



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KAIO MACIEL DE SANTIAGO SILVA

**TRIAGEM VIRTUAL NA PROTEASE PRINCIPAL DE SARS-  
COV-2 E AVALIAÇÃO DE 4,8-DIMETOXINAFTALENIL  
CHALCONAS FRENTE A *LEISHMANIA AMAZONENSIS***

---

Londrina  
2023

KAIO MACIEL DE SANTIAGO SILVA

**TRIAGEM VIRTUAL NA PROTEASE PRINCIPAL DE SARS-COV-2 E AVALIAÇÃO DE 4,8-DIMETOXINAFTALENIL CHALCONAS FRENTE A *LEISHMANIA AMAZONENSIS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Área de concentração Química Orgânica, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química.

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo (UEL).

**Coorientador:** Prof. Dr. Camilo Henrique da Silva Lima (UFRJ).

Londrina  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

de Santiago-Silva, Kaio Maciel .

Triagem virtual na protease principal de SARS-CoV-2 e avaliação de 4,8-dimetoxinaftalenil chalconas frente a *Leishmania amazonensis* / Kaio Maciel de Santiago-Silva. - Londrina, 2023.  
166 f. : il.

Coorientador: Camilo Henrique da Silva Lima.Orientador: Marcelle de Lima Ferreira Bispo.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Descoberta de novas substâncias bioativas para o tratamento de doenças emergentes e negligenciadas, como a COVID-19 e a leishmaniose - . 2. Dinâmica Molecular - . 3. Docking molecular - . I. Bispo, Marcelle de Lima Ferreira. II. Lima, Camilo Henrique da Silva. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

KAIO MACIEL DE SANTIAGO SILVA

**TRIAGEM VIRTUAL NA PROTEASE PRINCIPAL DE SARS-COV-2 E AVALIAÇÃO DE 4,8-DIMETOXINAFTALENIL CHALCONAS FRENTE A *LEISHMANIA AMAZONENSIS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Área de concentração Química Orgânica, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo.  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Camilo Henrique da Silva Lima  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Magaly Girão Albuquerque  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

---

Prof. Dr. José Celestino de Barros Neto  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Carolina Rennó Sodero  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Milena Menegazzo Miranda Sapla  
Universidade do Vale do Itajaí

Londrina, 30 de março de 2023.

## **AGRADECIMENTOS**

Desejo expressar os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

Em primeiro lugar a minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Marcelle Bispo, por me permitir fazer parte do seu grupo de trabalho e, ter acreditado na minha capacidade. Agradeço pela orientação impecável, disponibilidade mesmo em período de férias, pelos ensinamentos, pelas críticas construtivas, pela paciência, pela amizade, pela confiança, pela compreensão e palavras amigas nos momentos difíceis nunca permitindo que o desalento se instalasse, mesmo quando as coisas não corriam bem e acima de tudo pelo incentivo e encorajamento na superação de meus limites.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Camilo Henrique da Silva Lima pela paciência, amizade, disponibilidade e pelos ensinamentos na parte de modelagem e dinâmica molecular. Seu incentivo nesses anos finais, foram fundamentais para a conclusão desta tese.

Agradeço, de igual forma a Dra. Bruna Bortoleti, por compartilhar seus conhecimentos, pela paciência e apoio constante durante todo o desenvolvimento do segundo capítulo deste trabalho e acima de tudo pela amizade.

Aos professores Dr. Alexandre, Dra. Carla e Dra. Anna Paola que convivi durante esses anos, quero de uma forma imensa, expressar o meu muito obrigado pelos conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos do LaSMMed em especial Marcieli Fabris, Priscila Goes de Camargo e Gabriel Felix da Silva Gomes, quero agradecer-lhes pelas conversas, preocupação e pelos bons momentos, os quais tornaram a caminhada mais leve,

Ao Laboratório de Imunoparasitologia de Doenças Negligenciadas e Câncer da Universidade Estadual de Londrina (UEL), aos professores Dra Ivete Costa e Dr. Wander Pavanelli, por disponibilizar o laboratório e os materiais fundamentais para o desenvolvimento e conclusão do segundo capítulo desta tese.

À minha família, meu porto seguro, meus pais Lazara Eli e Silvio Alves pelo amor, carinho, incentivo, compreensão e ajuda financeira em tempos difíceis. Em especial minha mãe por ser minha fortaleza, a vocês meus infinitos agradecimentos.

A minha irmã Gabrielle, minha joia rara.

E, finalmente agradeço a todos que de forma direta e indireta contribuíram para o desenvolvimento e conclusão da presente tese.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.

**Isaac Newton**

## RESUMO

SANTIAGO-SILVA, Kaio Maciel de. **Triagem virtual de quimioteca frente a M<sup>pro</sup> de SARS-CoV-2 e avaliação *in vitro* e *in silico* de 4,8-dimetoxinaftalenil chalconas frente a *L. amazonensis***. 2023. p. 166f. Defesa de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

A descoberta de novas substâncias bioativas para o tratamento de doenças emergentes e negligenciadas, como a COVID-19 e a leishmaniose, é urgente devido à escassez de opções terapêuticas. Portanto, visando identificar candidatos anti-COVID-19, utilizou-se técnicas *in silico* como triagem virtual, *docking* molecular e dinâmica molecular frente a protease principal (M<sup>pro</sup>) de SARS-CoV-2, considerando uma quimioteca contendo 313 estruturas de diferentes classes químicas. Em paralelo, derivados contendo a porção chalcona foram avaliadas por meio de ensaios *in vitro* contra diferentes formas morfológicas do protozoário *Leishmania amazonensis* e estudos *in silico* utilizando a técnica de *docking* molecular frente aos alvos arginase (ARG) e a tripanotiona redutase (TR). Assim sendo, a presente tese é dividida em dois capítulos distintos. No **capítulo I**, a triagem virtual foi realizada através do estudo de *docking* molecular considerando duas estruturas cristalográficas da M<sup>pro</sup>, onde após média das energias de ligação, foi possível selecionar quatro potenciais inibidores (**LMed-136**, **LMed-137**, **LMed-110** e **LMed-117**). Posteriormente, estudos de simulações de Dinâmica Molecular (DM) por 150 nanossegundos (ns) revelaram que os compostos **LMed-136** e **LMed-110** possuem maior afinidade pelo sítio ativo da M<sup>pro</sup> ( $-23,62 \pm 2,60$  e  $-28,06 \pm 2,65$ , respectivamente) e os compostos **LMed-137** e **LMed-117** tendem a deixar o sítio ativo. Além disso, observou-se que os resíduos Thr26, His41, Asn142, His164, Glu166 e Gln189 realizam ligações de hidrogênio importantes para a estabilidade dos complexos durante o tempo de simulação avaliado. Finalmente, a previsão do perfil ADME sugeriu que o **LMed-136** possui características semelhantes a fármacos e boas propriedades farmacocinéticas. Portanto, a partir do presente estudo, pode-se inferir que essa substância pode ser uma possível inibidora da M<sup>pro</sup> de SARS-CoV-2, porém são necessários estudos *in vitro* para investigar suas propriedades antivirais. No **capítulo II**, uma série de nove derivados de chalcona apresentaram valores de concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) após 24h de tratamento frente as formas promastigotas de *L. amazonensis* de  $3,3 \pm 0,34$  –  $264,1 \pm 0,12$   $\mu$ M e de citotoxicidade em células de macrófagos murinos entre  $126,8 \pm 0,09$  –  $872,3 \pm 0,133$   $\mu$ M. A chalcona **1f** foi identificada como a mais promissora em termos de atividade e índice de seletividade (112,6), sendo 1,5 vezes mais seletiva do que anfotericina B (73,17). Estudos *in vitro* evidenciaram que **1f** induziu diversas alterações morfológicas e ultraestruturais nas formas promastigotas livres, bem como a perda da integridade da membrana plasmática e aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO). Em formas intracelulares, a substância **1f** apresentou CI<sub>50</sub> de  $18,5 \pm 1,19$   $\mu$ M. Para o estudo *in silico* de *docking* molecular foram selecionados os alvos arginase (ARG) e a tripanotiona redutase (TR) que são essenciais para o crescimento e sobrevivência de parasita. O composto **1f** teve mais interações por ligação de hidrogênio com a enzima ARG, indicando a formação de um complexo proteína-ligante mais estável. A previsão ADME sugeriu que **1f** possui alta biodisponibilidade oral e absorção intestinal. Estudos em modelos *in vivo* são necessários para confirmar esse composto como potencial agente antileishmania.

**Palavras-chave:** 3CL<sup>pro</sup>, Coronavirus, COVID-19, Dinâmica molecular, *Docking* molecular, doenças negligenciadas, Tripanosomatídeos.

## ABSTRACT

SANTIAGO-SILVA, Kaio Maciel de. **Chemotheque virtual screening against M<sup>pro</sup> of SARS-CoV-2 and *in vitro* and *in silico* evaluation of 4,8-dimethoxynaphthalenyl chalcones against *L. amazonensis***. 2023. p. 166f. Doctoral Thesis (Doctorate in Chemistry) – Exact Sciences Center, Department of Chemistry, State University of Londrina, Londrina, 2023.

The discovery of new bioactive substances for the treatment of emerging and neglected diseases, such as COVID-19 and leishmaniasis, is urgent due to the lack of therapeutic options. Therefore, to identify anti-COVID-19 candidates in this work, *in silico* techniques such as virtual screening, molecular docking, and molecular dynamics against the main protease (M<sup>pro</sup>) of SARS-CoV-2 were applied, considering a chemotheque containing 313 structures from different classes of chemical compounds. In parallel, derivatives containing the chalcone moiety were evaluated through *in vitro* assays using various forms of *Leishmania amazonensis* and *in silico* studies by molecular docking technique against arginase (ARG) and trypanothione reductase (TR), essential targets for the growth and survival of the parasite. Thus, this thesis is divided into two distinct chapters. In **Chapter I**, the virtual screening was performed through the study of molecular docking considering two M<sup>pro</sup> crystallographic structures. From the average binding energies, it was possible to select four potential inhibitors (**LMed-136**, **LMed-137**, **LMed-110**, and **LMed-117**). Subsequently, studies of Molecular Dynamics (DM) simulations revealed that the compounds **LMed-136** and **LMed-110** have a greater affinity for the active site ( $-23.62 \pm 2.60$  and  $-28.06 \pm 2.65$ , respectively) and **LMed-137** and **LMed-117** compounds tend to leave the active site. In addition, it was observed that residues Thr26, His41, Asn142, His164, Glu166, and Gln189 perform important hydrogen bonds for the stability of the complexes during the evaluated simulation time. Finally, the prediction of the ADME profile suggested that **LMed-136** has drug-like characteristics and good pharmacokinetic properties. Therefore, from the present study, it can be inferred that this substance may be a possible M<sup>pro</sup> inhibitor of SARS-CoV-2, but *in vitro* studies are needed to investigate its antiviral properties. In **Chapter II**, a series of nine chalcone derivatives showed IC<sub>50</sub> values against *L. amazonensis* promastigotes from  $3.3 \pm 0.34 - 264.1 \pm 0.12$   $\mu\text{M}$  and cytotoxicity in murine macrophages between  $126.8 \pm 0, 09 - 872.3 \pm 0.133$   $\mu\text{M}$ . Chalcone **1f** was identified as the most promising in terms of activity and selectivity index (112.6), being 1.5 times more selective than amphotericin B (73.17). *In vitro* studies showed that **1f** induced several morphological and ultrastructural changes in free promastigotes, loss of plasmatic membrane integrity, and an increase in reactive oxygen species (ROS). In amastigotes, substance **1f** had an IC<sub>50</sub> of  $18.5 \pm 1.19$   $\mu\text{M}$ . For the study of molecular docking *in silico* with targets ARG and TR, the compound **1f** had more hydrogen bonding interactions with the ARG enzyme, indicating the formation of a more stable protein-ligand complex. The ADME prediction suggests that **1f** has high oral bioavailability and intestinal absorption. Studies *in vivo* models are needed to confirm this compound as a potential antileishmanial agent.

