	0,6866
BR01009	-6,1778	29,6226	1,2724	-7,2240	5,0668	0,2940	17,3447	0,7832
BR010010	-6,7667	10,9638	0,7217	-6,9760	7,7005	0,5259	9,3322	0,6238
BR010011	-6,6667	12,9796	0,8152	-6,7940	10,4695	0,6961	11,7246	0,7557
BR010012	-6,8222	9,9826	0,6698	-6,9840	7,5972	0,5185	8,7899	0,5941
BR010013	-6,6000	14,5255	0,8776	-7,1000	6,2464	0,4100	10,3859	0,6438
BR010014	-6,8667	9,2610	0,6282	-7,0900	6,3527	0,4193	7,8069	0,5238

BR010015	-6,0778	35,0691	1,3660	-7,4730	3,3282	0,0611	19,1987	0,7136
BR010016	-8,4333	0,6581	-0,8370	-6,7270	11,7230	0,7588	6,1906	-0,0391
BR010017	-8,4889	0,5992	-0,8889	-8,0160	1,3310	-0,4467	0,9651	-0,6678
BR010018	-8,6333	0,4695	-1,0240	-8,0950	1,1649	-0,5205	0,8172	-0,7723
BR010019	-8,2778	0,8557	-0,6915	-7,9170	1,5731	-0,3541	1,2144	-0,5228
BR010020	-8,6333	0,4695	-1,0240	-7,7490	2,0888	-0,1970	1,2792	-0,6105
BR010021	-8,4111	0,6832	-0,8162	-8,1900	0,9923	-0,6094	0,8378	-0,7128
BR010022	-8,4556	0,6339	-0,8577	-8,2120	0,9561	-0,6300	0,7950	-0,7439
BR010023	-8,5000	0,5880	-0,8993	-7,9060	1,6026	-0,3438	1,0953	-0,6215
BR010024	-5,5667	83,0947	1,8439	-7,6620	2,4192	-0,1156	42,7570	0,8642
BR010025	-6,1222	32,5349	1,3244	-6,6610	13,1044	0,8205	22,8197	1,0725
BR010026	-6,0111	39,2459	1,4283	-6,8640	9,3029	0,6307	24,2744	1,0295
BR010027	-6,4111	19,9797	1,0542	-6,7100	12,0643	0,7747	16,0220	0,9145
BR010028	-5,5667	83,0947	1,8439	-6,7590	11,1066	0,7289	47,1007	1,2864
BR010029	-5,6556	71,5181	1,7608	-6,8720	9,1781	0,6232	40,3481	1,1920
BR010030	-6,0111	39,2459	1,4283	-6,9290	8,3363	0,5699	23,7911	0,9991
BR010031	-8,3000	0,8242	-0,7123	-6,6300	13,8083	0,8495	7,3163	0,0686
BR010032	-8,3444	0,7646	-0,7538	-7,7530	2,0748	-0,2007	1,4197	-0,4773
BR010033	-9,5778	0,0954	-1,9072	-7,6150	2,6189	-0,0717	1,3572	-0,9894
BR010034	-8,4444	0,6459	-0,8473	-8,9950	0,2550	-1,3622	0,4504	-1,1048