**Keywords:** 3CL<sup>pro</sup>, Coronavirus, COVID-19, Molecular dynamics, Molecular docking, neglected diseases, Trypanosomatids.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura I.1:</b> Representação esquemática da estrutura do SARS-CoV-2 com um RNA de fita simples de sentido positivo (+ssRNA) e suas glicoproteínas estruturais S, M, E e N.....	16
<b>Figura I.2:</b> Antivirais aprovados para o tratamento da COVID-19.....	19
<b>Figura I.3:</b> Demais opções terapêuticas disponíveis para tratamento de COVID-19 autorizadas pela WHO. ....	20
<b>Figura I.4:</b> Genoma do coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2).....	21
<b>Figura I.5:</b> Estrutura tridimensional do homodímero de M <sup>pro</sup> de SARS-CoV-2 obtido por difração de raios-X. ....	23
<b>Figura I.6:</b> Abordagens aplicadas na descoberta de fármacos auxiliada por computador (CADD) e suas principais ferramentas. ....	26
<b>Figura I.7:</b> Diversidade estrutural da quimioteca do LaSMMed.....	33
<b>Figura I.8:</b> Identificação da classe de benzoiltioureas, benzoilguanidinas e benzoilureias (em vermelho, com isosterismo representado em azul) pertencentes à nossa quimioteca e ilustração do potencial antiviral dessas classes descrito na literatura. ....	34
<b>Figura I.9:</b> Identificação da classe das cumarinas (em vermelho) pertencentes à nossa quimioteca e ilustração do potencial antiviral da mesma descrito na literatura. ....	35
<b>Figura I.10:</b> Identificação da classe dos indóis (em vermelho) pertencentes à nossa quimioteca e ilustração do potencial antiviral da mesma descrito na literatura. ....	36
<b>Figura I.11:</b> Identificação da classe de hidantoínas e tioidantoínas (em vermelho, com isosterismo representado em azul) pertencentes à nossa quimioteca e ilustração do potencial antiviral dessas classes descrito na literatura. ....	37
<b>Figura I.12:</b> Identificação das classes de oxazolidinonas e tiazolidinonas (em vermelho, com isosterismo representado em azul e com o grupo sulfonamida evidenciado em rosa) pertencentes à nossa quimioteca e ilustração do potencial antiviral dessas classes descrito na literatura. ....	38
<b>Figura I.13:</b> Identificação dos ésteres de carvacrol (em vermelho) pertencentes à nossa quimioteca e ilustração do potencial antiviral dessas classes descrito na literatura. ....	39

<b>Figura I.14:</b> Planejamento para a triagem virtual da quimioteca do LaSMMed Chemical Library (LMCL). .....	42
<b>Figura I.15:</b> Inibidores complexados com o protômero A da M <sup>pro</sup> de SARS-CoV-2 identificados como <b>N3 (6LU7)</b> e <b>13b (6Y2F)</b> . .....	43
<b>Figura I.16:</b> Variação de resíduos nos subsítios S1, S1', S2 e S4 da M <sup>pro</sup> do SARS-CoV-2 .....	45
<b>Figura I.17:</b> Validação do protocolo de docking molecular pelo método de redocking. ....	46
<b>Figura I.18:</b> Modo de ligação e interações moleculares das quatro melhores benzoilguanidinas com a M <sup>pro</sup> ( <b>6LU7</b> e <b>6Y2F</b> ) .....	50
<b>Figura I.19:</b> Gráfico de RMSD dos átomos C $\alpha$ do protômero A da M <sup>pro</sup> . .....	51
<b>Figura I.20:</b> Gráfico de RMSD dos átomos C $\alpha$ da M <sup>pro</sup> em complexo com a <b>LMed-136</b> (linha preta), <b>LMed-137</b> (linha vermelha), <b>LMed-110</b> (linha verde) e <b>LMed-117</b> (linha azul), durante o tempo de simulação de DM de 150 ns. ....	53
<b>Figura I.21:</b> Gráfico de RMSF dos átomos C $\alpha$ da M <sup>pro</sup> em complexo com a <b>LMed-136</b> (linha preta), <b>LMed-137</b> (linha vermelha), <b>LMed-110</b> (linha verde) e <b>LMed-117</b> (linha azul), durante o tempo de simulação de DM de 150 ns. ....	54
<b>Figura I.22:</b> Os modos de ligação representativo a partir da análise de cluster e interações de ligação de hidrogênio com tempos de vida mais longos (tempo de vida > 5,00%). .....	56

## CAPÍTULO II

<b>Figura II.1:</b> Ciclo biológico completo do protozoário parasita <i>Leishmania</i> spp. ....	70
<b>Figura II.2:</b> Fármacos disponíveis para tratamento de leishmaniose. ....	72
<b>Figura II.3:</b> Estrutura geral das chalconas. ....	74
<b>Figura II.4:</b> Algumas chalconas naturais e suas atividades biológicas comuns. ....	75
<b>Figura II.5:</b> Alguns derivados sintéticos de chalconas e suas atividades biológicas contra <i>Leishmania</i> . ....	76
<b>Figura II.6:</b> Representação cristalográfica da estrutura trimérica de <i>L. mexicana</i> ARG (PDB ID 4ITY) .....	77
<b>Figura II.7:</b> Esquema representativo do metabolismo de poliaminas em <i>Leishmania</i> spp: da arginina à tripanotiona. ....	79
<b>Figura II.8:</b> Representação cristalográfica da estrutura dimérica de <i>L. infantum</i> TR	

<b>(PDB ID 4ADW)</b> .....	82
<b>Figura II.9:</b> Derivados de chalconas ( <b>IV – VIII</b> ) e suas atividades inibitórias e biológicas contra <i>Leishmania</i> spp, frente a TR. ....	85
<b>Figura II.10:</b> A abordagem do planejamento experimental para a avaliação da atividade antileishmania de derivados de 4,8-dimetoxinaftalenil chalcona ( <b>1a–i</b> ). ....	88
<b>Figura II.11:</b> Efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e produção de ERO induzida pelo tratamento com <b>1f</b> .....	93
<b>Figura II.12:</b> Alterações morfológicas em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com $CI_{50}$ 3,3 $\mu$ M e $2 \times CI_{50}$ 6,6 $\mu$ M de <b>1f</b> por 24 h, analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	95
<b>Figura II.13:</b> Alterações ultraestruturais em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com $CI_{50}$ 3,3 $\mu$ M e $2 \times CI_{50}$ 6,6 $\mu$ M de <b>1f</b> por 24 h, analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). ....	96
<b>Figura II.14.</b> Efeito da chalcona <b>1f</b> em macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> . Macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> foram tratados por 24 h com 10, 25, 50 e 130 $\mu$ M. ....	98
<b>Figura II.15:</b> Derivados sintéticos de chalconas e suas atividades biológicas contra formas amastigotas de <i>Leishmania</i> .....	99
<b>Figura II.16:</b> Análise das interações proteína-ligante <b>ARG–1f</b> . ....	104
<b>Figura II.17:</b> Análise das interações proteína-ligante <b>TR–1f</b> .....	106

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela I.1:</b> Funções das proteínas não estruturais (nsp) do SARS-CoV-2 (RAJ, 2021; YADAV et al., 2021). .....	22
<b>Tabela I.2:</b> Identificação dos quatro subsítios e seus respectivos resíduos de aminoácidos que formam o sítio de ligação do substrato da M <sup>Pro</sup> . .....	44
<b>Tabela I.3:</b> Estruturas e energia de ligação média prevista para as quatro benzoilguanidinas selecionadas na triagem virtual .....	47
<b>Tabela I.4:</b> Energia livre de ligação ( $\Delta G_{\text{binding}}$ ) para complexos M <sup>Pro</sup> -ligantes. ....	57
<b>Tabela I.5:</b> Previsão <i>in silico</i> de propriedades físico-químicas relacionadas à fármaco-similaridade (Regras de Lipinski e extensão de Veber), e propriedades farmacocinéticas. ....	59

### CAPÍTULO II

<b>Tabela II.1:</b> Inibição de LiARG, atividades biológicas em <i>L. infantum</i> nas formas promastigotas (CI <sub>50-Pro</sub> ) e amastigotas (CI <sub>50-ama</sub> ) e índices de seletividade (IS) das chalconas I – III, relatada por Garcia e colaboradores. ....	81
<b>Tabela II.2:</b> Atividade antileishmania <i>in vitro</i> contra formas promastigotas (CI <sub>50</sub> ), citotoxicidade (CC <sub>50</sub> ) e índices de seletividade (IS). .....	89
<b>Tabela II.3.</b> Previsão <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas (Regra 5 de Lipinski e extensão de Veber), farmacocinética e toxicidade do <b>1f</b> .....	100

## LISTA DE ESQUEMAS

### CAPÍTULO I

**Esquema I-1:** Mecanismo catalítico da M<sup>pro</sup> na clivagem das poliproteínas virais pp1a e pp1ab. ....24

### CAPÍTULO II

**Esquema II.1:** Mecanismo catalítico da arginase de *L. mexicana*. ....78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
AmB	Anfotericina B
ARG	Arginase
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
CIM	Concentração inibitória mínima
COVID-19	Doença coronavírus 2019, do inglês <i>coronavirus disease 2019</i>
DM	Dinâmica Molecular
ERG	Grupo doador de elétrons, do inglês <i>Electron Donating Group</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EWG	Grupo retirador de elétrons, do inglês <i>Electron Withdrawing Group</i>
FDA	Food and Drug Administration
IL-6	Interleucina 6
IS	Índice de seletividade
JAK	Janus quinase
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
MERS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
M <sup>pro</sup>	Protease Principal
OMS	Organização Mundial da Saúde
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic acid</i>
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
TR	Tripanotona redutase

## SUMÁRIO

PREFÁCIO .....	14
----------------	----

### CAPÍTULO I

#### ABORDAGEM *IN SILICO* PARA DESCOBRIR POTENCIAIS INIBIDORES DA PROTEASE PRINCIPAL (M<sup>PRO</sup>) DE SARS-COV-2

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 COVID-19 .....	15
1.2 PROTEASE PRINCIPAL (M <sup>PRO</sup> ) .....	21
1.3 MÉTODOS COMPUTACIONAIS NO DESENHO DE FÁRMACOS.....	25
1.3.1 <i>Docking molecular</i> .....	27
1.3.2 <i>Simulações de dinâmica molecular (DM)</i> .....	30
1.4 QUIMIOTECA DO LASMMED .....	32
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>41</b>
3.1 SELEÇÃO DAS ESTRUTURAS 3D DA M <sup>PRO</sup> E IDENTIFICAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO .....	42
3.2 VALIDAÇÃO DO ESTUDO DE DOCKING MOLECULAR .....	46
3.3 TRIAGEM VIRTUAL DA QUIMIOTECA DO LASMMED FRENTE A PROTEASE PRINCIPAL (M <sup>PRO</sup> ) DE SARS-COV-2 .....	46
3.4 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR (DM) .....	51
3.5 PREVISÕES <i>IN SILICO</i> DE PARÂMETROS DE FÁRMACO-SIMILARIDADE E FARMACOCINÉTICOS (ADME) ...	58
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
4.1 SELEÇÃO E PREPARO DA ESTRUTURA PROTEICA E PREPARAÇÃO DOS LIGANTES N3 E 13B. ....	63
4.2 QUIMIOTECA DO LASMMED .....	63
4.3 VALIDAÇÃO E TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM <i>DOCKING</i> MOLECULAR .....	63
4.4 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR .....	64
4.5 PREVISÕES <i>IN SILICO</i> DE PARÂMETROS DE FÁRMACO-SIMILARIDADE E FARMACOCINÉTICOS (ADME) ...	65
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>

### CAPÍTULO II

#### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE 4,8-DIMETOXINAFTALENIL CHALCONAS

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>68</b>
1.1 LEISHMANIOSE .....	68
1.2 CHALCONAS: DEFINIÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CHALCONAS NATURAIS E SINTÉTICAS .....	73
1.3 ARGINASE (ARG) .....	76
1.4 TRIPANOTONA REDUTASE (TR) .....	81
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>86</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	86
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	86

<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>87</b>
3.1	CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA <i>IN VITRO</i> DOS DERIVADOS DE 4,8-DIMETOXINAFTALENIL CHALCONA ( <b>1A-1</b> ) .....	87
3.2	MECANISMO DE AÇÃO EM PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> .....	91
3.3	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS EM PROMASTIGOTAS.....	93
3.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA EM <i>L. AMAZONENSIS</i> - FORMAS AMASTIGOTAS INTRACELULARES.....	97
3.5	ESTUDO <i>IN SILICO</i> PARA PREVER PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS E DE TOXICIDADE PREVISÃO DE ADME .....	99
3.6	<i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	102
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>107</b>
4.1	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.....	107
4.1.1	<i>Manutenção das formas promastigotas de Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	107
4.1.2	<i>Efeito das substâncias em promastigotas de L. amazonensis</i> .....	107
4.1.3	<i>Avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos</i> .....	108
4.1.4	<i>Índice de Seletividade (SI)</i> .....	108
4.1.5	<i>Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial (<math>\Delta\Psi_m</math>)</i> .....	108
4.1.6	<i>Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) em formas promastigotas de L. amazonensis</i> .....	109
4.1.7	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i> .....	109
4.1.8	<i>Ensaio Antiamastigotas</i> .....	110
4.1.9	<i>Análise Estatística</i> .....	110
4.2	PREVISÕES <i>IN SILICO</i> DE PARÂMETROS DE FÁRMACO-SIMILARIDADE E FARMACOCINÉTICOS (ADME).....	111
4.3	<i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	111
4.3.1	<i>Preparação de Proteínas e Ligantes</i> .....	111
4.3.2	<i>Docking Molecular de Consenso</i> .....	111
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>113</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>114</b>

## PREFÁCIO

Um programa de descoberta de novos fármacos é iniciado porque há uma doença ou condição clínica que não possui tratamentos adequados disponíveis, pois apresentam baixa eficácia, dificuldades de administração, alto custo ou elevada toxicidade, acarretando efeitos adversos graves, os quais dificultam ainda mais a adesão do paciente ao esquema terapêutico. Essas dificuldades são magnificadas no contexto de doenças emergentes ou negligenciadas, como é o caso da COVID-19 e da leishmaniose, que são os focos da presente Tese.

Diante deste contexto, este trabalho foi dividido em dois capítulos.

O **capítulo I** apresenta uma triagem virtual baseada em *docking molecular* para identificar possíveis inibidores de protease principal (M<sup>pro</sup>), proteína essencial na replicação viral do SARS-CoV-2, a partir de 313 estruturas presentes na quimioteca do Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais da Universidade Estadual de Londrina (LaSMMed – UEL). Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um artigo científico intitulado: “*In silico* approach identified benzoylguanidines as SARS-CoV-2 main protease (M<sup>pro</sup>) potential inhibitors” submetido e aceito para publicação na revista *Journal of Biomolecular Structure and Dynamic*, com fator de impacto 3.392 (2023).

O **capítulo II** relata a avaliação da citotoxicidade e da atividade antileishmania frente as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* de nove 4,8-dimetoxinaftalenil chalconas. Além disso, foram estudados, através de ensaios *in vitro*, possíveis mecanismos de ação da substância mais promissora, bem como foram realizadas simulações de *docking* molecular frente a duas enzimas essenciais para o crescimento e sobrevivência do parasito, a arginase e tripanotiona redutase. Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um artigo científico intitulado: “Antileishmanial activity of 4,8-dimethoxynaphthalenyl chalcones on *Leishmania amazonensis*” submetido e publicado na revista *Antibiotics*, com fator de impacto 5.222 (2023).

# CAPÍTULO I

## ABORDAGEM *IN SILICO* PARA IDENTIFICAR POTENCIAIS INIBIDORES DA PROTEASE PRINCIPAL (M<sup>PRO</sup>) DE SARS-COV-2

### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 COVID-19

As doenças emergentes apresentam fácil disseminação ou transmissão de pessoa para pessoa, adquirindo alta incidência ou alcance geográfico, sendo uma ameaça ou um fenômeno inesperado, resultando altas taxas de mortalidade e grande impacto na saúde pública (CONSIGLIO, 2008)

Nesse sentido, a doença do coronavírus 2019 (do inglês, *coronavirus disease 2019*, COVID-19), doença emergente, altamente infecciosa causada pelo novo coronavírus, denominado coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), provocou altos impactos em todos os setores da sociedade, principalmente nos sistemas de saúde, devido à sua rápida disseminação por todos os continentes e sua alta mortalidade (MASCARENHAS et al., 2020).

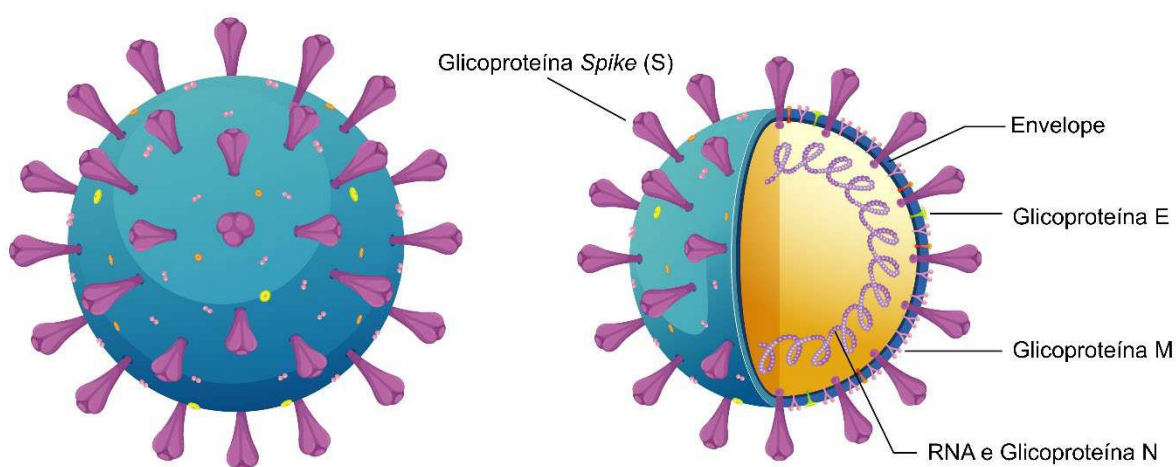
Esse vírus foi identificado pela primeira vez no trato respiratório de pacientes com pneumonia viral em Wuhan (Hubei, China), no final de 2019 (HUANG et al., 2020). Entretanto, já em 11 de março de 2020, a COVID-19 foi considerada como uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS), status que permanece até os dias atuais (março de 2023) (WHO, 2023a).

Assim, de acordo com o relatório de situação recém-atualizado da OMS em 10 de março de 2023, a pandemia de COVID-19 atingiu 759.408.703 casos confirmados e registrou 6.866.434 óbitos, conforme documentado globalmente em 223 países em todo o mundo (WHO, 2023a). Apenas no Brasil, na mesma data, foram registrados 37.085.520 casos confirmados e 699.310 óbitos (DATASUS, 2023).

O SARS-CoV-2 é um vírus pertencente ao gênero *Betacoronavirus*, família Coronaviridae e à ordem Nidovirales, com ampla distribuição em humanos e outros mamíferos (PAL et al., 2020). O tamanho do genoma do SARS-CoV-2 é de ~29,9 kb, compartilhando cerca de 82% de identidade de sequência com SARS-CoV e com o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV, do inglês, *Middle East Respiratory Syndrome coronavirus*), ambos também capazes de causar doenças

respiratórias graves em humanos (LU et al., 2020; NAQVI et al., 2020). Trata-se de um vírus contendo um genoma de RNA de sentido positivo (+ssRNA) não segmentado, de fita simples, envelopado com glicoproteínas conhecidas como proteínas *spike* (S), semelhantes a picos e expressas na superfície do vírus formando uma 'coroa' (**Figura I.1**) (CHUNG; THONE; KWON, 2021).

**Figura I.1:** Representação esquemática da estrutura do SARS-CoV-2 com um RNA de fita simples de sentido positivo (+ssRNA) e suas glicoproteínas estruturais S, M, E e N.



**Fonte:** Adaptado de Astuti e Ysrafil (ASTUTI; YSRAFIL, 2020).

Estruturalmente, além da proteína S, o SARS-CoV-2 possui mais três proteínas estruturais principais, sendo a glicoproteína de envelope (E), glicoproteína de membrana (M) e proteína nucleocapsídeo (N), além de várias proteínas acessórias (**Figura I.1**). A proteína S permite a ligação da partícula viral ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) encontrado em vários órgãos, como coração, pulmões, rins e trato gastrointestinal, facilitando assim a entrada viral nas células-alvo. A proteína do envelope (E) é a menos compreendida por seu mecanismo de ação e estrutura, mas aparentemente desempenha papéis na montagem, liberação e patogênese viral. A proteína da membrana (M) é um componente que mantém a integridade da membrana viral e a proteína do nucleocapsídeo (N) se liga ao RNA viral e suporta o nucleocapsídeo, auxiliando na brotação do vírus, replicação de RNA e replicação de mRNA (ASTUTI; YSRAFIL, 2020).

A transmissão do SARS-CoV-2 de humano para humano por ocorrer principalmente através de gotículas respiratórias expelidas durante espirros, tosse ou fala por um indivíduo infectado (ATHER et al., 2020). O espectro de infecção causado

por SARS-CoV-2 pode variar de infecção assintomática a sintomática com possível risco de vida (ORTIZ-PRADO et al., 2020). Portadores assintomáticos de SARS-CoV-2 referem-se a pessoas que não apresentam sintomas clínicos, no entanto, os portadores assintomáticos podem ser uma fonte potencial de transmissão e podem evoluir para pacientes sintomáticos (MA et al., 2022).

Quando sintomática, a COVID-19 pode ser dividida em leve ou grave, de acordo com os sintomas apresentados. Os pacientes com COVID-19 leve geralmente apresentam sintomas clínicos de febre alta, tosse seca, dor de garganta, fadiga e mialgia. Além disso, sintomas menos óbvios como náuseas, diarreia, redução do olfato (hiposmia) e sensação anormal do paladar (disgeusia) também foram observados. Já pacientes com COVID-19 grave podem apresentar dispneia, saturação de oxigênio no sangue  $\leq 93\%$ , frequência respiratória  $\geq 30/\text{min}$  e infiltrados pulmonares (pus, sangue)  $> 50\%$  em 24 a 48 h com necessidade de UTI. Pacientes com COVID-19 grave podem apresentar síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), insuficiência respiratória, choque séptico e/ou disfunção ou falência de múltiplos órgãos, acidose metabólica difícil de corrigir, choque séptico, disfunção de coagulação (STRUYF et al., 2022; WANG et al., 2020a).