BR010035	-9,1333	0,2019	-1,4916	-8,3270	0,7874	-0,7375	0,4947	-1,1146
BR010036	-9,0111	0,2482	-1,3773	-9,6300	0,0873	-1,9561	0,1677	-1,6667
BR010037	-8,6000	0,4967	-0,9928	-10,1220	0,0381	-2,4162	0,2674	-1,7045
BR010038	-5,3667	116,4596	2,0310	-9,6260	0,0879	-1,9523	58,2738	0,0393
BR010039	-6,4222	19,6086	1,0438	-7,2040	5,2408	0,3127	12,4247	0,6783
BR010040	-7,9111	1,5888	-0,3486	-6,9580	7,9381	0,5428	4,7634	0,0971
BR010041	-7,0667	6,6078	0,4411	-7,7770	1,9924	-0,2232	4,3001	0,1090
BR010042	-5,3111	127,9091	2,0829	-7,2650	4,7280	0,2557	66,3186	1,1693
BR010043	-7,2889	4,5412	0,2333	-7,4520	3,4483	0,0808	3,9947	0,1571
BR010044	-5,5222	89,5686	1,8855	-8,5110	0,5772	-0,9096	45,0729	0,4880
BR010045	-5,4222	106,0368	1,9790	-7,4220	3,6274	0,1088	54,8321	1,0439
BR010046	-5,6556	71,5181	1,7608	-6,8770	9,1010	0,6185	40,3095	1,1897
BR010047	-7,1778	5,4779	0,3372	-7,2570	4,7923	0,2632	5,1351	0,3002
BR010048	-7,7444	2,1050	-0,1927	-7,5830	2,7643	-0,0417	2,4346	-0,1172
BR010049	-7,3333	4,2130	0,1918	-8,0460	1,2653	-0,4747	2,7392	-0,1415
BR010050	-7,2444	4,8950	0,2749	-8,2800	0,8525	-0,6936	2,8737	-0,2093
BR010051	-7,1556	5,6872	0,3580	-7,5480	2,9325	-0,0090	4,3099	0,1745
BR010052	-7,2000	5,2763	0,3165	-8,1070	1,1415	-0,5318	3,2089	-0,1077

BR010053	-7,4111	3,6947	0,1190	-7,6160	2,6145	-0,0726	3,1546	0,0232
BR010054	-6,9333	8,2756	0,5658	-7,5770	2,7924	-0,0361	5,5340	0,2649
BR010055	-6,7222	11,8180	0,7633	-7,5170	3,0900	0,0200	7,4540	0,3916
BR010056	-6,6444	13,4759	0,8360	-7,2460	4,8821	0,2734	9,1790	0,5547
BR010057	-6,7778	10,7601	0,7113	-7,2560	4,8004	0,2641	7,7803	0,4877
BR010058	-6,2444	26,4704	1,2101	-7,5140	3,1057	0,0228	14,7881	0,6165
BR010059	-6,3111	23,6533	1,1477	-6,9420	8,1553	0,5577	15,9043	0,8527
BR010060	-5,7889	57,1063	1,6361	-7,1170	6,0697	0,3941	31,5880	1,0151
BR010061	-6,2889	24,5572	1,1685	-7,0920	6,3313	0,4175	15,4442	0,7930
BR010062	-7,4000	3,7646	0,1294	-7,2880	4,5480	0,2342	4,1563	0,1818
BR010063	-6,2556	25,9782	1,1997	-8,0570	1,2420	-0,4850	13,6101	0,3573
BR010064	-6,4000	20,3579	1,0646	-8,9800	0,2616	-1,3482	10,3097	-0,1418
BR010065	-6,5444	15,9536	0,9295	-8,1230	1,1111	-0,5467	8,5323	0,1914
BR010066	-6,8667	9,2610	0,6282	-8,9100	0,2944	-1,2827	4,7777	-0,3273
BR010067	-6,6111	14,2557	0,8672	-9,4640	0,1156	-1,8008	7,1856	-0,4668
BR010068	-6,8778	9,0890	0,6178	-8,7940	0,3580	-1,1743	4,7235	-0,2782
BR010069	-4,5000	502,8674	2,8415	-9,7090	0,0764	-2,0300	251,4719	0,4058
clomipramina	-8,1334	1,09178	-0,5565	-7,9	1,61889	-0,3382	1,35533	-0,4473

APÊNDICE C

Quadro 11: Resultados do atracamento molecular dos compostos da biblioteca BraCoLi (n = 69) frente a LaTR na condição 2/3.