Outra preocupação que emerge da disseminação do SARS-CoV-2 é a COVID longa ou síndrome pós-COVID-19, que pode acometer de 10 a 20% das pessoas que desenvolvem COVID-19. Essa condição pode surgir independentemente da gravidade da infecção por COVID-19, da variante circulante do vírus ou da idade da pessoa (WHO, 2023a). Os sintomas mais comuns relatados em muitos estudos são fadiga e dispneia que duram meses após a COVID-19 aguda. Outros sintomas persistentes podem incluir deficiências cognitivas e mentais, dores no peito e nas articulações, palpitações, mialgia, disfunções do olfato e paladar, tosse, dor de cabeça e problemas gastrointestinais e cardíacos (PETER et al., 2022; RAVEENDRAN; JAYADEVAN; SASHIDHARAN, 2021).

Diante do grande impacto social e econômico causado pela pandemia de COVID-19, a comunidade científica e médica em todo o mundo tem trabalhado arduamente para encontrar uma solução para acabar com a pandemia, desenvolvendo e aprovando com urgência vacinas, que contabilizaram 13.229.166.046 pessoas imunizadas (10 de março de 2023) (WHO, 2023a).

O rápido desenvolvimento de vacinas para alcançar a imunidade coletiva foi crucial no combate à pandemia de COVID-19. No entanto, vários fatores sociais e

econômicos podem causar impedimentos para o avanço da cobertura vacinal, como o desenvolvimento e produção de doses suficientes necessárias para vacinar toda a população mundial, tornar as vacinas baratas e acessíveis e a aceitabilidade da vacina pela população em geral. Além dos fatores acima, rumores e informações erradas sobre a vacinação contra a COVID-19 também contribuem para a aceitabilidade da vacinação (YARLAGADDA et al., 2022).

Embora as vacinas gerem efetivamente respostas específicas e controladas na população, as chances de infecções recorrentes e o surgimento de novas variantes de SARS-CoV-2 causadas pela hesitação e desigualdade vacinal, exigem intervenções terapêuticas e terapias combinadas que sejam mais baratas e acessíveis. Portanto, o reposicionamento de fármacos antivirais aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) foi uma abordagem popular muito utilizada para o desenvolvimento da terapia COVID-19 por sua disponibilidade imediata, sobretudo no início da pandemia, em meados de 2020. (SAUL; EINAIV, 2020).

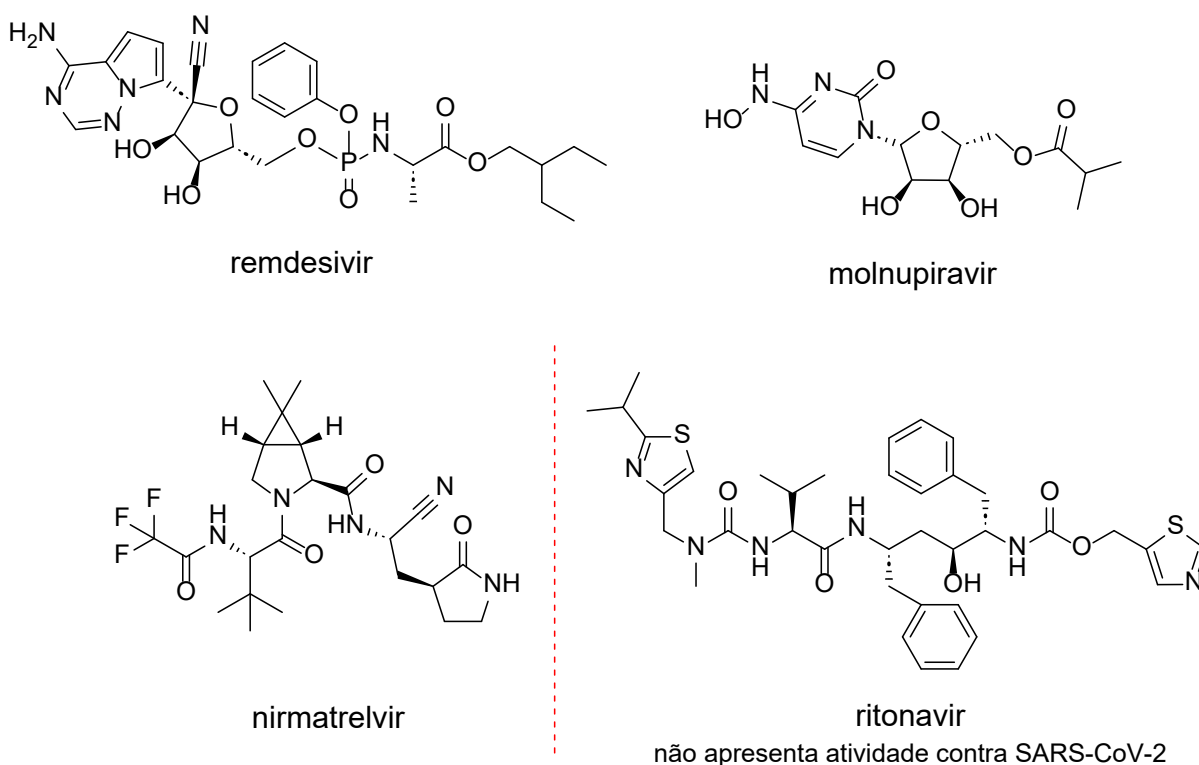
Diante da necessidade de terapias para tratar a COVID-19 em atendimento de urgência, o FDA dos EUA aprovou, em outubro de 2020, o uso emergencial do medicamento antiviral remdesivir (**Figura I.2**) (BEIGEL et al., 2020). Este é um pró-fármaco de fosforamidato, que é metabolizado nas células para produzir a sua forma ativa trifosforilada, atuando como análogo de nucleotídeo, sendo incorporado pela enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) viral ao produto de RNA em crescimento, inibindo-a e prejudicando a replicação viral do coronavírus, incluindo SARS-CoV-2 (KOKIC et al., 2021). Em setembro de 2022, o *Guideline Development Group* (GDG) publicou uma nova recomendação para o uso do Remdesivir em pacientes com COVID-19 grave, com risco de internação hospitalar, devendo ser administrado como uma infusão intravenosa diária durante 3 dias consecutivos, o mais rápido possível após o início dos sintomas, idealmente dentro de 7 dias (WHO, 2023b).

Outro antiviral recomendado pela WHO para pacientes com COVID-19 não grave com maior risco de hospitalização é o molnupiravir (março de 2022, **Figura I.2**), que também tem como alvo a RdRp do SARS-CoV-2. O molnupiravir é um análogo de nucleosídeo, pró-fármaco de éster isopropílico, que atua como um agente mutagênico que causa uma série de erros durante a replicação viral. Ao contrário do remdesivir, o molnupiravir é administrado por via oral duas vezes ao dia (KABINGER et al., 2021; WHO, 2023b).

Além disso, o FDA autorizou, em dezembro de 2021, o uso emergencial do

Paxlovid® produzido pela Pfizer (FDA, 2021a). Paxlovid® é uma combinação de nirmatrelvir e ritonavir (**Figura I.2**). O primeiro fármaco impede a replicação viral ao inibir a protease principal ( $M^{pro}$ ), através da formação de um aduto covalente reversível de tioimidato entre o grupo nitrila do nirmatrelvir e o resíduo catalítico de Cys145. O segundo é responsável por retardar a metabolização do nirmatrelvir, através da inibição da enzima do citocromo P450 (CYP3A4) (OWEN et al., 2021). O Paxlovid (nirmatrelvir e ritonavir), representa uma escolha superior em relação aos antivirais mencionados anteriormente, devido sua maior eficácia na prevenção da hospitalização, assim em janeiro de 2023, o *Guideline Development Group* (GDG) publicou uma nova recomendação para Paxlovid® (nirmatrelvir e ritonavir), sendo indicado para pacientes com COVID-19 não grave que apresentam risco aumentado de hospitalização (WHO, 2023b).

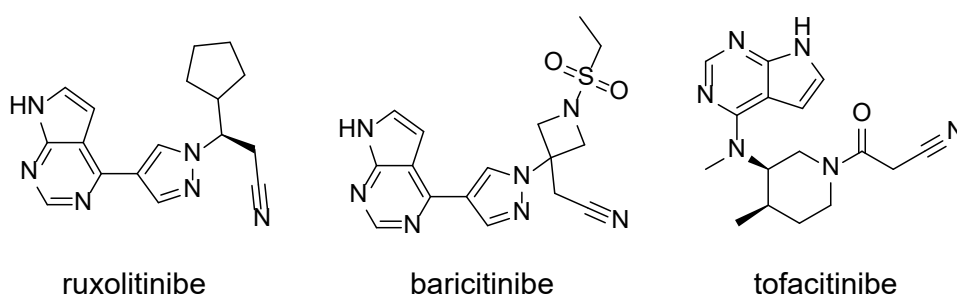
**Figura I.2:** Antivirais aprovados para o tratamento da COVID-19.



Fonte: O autor

Além dos antivirais mencionados acima, outras opções terapêuticas estão disponíveis (**Figura I.3**), tais como: bloqueadores do receptor de IL-6 como tocilizumabe ou sarilumabe; inibidores da Janus quinase (JAK), especificamente o baricitinibe, um medicamento oral que suprime a superestimulação do sistema imunológico, recomendado para pacientes com COVID-19 grave ou crítica, coadministrado com corticosteroides. Na ausência de inibidores de JAK (baricitinibe) e bloqueadores de receptores de IL-6 (tocilizumabe ou sarilumabe), os médicos podem prescrever dois outros inibidores de JAK (ruxolitinibe ou tofacitinibe). Além disso, o anticorpo monoclonal sotrovimab é recomendado para tratar COVID-19 leve ou moderada em pacientes com alto risco de hospitalização. Por fim, o casirivimab-imdevimab, destinado a pacientes com status soronegativo, onde a genotipagem viral rápida está disponível e confirma a infecção por uma variante suscetível do SARS-CoV-2, representa uma alternativa ao sotrovimab (WHO, 2023b).

**Figura I.3:** Demais opções terapêuticas disponíveis para tratamento de COVID-19 autorizadas pela WHO.



**Legenda:** Os fármacos tocilizumabe sarilumabe, sotrovimab e casirivimab-imdevimab são anticorpos monoclonais (macromoléculas), por isso não foram representadas.