Composto BraCoLi	Resultado por algoritmo						Resultado consenso	
	AutodockVina			DockThor				
	Afinidade média (Kcal/mol)	cKi médio	Zscore Médio Local	Afinidade média (Kcal/mol)	cKi médio	Zscore Médio Local	cKi Médio Global	Zscore Médio Global
BR01001	-6,0778	35,0691	0,8588	-6,469	18,1199	0,4525	26,5945	0,6556
BR01002	-6,3667	21,5360	0,5588	-6,15	31,0446	0,7837	26,2903	0,6713
BR01003	-6,2333	26,9715	0,6972	-6,601	14,501	0,3154	20,7362	0,5063
BR01004	-6,4444	18,8868	0,4780	-6,167	30,1665	0,7661	24,5267	0,6221
BR01005	-6,2778	25,0220	0,6511	-6,141	31,5198	0,7931	28,2709	0,7221
BR01006	-6,2889	24,5572	0,6395	-6,402	20,2893	0,5220	22,4233	0,5808
BR01007	-6,3333	22,7826	0,5934	-6,438	19,0932	0,4847	20,9379	0,5390
BR01008	-6,2333	26,9715	0,6972	-6,002	39,854	0,9374	33,4127	0,8174
BR01009	-6,1333	31,9305	0,8011	-6,572	15,2285	0,3455	23,5795	0,5733
BR010010	-6,4111	19,9797	0,5126	-6,97	7,77889	-0,0678	13,8793	0,2224
BR010011	-6,5111	16,8768	0,4088	-6,655	13,2378	0,2593	15,0573	0,3341
BR010012	-6,1444	31,3373	0,7896	-6,597	14,5993	0,3195	22,9683	0,5546
BR010013	-6,2556	25,9782	0,6742	-6,968	7,8052	-0,0657	16,8917	0,3042

BR010014	-6,8778	9,0890	0,0280	-6,89	8,90346	0,0153	8,9962	0,0217
BR010015	-5,6333	74,2525	1,3203	-7,48	3,28914	-0,5974	38,7708	0,3615
BR010016	-7,9333	1,5303	-1,0682	-6,405	20,1869	0,5189	10,8586	-0,2746
BR010017	-7,6444	2,4920	-0,7682	-6,96	7,9113	-0,0574	5,2016	-0,4128
BR010018	-7,8556	1,7450	-0,9874	-7,231	5,00728	-0,3388	3,3761	-0,6631
BR010019	-7,6000	2,6861	-0,7220	-7,595	2,70886	-0,7168	2,6975	-0,7194
BR010020	-7,9222	1,5593	-1,0566	-7,726	2,17151	-0,8529	1,8654	-0,9547
BR010021	-7,4333	3,5587	-0,5489	-7,353	4,07544	-0,4655	3,8171	-0,5072
BR010022	-6,9444	8,1218	-0,0412	-8,354	0,75237	-1,505	4,4371	-0,7731
BR010023	-7,4000	3,7646	-0,5143	-6,916	8,52119	-0,0117	6,1429	-0,2630
BR010024	-5,1111	179,2683	1,8626	-7,425	3,60909	-0,5403	91,4387	0,6612
BR010025	-5,7222	63,9078	1,2280	-6,583	14,9483	0,3341	39,4280	0,7811
BR010026	-5,8000	56,0454	1,1472	-6,792	10,5049	0,1170	33,2752	0,6322
BR010027	-5,6444	72,8731	1,3088	-6,612	14,2343	0,3040	43,5537	0,8064
BR010028	-5,3222	125,5329	1,6434	-6,516	16,738	0,4037	71,1355	1,0236
BR010029	-5,1556	166,3111	1,8165	-6,706	12,146	0,2063	89,2285	1,0114
BR010030	-5,5556	84,6676	1,4011	-6,753	11,2197	0,1575	47,9436	0,7793
BR010031	-7,8222	1,8460	-0,9528	-6,469	18,1199	0,4525	9,9830	-0,2501
BR010032	-7,8111	1,8809	-0,9412	-8,139	1,0815	-1,2817	1,4812	-1,1115
BR010033	-8,3556	0,7504	-1,5066	-7,426	3,6030	-0,5413	2,1767	-1,0240