**Fonte:** O autor

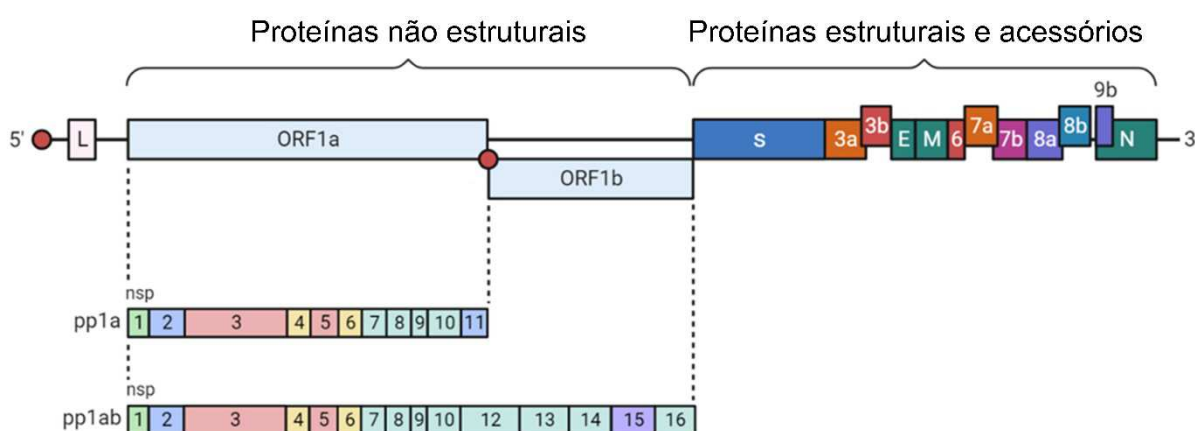
Apesar de já existirem algumas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento da COVID-19, apenas os fármacos molnupiravir, remdesivir e nirmatrelvir/ritonavir têm como alvo direto o vírus SARS-CoV-2. Além do alto custo, os fármacos citados acima apresentam algumas desvantagens, o remdesivir, por exemplo pode causar insuficiência respiratória, distúrbios gastrointestinais, e disfunção incluindo baixa albumina, baixo potássio, baixa contagem de glóbulos vermelhos, baixa contagem de plaquetas, o que ajuda na formação de coágulos e descoloração da pele (FAN et al., 2020; YANG et al., 2021). O molnupiravir, por sua vez pode causar diarreia, náusea e tontura (BERNAL et al., 2022). O uso do Paxlovid® causa a

inativação do CYP3A4 pelo ritonavir, uma enzima comum no metabolismo de medicamentos, pode alterar suas concentrações plasmáticas e aumentar os efeitos adversos relacionados aos medicamentos. A aplicabilidade do Paxlovid® pode, portanto, ser limitada em algumas populações com alto risco de COVID-19 grave, como aquelas com comorbidades que requerem medicamentos metabolizados usando a enzima CYP3A4 (REIS et al., 2022). Assim se fazem necessários esforços para a descoberta de fármacos mais acessíveis, potentes e seguros para o tratamento ambulatorial da COVID-19.

## 1.2 PROTEASE PRINCIPAL ( $M^{PRO}$ )

No campo de desenvolvimento de novos fármacos um aspecto importante é a identificação de alvos moleculares essenciais para a replicação viral. Neste sentido um alvo atraente no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de COVID-19 é a nps5, denominada protease principal ( $M^{PRO}$ ) ou  $3CL^{PRO}$ , devido ao seu papel essencial no processamento das poliproteínas que são traduzidas a partir do RNA viral (ANAND et al., 2003). Especificamente, essa protease é responsável por quebrar as poliproteínas virais, pp1a e pp1ab, em 11 sítios distintos, gerando proteínas não estruturais (nsps) 1–16 (**Figura I.4**), permitindo a replicação viral e a montagem de novas partículas virais que irão infectar outras células (LI; KANG, 2020).

**Figura I.4:** Genoma do coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2).



**Fonte:** Adaptado de Li e Kang (LI; KANG, 2020).

A poliproteína viral pp1a corresponde a nsp1 a nsp11 e a poliproteína pp1ab compreende a nsp12 a nsp16 (YADAV et al., 2021). Essas proteínas não estruturais

juntamente com suas funções estão tabuladas abaixo (**Tabela I.1**).

**Tabela I.1:** Funções das proteínas não estruturais (nsp) do SARS-CoV-2 (RAJ, 2021; YADAV et al., 2021).

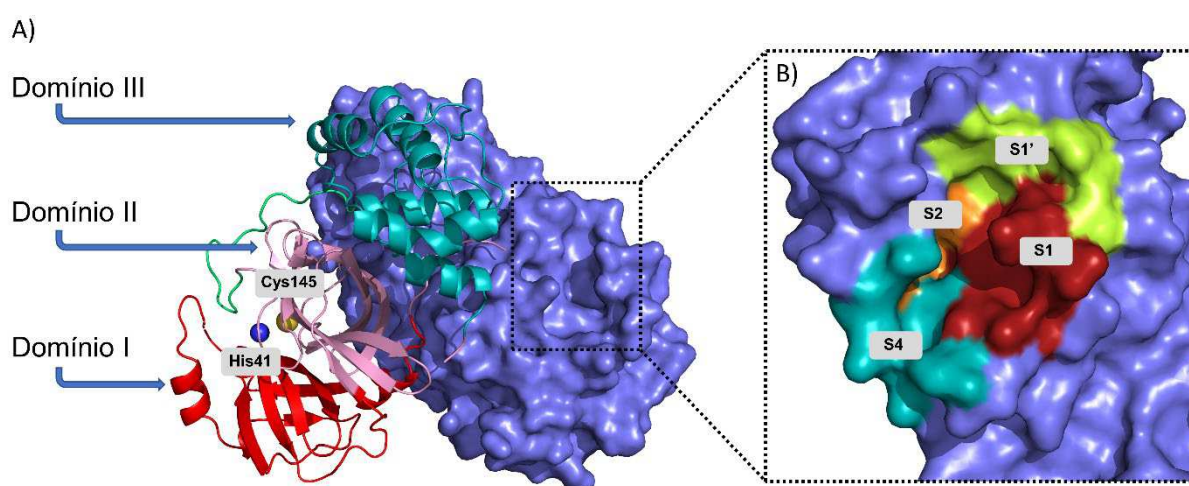
Nome	Função
nsp1	Proteína líder que atua como inibidor da tradução do hospedeiro e na supressão da indução de apoptose durante os estágios iniciais da infecção para promover o crescimento viral.
nsp2	Envolvida na interrupção da sinalização intracelular do hospedeiro durante infecções por SARS-CoV-2.
nsp3	Responsável pela liberação de nsp1, nsp2 e nsp3 da região N-terminal de pp1a e pp1ab.
nsp4	O papel essencial é a replicação e a montagem das estruturas replicativas.
nsp5	Cliva as poliproteínas pp1a e pp1ab em 11 locais distintos para produzir proteínas não estruturais maduras e intermediárias.
nsp6	Gera autofagossomos a partir do retículo endoplasmático, bem como induz vesículas de membrana dupla.
nsp7	Forma complexo com nsp8 e nsp12 para produzir a atividade de RNA polimerase de nsp8
nsp8	Forma o heterodímero com nsp8 e 12
nsp9	Em complexo com nsp8, envolvido na replicação do RNA e na virulência do vírus.
nsp10	É um cofator tanto para a atividade 2'O-metiltransferase de nsp16 quanto para as atividades N <sup>7</sup> -guanina-metiltransferase/ exoribonuclease de nsp14.
nsp11	Essencial para replicação.
nsp12	Atividade de RNA polimerase/ replicase (replicação e metilação).
nsp13	Um domínio central de helicase que se liga ao ATP. O domínio de ligação ao zinco está envolvido na replicação e transcrição
nsp14	Atividade de metiltransferase e exoribonuclease.
nsp15	Atividade de endoribonuclease dependente de Mn <sup>2+</sup>
nsp16	Metiltransferase que medeia a metilação do mRNA cap 2'-O-ribose para a estrutura 5'-cap dos mRNAs virais

**Fonte:** Adaptada de Raj (RAJ, 2021) e Yadav e colaboradores (YADAV et al., 2021).

Nesse sentido a  $M^{\text{pro}}$  é uma cisteína protease não estrutural de 33 kDa, que contém 306 de aminoácidos, extremamente conservados entre os coronavírus, compartilhando 96% de similaridade de sequência com a do SARS-CoV, com apenas 12 resíduos diferentes entre si, mas nenhum deles está envolvido em quaisquer papéis relevantes na atividade enzimática (GOYAL; GOYAL, 2020)

A  $M^{\text{pro}}$  de SARS-CoV-2 é um homodímero, onde os monômeros são designados de protômeros A e B, que se associam perpendicularmente um ao outro por um eixo cristalográfico de simetria dupla (JIN et al., 2020) (**Figura I.5**).

**Figura I.5:** Estrutura tridimensional do homodímero de  $M^{\text{pro}}$  de SARS-CoV-2 obtido por difração de raios-X.



**Legenda:** A) Cada domínio foi representado com uma cor diferente: Domínio I (vermelho), Domínio II (rosa) e Domínio III (verde), com a díade catalítica indicada como uma esfera amarela para Cys145 e uma esfera azul para His41. Enquanto o outro monômero é mostrado como superfície com a cavidade do sítio catalítico destacada. b) Uma visão aproximada da cavidade do sítio catalítico com os bolsos de ligação representados em cores diferentes: S1 (vermelho), S1' (verde limão), S2 (laranja) e S4 (azul-petróleo).

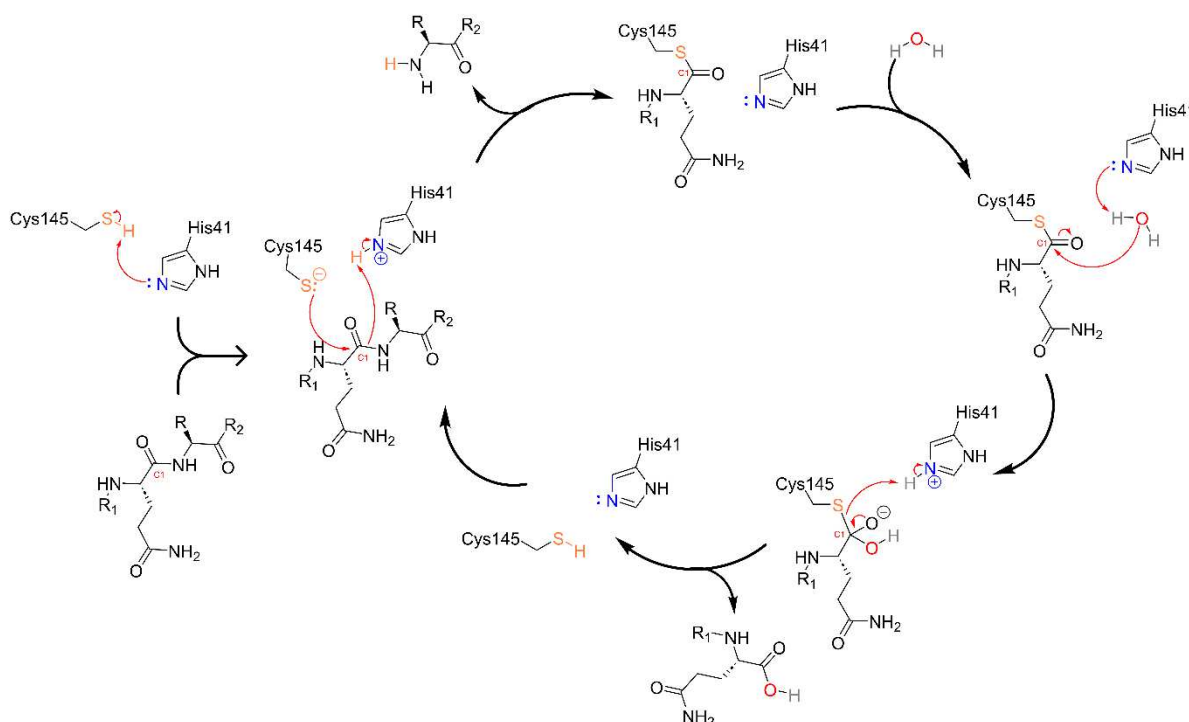
**Fonte:** O autor.