BR010034	-7,6111	2,6362	-0,7335	-9,086	0,21871	-2,2652	1,4275	-1,4994
BR010035	-9,3667	0,1362	-2,5567	-7,359	4,0343	-0,4717	2,0853	-1,5142
BR010036	-8,6889	0,4275	-1,8528	-9,107	0,2110	-2,287	0,3193	-2,0699
BR010037	-8,6000	0,4967	-1,7605	-8,968	0,2669	-2,1426	0,3818	-1,9516
BR010038	-4,8444	281,1741	2,1396	-9,345	0,1412	-2,5342	140,6577	-0,1973
BR010039	-5,5222	89,5686	1,4357	-5,973	41,8533	0,9675	65,7109	1,2017
BR010040	-7,0889	6,3646	-0,1912	-6,29	24,5112	0,6384	15,4379	0,2236
BR010041	-6,9222	8,4322	-0,0182	-7,525	3,0485	-0,6441	5,7404	-0,3311
BR010042	-5,5556	84,6676	1,4011	-6,058	36,2596	0,8793	60,4636	1,1402
BR010043	-7,3222	4,2928	-0,4335	-6,88	9,0550	0,0256	6,6739	-0,2039
BR010044	-5,9222	45,5986	1,0203	-7,455	3,4309	-0,5714	24,5147	0,2244
BR010045	-5,5556	84,6676	1,4011	-6,839	9,7038	0,0682	47,1857	0,7347
BR010046	-5,9111	46,4617	1,0319	-5,872	49,6322	1,0724	48,0469	1,0522
BR010047	-7,0222	7,1226	-0,1220	-6,764	11,0133	0,1461	9,0680	0,0121
BR010048	-7,3333	4,2130	-0,4451	-7,146	5,77974	-0,2505	4,9964	-0,3478
BR010049	-7,5333	3,0060	-0,6528	-7,015	7,2099	-0,1145	5,1080	-0,3836
BR010050	-6,7889	10,5602	0,1203	-8,099	1,1570	-1,2402	5,8586	-0,5600
BR010051	-6,9667	7,8227	-0,0643	-7,065	6,6264	-0,1664	7,2246	-0,1154
BR010052	-7,3111	4,3740	-0,4220	-7,274	4,6567	-0,3835	4,5154	-0,4027
BR010053	-6,9556	7,9708	-0,0528	-6,622	13,9961	0,29362	10,9834	0,1204

BR010054	-7,1222	6,0164	-0,2258	-7,283	4,5865	-0,3928	5,3015	-0,3093
BR010055	-7,3778	3,9085	-0,4912	-7,33	4,2367	-0,4416	4,0726	-0,4664
BR010056	-7,1222	6,0164	-0,2258	-7,055	6,7392	-0,156	6,3778	-0,1909
BR010057	-6,7778	10,7601	0,1318	-7,374	3,9335	-0,4873	7,3468	-0,1777
BR010058	-6,0778	35,0691	0,8588	-7,123	6,0085	-0,2267	20,5388	0,3161
BR010059	-6,1000	33,7782	0,8357	-5,965	42,4222	0,9759	38,1002	0,9058
BR010060	-6,1000	33,7782	0,8357	-6,707	12,1255	0,2053	22,9519	0,5205
BR010061	-6,0111	39,2459	0,9280	-6,613	14,2103	0,3029	26,7281	0,6155
BR010062	-6,9000	8,7544	0,0049	-6,543	15,9924	0,3756	12,3734	0,1903
BR010063	-5,5556	84,6676	1,4011	-6,909	8,6224	-0,0044	46,6450	0,6983
BR010064	-5,4333	104,0670	1,5280	-7,665	2,407	-0,7895	53,2370	0,3693
BR010065	-5,4556	100,2347	1,5049	-7,012	7,24655	-0,1114	53,7406	0,6968
BR010066	-5,6333	74,2525	1,3203	-7,997	1,37441	-1,1343	37,8134	0,0930
BR010067	-6,2667	25,4956	0,6626	-7,924	1,55463	-1,0585	13,5251	-0,1979
BR010068	-6,0556	36,4093	0,8819	-9,126	0,20443	-2,3067	18,3068	-0,7124
BR010069	-4,4667	531,9670	2,5319	-7,619	2,60132	-0,7417	267,2842	0,8951
clomipramina	-6,8	10,3641	0,10877	-6,55	15,8046	0,3683	13,0843	0,2385

APÊNDICE D

Quadro 12: Resultados do atracamento molecular dos compostos da biblioteca BraCoLi frente a LaTR na condição 5.