Cada monômero compreende três domínios. O domínio I do tipo quimotripsina (resíduos 10-99) e o domínio II do tipo picornavírus 3C protease (resíduos 100-182) possuem uma estrutura contendo seis fitas  $\beta$  antiparalelas que abrigam o local de ligação do substrato. O local de ligação do substrato possui uma díade catalítica formada por resíduos de cisteína e histidina (Cys145 - His41) com quatro bolsos de ligação, S1, S1', S2 e S4 (**Figura I.5**), localizados em uma fenda entre o domínio I e o

domínio II (STODDARD et al., 2020). O domínio III (resíduos 198 a 303), é um agrupamento globular de cinco hélices (ZHANG et al., 2020), que está envolvido na regulação da dimerização da M<sup>pro</sup> (SHI; SONG, 2006). Os domínios catalíticos são conectados por uma região de alça longa ao domínio C-terminal III (resíduos 198-303), composto por cinco  $\alpha$ -hélices antiparalelas. A dimerização é necessária para a atividade enzimática, pois o “*N-finger*” de cada um dos dois monômeros interage com Glu166 do outro monômero, o que auxilia na orientação correta do subsítio S1 do local de ligação do substrato (ANAND et al., 2003).

A clivagem das poliproteínas pela ação da M<sup>pro</sup> ocorre mediante um mecanismo de reação do tipo nucleofílico. Resumidamente, a clivagem do substrato peptídico catalisada pelas cisteíno proteases envolve duas principais etapas (**Esquema I.1**).

**Esquema I-1:** Mecanismo catalítico proposto para a clivagem das poliproteínas virais pp1a e pp1ab pela M<sup>pro</sup>.



**Fonte:** Adaptado de Hu e colaboradores (HU et al., 2022).

A primeira etapa compreende a clivagem do substrato no resíduo de glutamina (Gln) na posição P1, por meio da ação da díade catalítica Cys145–His41, na qual o tioril da cisteína funciona como um nucleófilo no processo proteolítico. Inicialmente, o tioril da Cys145 da díade catalítica é desprotonado com a ajuda do resíduo His41 próximo, onde o enxofre aniônico ataca o átomo de carbono C1 (C-terminal da Gln),

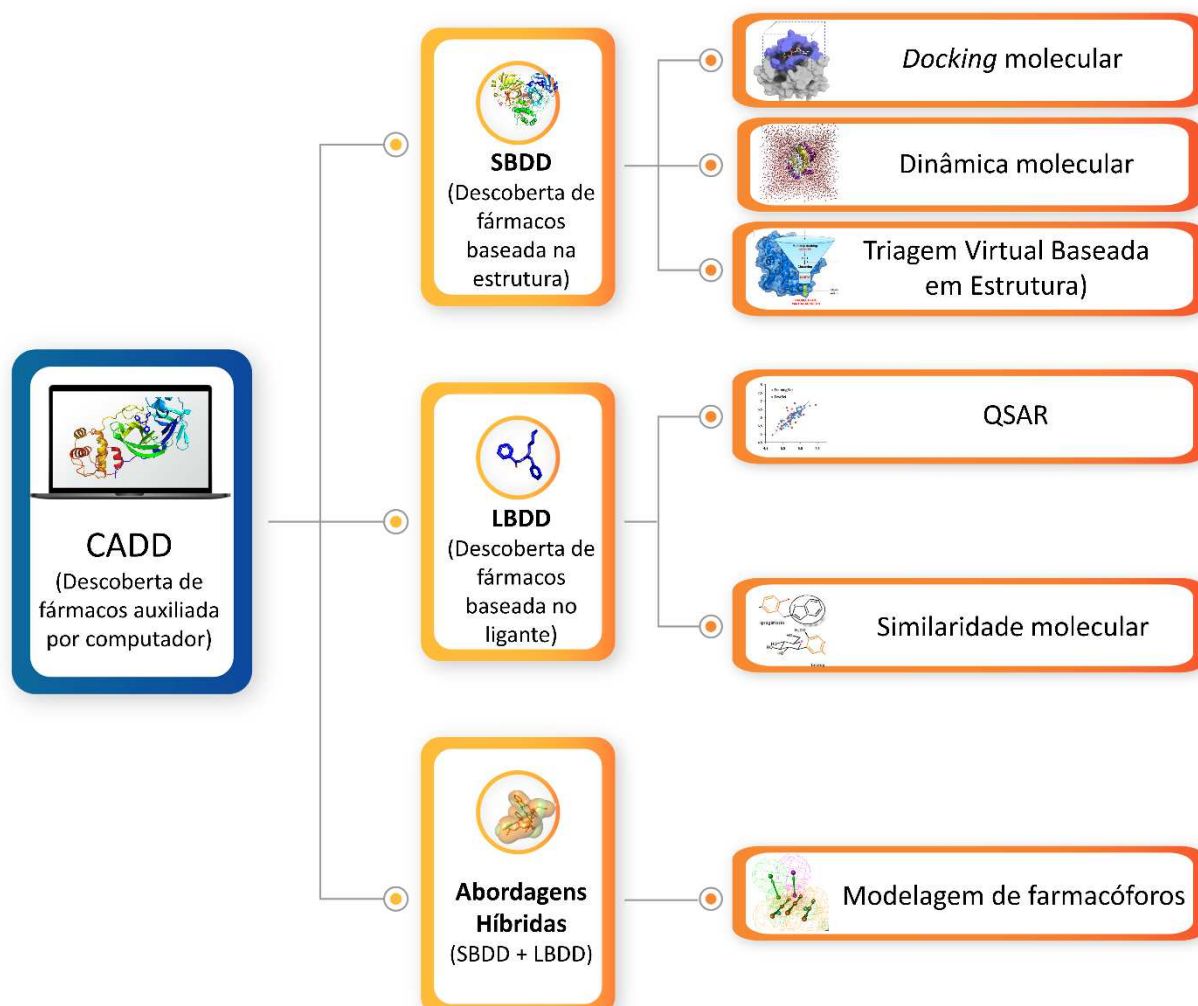
formando um complexo acil-enzima e liberando a parte N-terminal do substrato. Na segunda etapa o complexo acil-enzima é hidrolisado, tendo em vista que uma molécula de água disponível no sítio ativo atua como nucleófilo, realizando um ataque nucleofílico ao carbono do tioéster presente no complexo acil-enzima. Simultaneamente, o resíduo His41 abstrai um próton da molécula de água, levando à liberação do produto da reação, ou seja, a parte C-terminal do peptídeo. Esta reação é a etapa limitante da velocidade do processo catalítico completo. Finalmente, um próton é transferido da His41 para Cys145, restaurando o estado de protonação inicial da díade. Ao mesmo tempo, a ligação entre o resíduo Cys145 e o carbono C1 é quebrada, o que libera o segundo produto da reação para o sítio ativo (HU et al., 2022; RAMOS-GUZMÁN; RUIZ-PERNÍA; TUÑÓN, 2020).

### 1.3 MÉTODOS COMPUTACIONAIS NO DESENHO DE FÁRMACOS

A descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é um grande desafio para a indústria farmacêutica, pois trata-se de um processo demorado, trabalhoso e caro, com custo médio entre 1 e 2 bilhões de dólares e que pode levar de 10 a 17 anos, para passar por todas as fases de desenvolvimento. Assim, uma estratégia amplamente utilizada para reduzir o tempo e o custo envolvidos nesse processo é a estratégia de descoberta de fármacos auxiliadas por computador (CADD, do inglês *computer aided drug design*) (MAIA et al., 2020).

Os métodos CADD podem ser classificados em dois grupos, sendo o primeiro conhecido como abordagem direta pois utiliza a estrutura do alvo molecular (SBDD, do inglês *structure-based drug design*) e o outro denominado como abordagem indireta, pois é baseado na estrutura de possíveis ligantes (LBDD, *ligand-based drug design*) (**Figura I.6**).

**Figura I.6:** Abordagens aplicadas na descoberta de fármacos auxiliada por computador (CADD) e suas principais ferramentas.



Fonte: O autor

Para usar as ferramentas SBDD, as informações sobre as estruturas do alvo molecular precisam ser conhecidas. A disponibilidade de estruturas macromoleculares tridimensionais permite uma inspeção atenciosa da topologia do sítio de ligação, incluindo a presença de fendas, cavidades e subsítios. Propriedades eletrostáticas, como distribuição de carga, também podem ser cuidadosamente examinadas. Os métodos atuais de SBDD permitem o desenho de ligantes contendo as características necessárias para a modulação eficiente do alvo molecular (MANDAL; MOUDGIL; MANDAL, 2009). Assim, técnicas como o *docking* molecular, a triagem virtual baseada em estrutura da macromolécula (SBVS, do inglês *Structure-Based Virtual Screening*) e a dinâmica molecular (DM) são abordagens de SBDD mais comumente utilizadas devido à sua ampla gama de aplicações na análise de eventos de reconhecimento molecular, como energia de ligação, interações moleculares e

mudanças conformacionais (KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2011).

Em contraste, quando a estrutura do alvo desejado é desconhecida e a previsão usando métodos como modelagem de homologia ou previsão de estrutura *ab initio* é inviável, podem-se utilizar estratégias baseadas na estrutura de possíveis ligantes (LBDD), que consiste em submeter um conjunto de moléculas conhecidas que tenham atividade biológica, a métodos de modelagem computacional para desenvolver modelos computacionais que possam prever a atividade biológica de novos compostos com base em sua estrutura química. Esses modelos são usados para otimizar a estrutura de compostos existentes, a fim de aumentar sua atividade biológica e para identificação de novas moléculas por meio da triagem virtual de um grande banco de dados químico (MACALINO et al., 2015). Neste contexto, abordagens de similaridade molecular e estudos de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR, do inglês *quantitative structure-activity relationship*) são algumas técnicas de LBDD mais comumente utilizadas (ACHARYA et al., 2011).

Quando a estrutura do alvo é conhecida, bem como a estrutura das moléculas bioativas, é possível usar métodos híbridos, ou seja, uma combinação de métodos baseados em estrutura e baseados em ligantes, para aumentar o sucesso dos projetos de descoberta de fármacos. Um exemplo de método híbrido é a modelagem de farmacóforos (VÁZQUEZ et al., 2020).

Aqui focaremos em abordagens de SBDD, mais precisamente no *docking molecular* e dinâmica molecular.

### 1.3.1 *Docking molecular*

O *docking* molecular é um dos métodos mais comumente usados em SBDD (FERREIRA et al., 2015). O processo de *docking* envolve duas etapas básicas: a previsão da conformação e orientação do ligante dentro do sítio de ligação, denominada como pose, e avaliação da afinidade de ligação pela da macromolécula-alvo (MENG et al., 2011). Assim, os algoritmos de busca devem ser capazes de reproduzir o modo de ligação experimental e a função de pontuação também deve classificá-lo como o de maior entre todas as *poses* geradas (GUEDES; PEREIRA; DARDENNE, 2018; YADAVA, 2018)

O *docking* molecular pode ser aplicado em três metodologias distintas levando em consideração o grau de flexibilidade das moléculas envolvidas. *Docking* rígido, quando o ligante e o receptor são tratados como corpos rígidos, no qual o espaço de

busca é muito limitado, considerando apenas três graus de liberdade translacionais e três graus de liberdade rotacionais. *Docking* semiflexível, neste caso o ligante é considerado flexível, enquanto o receptor é mantido rígido durante o encaixe. *Docking* flexível, neste caso tanto a proteína, quanto o ligante são considerados flexíveis durante o processo de encaixe (MENG et al., 2011).