Composto BraCoLi	Resultado por algoritmo						Resultado consenso	
	AutodockVina			DockThor				
	Afinidade média (Kcal/mol)	cKi médio	Zscore Médio Local	Afinidade média (Kcal/mol)	cKi médio	Zscore Médio Local	cKi Médio Global	Zscore Médio Global
BR01001	-5,7778	58,1872	1,2712	-6,2260	27,3072	0,8691	42,7472	1,07017
BR01002	-6,2556	25,9782	0,8426	-7,4940	3,2123	-0,2684	14,5953	0,28711
BR01003	-6,2444	26,4704	0,8526	-7,3830	3,8742	-0,1688	15,1723	0,34189
BR01004	-6,4444	18,8868	0,6732	-7,1500	5,7408	0,0402	12,3138	0,35669
BR01005	-6,2444	26,4704	0,8526	-7,5220	3,0641	-0,2935	14,7672	0,27954
BR01006	-6,4000	20,3579	0,7130	-7,8420	1,7854	-0,5806	11,0717	0,06623
BR01007	-6,1556	30,7547	0,9323	-7,6380	2,5192	-0,3976	16,6369	0,26738
BR01008	-6,1000	33,7782	0,9822	-7,3320	4,2225	-0,1231	19,0004	0,42955
BR01009	-6,3667	21,5360	0,7429	-7,2770	4,6332	-0,0737	13,0846	0,33461
BR010010	-6,4778	17,8534	0,6433	-6,9490	8,0596	0,2205	12,9565	0,43189
BR010011	-6,1556	30,7547	0,9323	-6,8840	8,9941	0,2788	19,8744	0,60558
BR010012	-6,0333	37,8013	1,0420	-6,8510	9,5092	0,3084	23,6553	0,6752
BR010013	-6,0556	36,4093	1,0220	-6,8810	9,0397	0,2815	22,7245	0,65178
BR010014	-6,3222	23,2139	0,7828	-6,9420	8,1553	0,2268	15,6846	0,50481

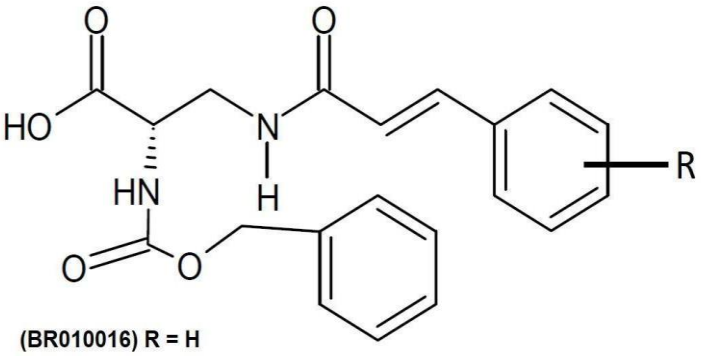
BR010015	-6,3222	23,2139	0,7828	-7,2540	4,8166	-0,0531	37,5031	0,6589
BR010016	-5,6667	70,1895	1,3709	-6,6300	13,8083	0,5067	7,91789	-0,0031
BR010017	-7,7667	2,0275	-0,5130	-7,2370	4,9568	-0,0378	4,50735	-0,091
BR010018	-7,3556	4,0579	-0,1442	-8,1300	1,0981	-0,8389	6,68383	-0,1975
BR010019	-6,7000	12,2696	0,4439	-7,7900	1,9492	-0,5339	5,60511	-0,1198
BR010020	-6,8667	9,2610	0,2944	-7,5360	2,9925	-0,3061	2,33663	-0,4594
BR010021	-7,8778	1,6808	-0,6127	-8,1430	1,0742	-0,8506	2,89447	-0,4575
BR010022	-7,2667	4,7147	-0,0644	-8,1430	1,0742	-0,8506	1,37749	-0,7316
BR010023	-7,8778	1,6808	-0,6127	-7,9110	1,5891	-0,6425	2,67688	-0,4133
BR010024	-7,4000	3,7646	-0,1841	-7,4420	3,5070	-0,2217	125,045	0,9085
BR010025	-4,9222	246,5823	2,0387	-7,0790	6,4717	0,1039	39,6724	0,74737
BR010026	-5,6444	72,8731	1,3908	-7,2630	4,7440	-0,0612	43,1475	0,69474
BR010027	-5,5778	81,5510	1,4506	-7,1410	5,8287	0,0483	49,4101	0,78435
BR010028	-5,5000	92,9915	1,5204	-7,2150	5,1443	-0,0181	88,907	0,91562
BR010029	-5,1333	172,6696	1,8493	-7,2430	4,9069	-0,0432	118,998	0,9828
BR010030	-4,9556	233,0898	2,0088	-7,4310	3,5727	-0,2119	51,9037	0,6742
BR010031	-5,4556	100,2347	1,5603	-7,0920	6,3313	0,0922	4,17936	-0,2104
BR010032	-7,7667	2,0275	-0,5130	-7,3780	3,9071	-0,1643	6,85209	0,07999
BR010033	-6,8333	9,7971	0,3243	-7,4640	3,3792	-0,2415	2,07189	-0,6364
BR010034	-8,3444	0,7646	-1,0313	-9,3120	0,1494	-1,8993	1,25249	-1,1663

BR010035	-7,6778	2,3556	-0,4332	-8,3400	0,7704	-1,0273	0,62893	-1,1489
BR010036	-8,6111	0,4875	-1,2705	-9,4320	0,1220	-2,0069	0,19225	-1,8032
BR010037	-9,8444	0,0608	-2,3769	-9,945	0,05131	-2,4671	0,05606	-2,422
BR010038	-4,7778	314,6573	2,1683	-11,3770	0,0046	-3,7517	157,331	-0,7917
BR010039	-5,4111	108,0439	1,6001	-7,3040	4,4268	-0,0979	56,2354	0,75111
BR010040	-7,1222	6,0164	0,0651	-7,3060	4,4119	-0,0997	5,21417	-0,0173
BR010041	-6,7778	10,7601	0,3741	-8,0200	1,3221	-0,7402	6,0411	-0,1831
BR010042	-5,6111	77,0900	1,4207	-7,5510	2,9177	-0,3195	40,0039	0,55061
BR010043	-7,1111	6,1303	0,0751	-6,6120	14,2343	0,5228	10,1823	0,29898
BR010044	-5,6222	75,6580	1,4108	-7,5710	2,8208	-0,3375	39,2394	0,53665
BR010045	-5,5111	91,2640	1,5104	-6,7060	12,1460	0,4385	51,705	0,97448
BR010046	-6,0667	35,7329	1,0121	-7,0120	7,2466	0,1640	21,4897	0,58804
BR010047	-6,9333	8,2756	0,2346	-7,3420	4,1518	-0,1320	6,21369	0,05128
BR010048	-7,1222	6,0164	0,0651	-7,8270	1,8312	-0,5671	3,9238	-0,251
BR010049	-7,4889	3,2402	-0,2638	-8,1900	0,9923	-0,8927	2,11623	-0,5783
BR010050	-6,7444	11,3830	0,4040	-8,6260	0,4754	-1,2839	5,92918	-0,4399
BR010051	-6,9333	8,2756	0,2346	-8,3150	0,8036	-1,0049	4,53956	-0,3851
BR010052	-7,2444	4,8950	-0,0445	-7,8600	1,7320	-0,5967	3,31347	-0,3206
BR010053	-6,8222	9,9826	0,3343	-8,2840	0,8467	-0,9771	5,41465	-0,3214
BR010054	-6,5889	14,8005	0,5436	-7,8430	1,7824	-0,5815	8,29142	-0,0189