Assim, os algoritmos de busca são usados para pesquisar as orientações e conformações do ligante no local de ligação. O algoritmo de busca explora diferentes posições do ligantes no sítio de ligação usando graus de liberdade translacionais e rotacionais no caso de *docking* rígido, enquanto o *docking* flexível adiciona graus de liberdade conformacionais às translações e rotações dos ligantes (MAIA et al., 2020). Existem três categorias de algoritmo de busca: sistemático, randômico ou estocástico e determinístico (RUIZ-TAGLE et al., 2018).

Algoritmos de busca sistemática exploram todas as combinações dos parâmetros estruturais da molécula, geralmente por meio de sua construção incremental no qual o ligante é gradualmente construído no sítio de ligação.

Nesta estratégia, o ligante é dividido em vários fragmentos. Em seguida, um fragmento é selecionado como âncora e é encaixado em uma região do sítio de ligação, enquanto os fragmentos restantes são adicionados sequencialmente no sítio de ligação da proteína e ligados covalentemente para construir o ligante. O processo continua até que todo o ligante tenha sido construído. DOCK 6, FLEXX e Glide são exemplos de software que usam algoritmos de busca sistemática (MAIA et al., 2020; MENG et al., 2011).

Os algoritmos de busca randômica ou estocástica realizam mudanças aleatórias na conformação espacial do ligante, geralmente mudando um grau de liberdade do sistema por vez, o que leva à exploração de várias conformações possíveis. Método Monte Carlo (MC) e algoritmos genéticos (AG) são dois algoritmos típicos que pertencem à classe dos métodos estocásticos (MAIA et al., 2020; MENG et al., 2011). O método MC é usado pelos softwares Glide e MOE e AG são usados pelo GOLD e AutoDock4, AutoDock Vina (MAIA et al., 2020).

No algoritmo de busca determinístico o estado inicial é responsável por determinar o movimento que pode ser feito para gerar o próximo estado, que geralmente deve ser igual ou menor na energia do estado inicial. As simulações fornecem detalhes finos que dizem respeito aos movimentos de partículas individuais em função do tempo. Esse algoritmo é utilizado em métodos de minimização de

energia, assim como em métodos de simulação por dinâmica molecular, usada pelo DOCK 6. Embora as simulações de dinâmica molecular (DM) prometam ter melhores resultados e garantir a flexibilidade do sistema completo, os cálculos para as simulações são muito exigentes, exigindo muito tempo de máquina, razão pela qual este método não é popular para a triagem virtual de grandes bibliotecas de compostos (MAIA et al., 2020; MENG et al., 2011).

Além dos algoritmos de busca, os softwares de *docking* molecular usam funções de pontuação para estimar a força de interações não covalentes entre um ligante e o alvo molecular usando métodos matemáticos, assim a pontuação é usada para avaliar e classificar os complexos proteína-ligante previstos pelos algoritmos de pesquisa. Desta forma, a função de pontuação usada pelos algoritmos de *docking* é uma parte fundamental, pois é a principal responsável por prever a de ligação entre um alvo e seu candidato a ligante. As funções de pontuação podem ser categorizadas em baseadas em campo de força, baseadas em conhecimento, e empíricas (LEELANANDA; LINDERT, 2016).

As funções de pontuação baseadas no campo de força são desenvolvidas usando a mecânica molecular clássica, baseadas nas interações intermoleculares entre o ligante e os átomos da proteína. A avaliação da energia de ligação entre um complexo proteína-ligante é prevista calculando a soma das interações não-ligadas. As interações não-ligadas neste caso representam interações eletrostáticas e de van der Waals, onde o termo eletrostático é estimado pela formulação de Coulomb e o termo de van der Waals por uma função potencial de Lennard-Jones, obtidas a partir de dados experimentais. Além das interações não-ligadas, existem forças intermoleculares presentes no complexo proteína-ligante, como ligações iônicas, ligações de hidrogênio e mudanças conformacionais após a ligação do ligante, que devem ser consideradas para estimativa de energia de ligação (FERREIRA et al., 2015; LEELANANDA; LINDERT, 2016; MAIA et al., 2020; MENG et al., 2011). Softwares como DOCK, GOLD e AutoDock, oferecem funções baseadas em campo de força (MENG et al., 2011).

As funções de pontuação baseadas em conhecimento são métodos nos quais os parâmetros das funções potenciais são extraídos a partir da análise estatística de estruturas cristalinas determinadas experimentalmente. O método usa potenciais de energia aos pares extraídos de complexos proteína-ligante conhecidos para obter uma função geral. A afinidade de ligação é calculada pela soma das interações de ligação

dos átomos de uma proteína com seu ligante. Essa abordagem incorpora implicitamente interações físicas (eletrostática, van der Waals, interações cátion- $\pi$ ), onde a alta frequência de ocorrência/não ocorrência de interações átomo-átomo específicas é assumida como representando contato favorável/desfavorável. Os diferentes tipos de interações observados no conjunto de dados são classificados e ponderados de acordo com sua frequência de ocorrência. Esse método assume que as interações intermoleculares que ocorrem com mais frequência perto de certos tipos de átomos ou grupos funcionais, apresentam maior probabilidade de contribuir favoravelmente para a afinidade de ligação (FERREIRA et al., 2015; LEELANANDA; LINDERT, 2016; MAIA et al., 2020; MENG et al., 2011). Um exemplo de software que usa uma função de pontuação baseada em conhecimento é o GOLD e o ParaDockS (MAIA et al., 2020)

As funções de pontuação empíricas são outro tipo de método de avaliação onde estruturas determinadas experimentalmente são usadas como um conjunto de treinamento para realizar uma análise de regressão linear múltipla. A energia livre de ligação é calculada como a soma ponderada dos termos não correlacionados. Esses termos podem ser o número de ligações de hidrogênio, ligações iônicas, interações apolares, dessolvatação e efeitos entrópicos. Cada componente é multiplicado por um coeficiente e então somado para dar uma pontuação final. Os coeficientes são obtidos a partir da análise de regressão linear ajustada a um conjunto de teste de complexos proteína-ligante com s de ligação conhecidas (FERREIRA et al., 2015; LEELANANDA; LINDERT, 2016; MAIA et al., 2020; MENG et al., 2011). GOLD, Surflex e FlexX são programas de docking molecular amplamente usados usando funções de pontuação empíricas (FERREIRA et al., 2015).

### 1.3.2 Simulações de dinâmica molecular (DM)

Simulações de DM são ferramentas importantes para a compreensão da base física da estrutura e função de macromoléculas biológicas. A visão inicial das proteínas como estruturas relativamente rígidas foi substituída por estruturas flexíveis, onde um modelo dinâmico no qual os movimentos internos e as mudanças conformacionais resultantes desempenham um papel essencial em sua função. Desta forma, as simulações de dinâmica molecular (DM) preveem como cada átomo em uma proteína ou outro sistema molecular se moverá ao longo do tempo, com base em um modelo físico que rege as interações interatômicas (KARPLUS; MCCAMMON, 2002).

Essas simulações podem capturar uma ampla variedade de processos biomoleculares importantes, incluindo mudança conformacional, ligações entre o ligante e a proteína, revelando as posições de todos os átomos. É importante ressaltar que essas simulações também podem prever como as biomoléculas responderão em nível atômico a perturbações como mutação, fosforilação, protonação ou adição ou remoção de um ligante (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018).

Usando as leis do movimento de Newton (mecânica clássica) é possível prever a posição espacial de cada átomo em função do tempo. Em particular, avança-se no tempo, calculando repetidamente as forças em cada átomo e, em seguida, usando essas forças para atualizar a posição e a velocidade. A trajetória resultante é um filme tridimensional que descreve as conformações em nível atômico do sistema em cada ponto durante o intervalo de tempo simulado (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018).

Em resumo, as forças atômicas que governam o movimento molecular podem ser divididas entre aquelas causadas por interações entre átomos que estão quimicamente ligados uns aos outros e aquelas causadas por interações entre átomos que não estão ligados. Ligações químicas e ângulos atômicos são modelados usando molas simples, e ângulos diedros (rotações em torno de uma ligação) são modelados usando uma função senoidal que aproxima as diferenças de energia entre conformações eclipsadas e escalonadas. Forças não ligadas surgem devido a interações de van der Waals, modeladas usando o potencial de Lennard-Jones, e interações carregadas (eletrostáticas), modeladas usando a lei de Coulomb (DURRANT; MCCAMMON, 2011).

Os termos de energia descritos acima são parametrizados para ajustar aos cálculos da mecânica quântica. Essa parametrização inclui a identificação da rigidez e comprimentos ideais das molas que descrevem as ligações químicas e os ângulos atômicos, determinando as melhores cargas atômicas parciais usadas para calcular as energias de interação eletrostática, identificando os raios atômicos de van der Waals apropriados e assim por diante. Coletivamente, esses parâmetros são chamados de campo de força porque descrevem as contribuições das várias forças atômicas que governam a dinâmica molecular. Vários campos de força são comumente usados em simulações de dinâmica molecular, incluindo AMBER, CHARMM, e GROMOS (DURRANT; MCCAMMON, 2011; LINDORFF-LARSEN et al., 2012).

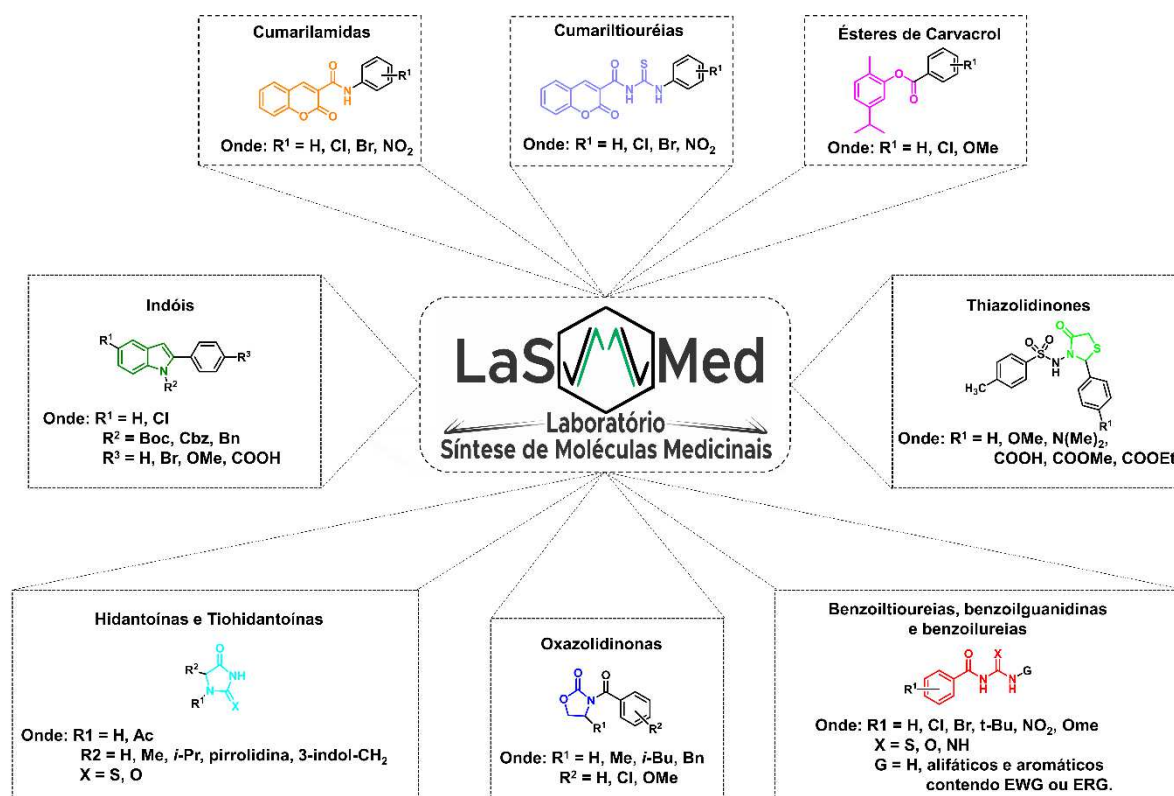
Desta forma, na descoberta de novos fármacos as simulações de DM são

extremamente úteis, por exemplo, na otimização de substâncias-líderes, principalmente quando existe a necessidade de modificações estruturais de um ligante para melhorar sua eficácia ou outras propriedades. Em um nível qualitativo, as simulações podem fornecer uma variedade de informações para orientar o processo de otimização do ligante: as simulações podem ser usadas para identificar as principais interações que um ligante faz com o sítio de ligação, para prever rearranjos do sítio induzidos por um ligante (SPAHN et al., 2017).