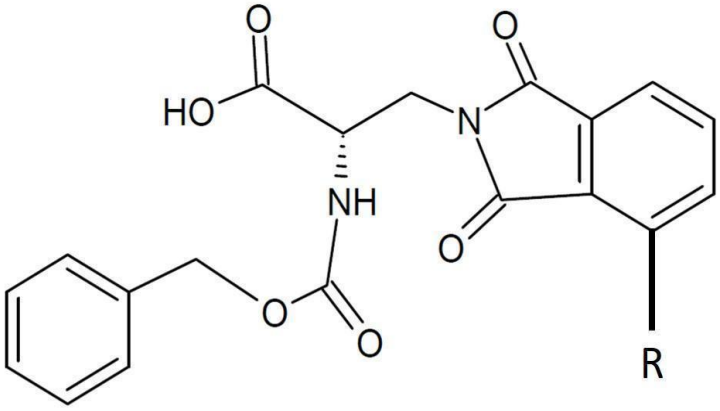
BR010055	-6,9778	7,6774	0,1947	-7,5890	2,7364	-0,3536	5,20692	-0,0794
BR010056	-6,9556	7,9708	0,2146	-7,4390	3,5248	-0,2190	5,74781	-0,0022
BR010057	-6,7444	11,3830	0,4040	-7,8040	1,9037	-0,5465	6,64331	-0,0712
BR010058	-6,0000	39,9888	1,0719	-7,7340	2,1424	-0,4837	21,0656	0,29409
BR010059	-6,1222	32,5349	0,9622	-7,2830	4,5865	-0,0791	18,5607	0,44156
BR010060	-5,9111	46,4617	1,1516	-7,2460	4,8821	-0,0459	25,6719	0,55285
BR010061	-6,5111	16,8768	0,6134	-7,2030	5,2496	-0,0073	11,0632	0,30301
BR010062	-6,9222	8,4322	0,2446	-7,3200	4,3089	-0,1123	6,37054	0,06614
BR010063	-5,5333	87,9047	1,4905	-8,4530	0,6366	-1,1287	44,2706	0,18091
BR010064	-5,6778	68,8856	1,3609	-8,0520	1,2526	-0,7689	35,0691	0,29599
BR010065	-5,0556	196,8893	1,9191	-8,2620	0,8788	-0,9573	98,8841	0,48088
BR010066	-5,8556	51,0286	1,2014	-8,4230	0,6697	-1,1018	25,8491	0,04984
BR010067	-5,4556	100,2347	1,5603	-7,0730	6,5376	0,1093	53,3861	0,83478
BR010068	-6,0889	34,4176	0,9921	-8,3250	0,7901	-1,0139	17,6039	-0,0109
BR010069	-4,2889	718,1237	2,6069	-8,8050	0,3514	-1,4445	359,238	0,58121
clomipramina	-6,6	14,5255	0,53361	-6,9	8,75444	0,26449	11,64	0,39905

APÊNDICE E

Figura 17: Estrutura química dos compostos derivados da L-glutamina selecionados para os testes *in vitro*



(BR010016) R = H
(BR010017) R= 4-COOCH $_3$
(BR010023) R = 2-NO $_2$

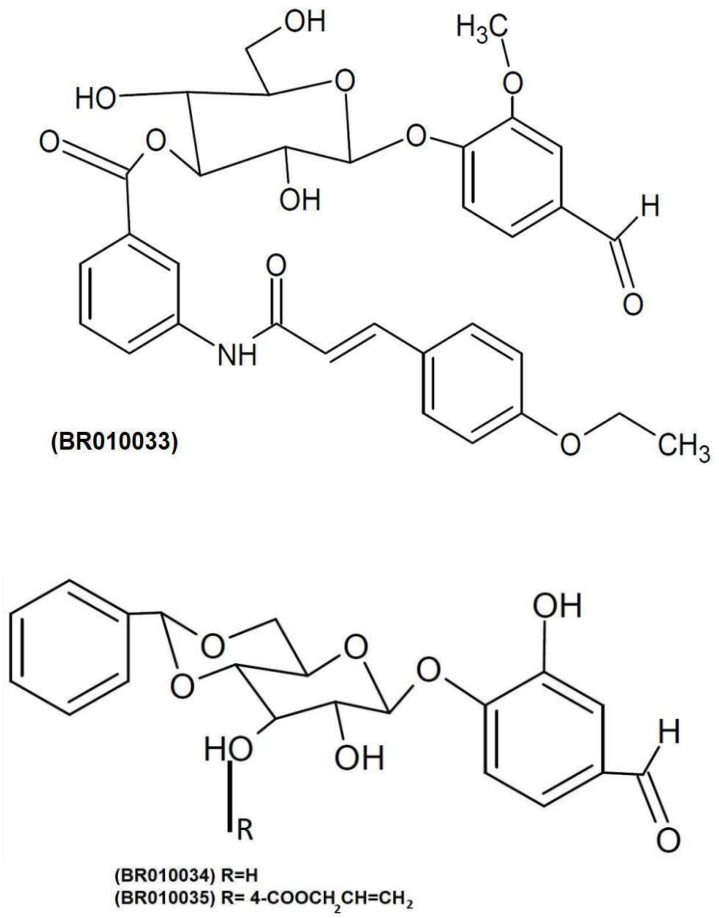


(BR010031) R=H
(BR010032) R=NO $_2$

Fonte: Autoria própria (2024).

APÊNDICE F

Figura 18: Estrutura química dos compostos derivados da papulacandina D selecionados para os testes *in vitro*



Fonte: Autoria própria (2024).