#### 1.4 QUIMIOTECA DO LASMMED

A quimioteca do LaSMMed contém 247 substâncias que apresentam ampla diversidade estrutural distribuída entre as classes químicas: benzoilguanidinas, benzoiltioureias, benzoilureias, derivados de carvacrol, cumarinas, hidantoínas, indóis, tiazolidinonas, tiohidantoínas e oxazolidinonas (**Figura I.7**). Essas estruturas podem ser consideradas subunidades privilegiadas (EVANS et al., 1988; RW et al., 2004) e foram projetadas usando estratégias clássicas de química medicinal, como hibridação molecular, restrição conformacional e bioisosterismo. Além disso, apresentaram diversas atividades biológicas *in vitro*, principalmente agentes antimicrobianos e antiprotozoários (BENATTI et al., 2020; BRITO et al., 2020; CAMARGO et al., 2020; DE CARVALHO et al., 2019; PEREIRA et al., 2021; SANTIAGO-SILVA et al., 2021).

**Figura I.7:** Diversidade estrutural da quimioteca do LaSMMed



**Legenda:** Cumarilamidas (laranja), cumariltioureias (roxo), ésteres de carvacrol (magenta), indóis (verde), oxazolidinonas (azul), thiazolidinonas (verde limão), hidantoínas e tiohidantoínas (ciano), benzoiltioureias, benzoilguanidinas e benzoilureias (vermelho).

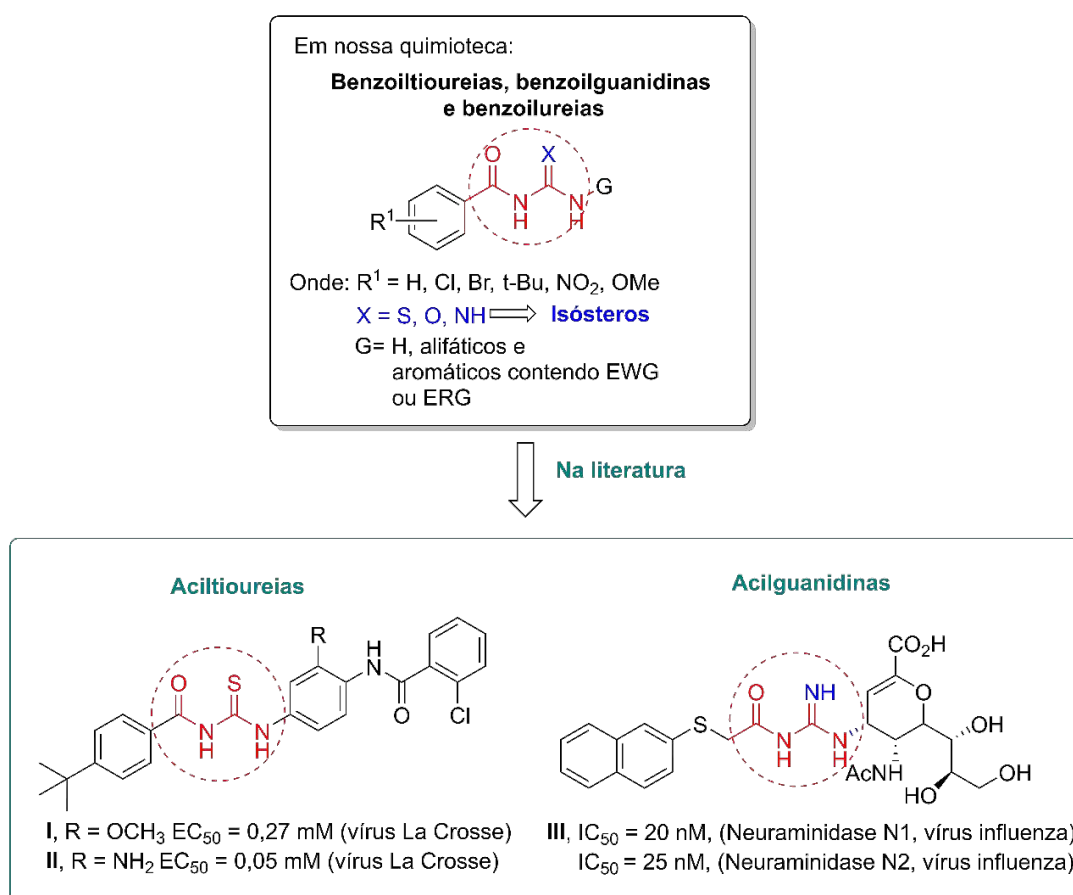
**Fonte:** O autor.

É válido ressaltar que o interesse em se avaliar as substâncias da nossa quimioteca pode ser embasado em relatos da literatura que indicam o potencial antiviral dos núcleos heterocíclicos ou funções orgânicas presentes em seus arcabouços estruturais, conforme pode ser observado nas Figuras I.8 – I.13.

Por exemplo, a importância de se avaliar nossos compostos contendo a porção estrutural acilguanidina e aciltioureia pode ser embasada respectivamente pelos trabalhos de (BURGESON et al., 2012) e (LIN et al., 2013). O primeiro trabalho (BURGESON et al., 2012) relatou a síntese de uma série de derivados de aciltioureia, baseado na potência antiviral apresentada pelo composto I. Esse apresentou atividade contra uma diversidade de vírus, incluindo o vírus Ebola (Filoviridae), vírus influenza humano (Orthomyxoviridae), vírus da imunodeficiência tipo 1 (Retroviridae), vírus da dengue (Flaviviridae) e o vírus sincicial respiratório (Paramyxoviridae). Dentre as derivatizações, os autores mostraram que a substituição de um grupo metoxila (I)

por um grupo amino mais ionizável (II) foi suficiente para potencializar em 5,4 vezes a atividade antiviral ao vírus da família *Bunyaviridae*, causador da encefalite La Crosse ( $EC_{50} = 0,05 \mu\text{M}$ ) (**Figura I.8**). O trabalho de (LIN et al., 2013) envolveu variar o grupo substituinte à carbonila da acilguanidina do esqueleto estrutural do fármaco zanamivir (representado pela porção em azul do composto III – **Figura I.8**). A avaliação dos compostos obtidos quanto à inibição da glicoproteína viral neuraminidase indicou que o derivado III apresenta interessantes atividades contra os subgrupos N1 e N2 das neuraminidasas, com valores de  $IC_{50}$  de 20 e 25 nM, respectivamente. Além da atividade, o novo derivado pode fornecer a vantagem de uma melhor biodisponibilidade oral devido à hidrofobicidade resultante da adição de grupos hidrofóbicos substituintes à guanidina, melhorada em relação ao zanamivir. Tendo em vista o potencial antiviral apresentado pelas aciltioureas e acilguanidinas, pretende-se também avaliar as acilureias correspondentes, uma vez que são consideradas isósteras das mesmas, podendo assim estabelecer uma relação de bioisosterismo entre essas funções, justificando-se assim a sua avaliação biológica (**Figura I.8**).

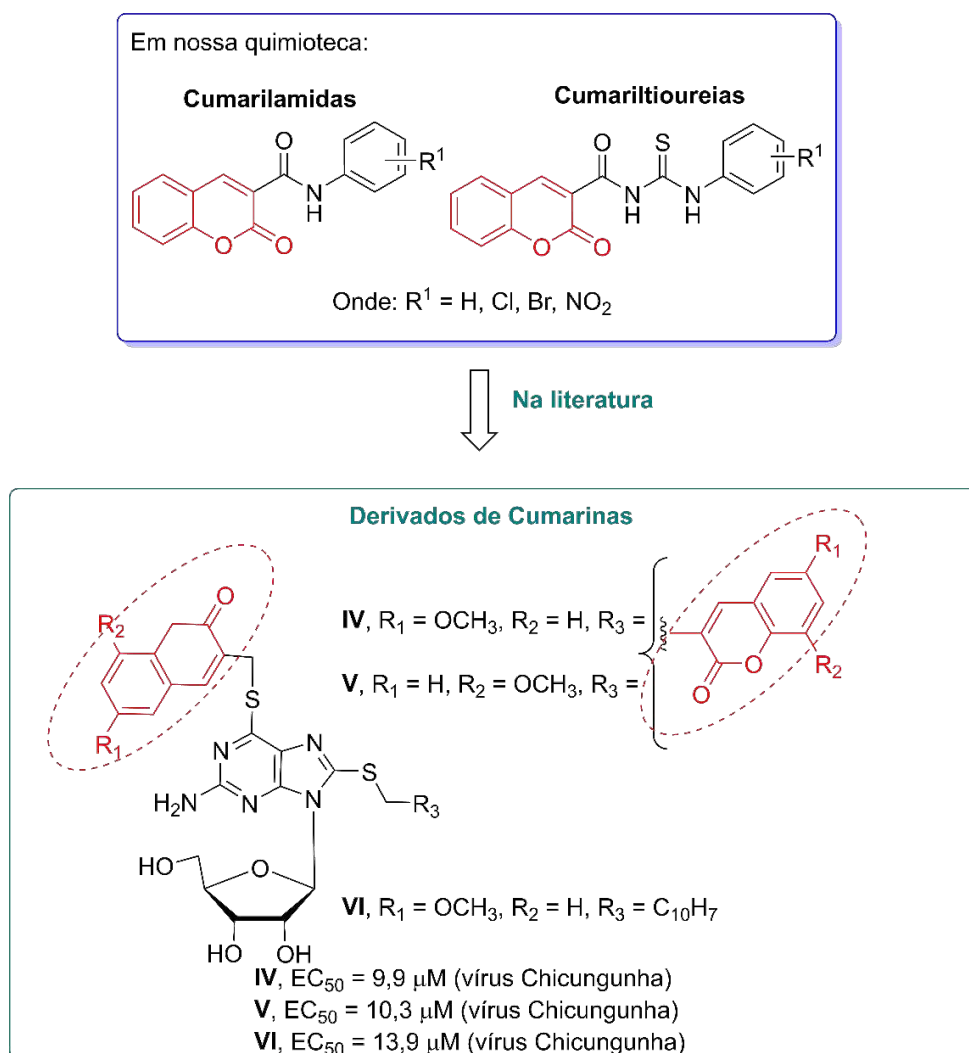
**Figura I.8:** Identificação da classe de benzoiltioureas, benzoilguanidinas e benzoilureias (em vermelho, com isosterismo representado em azul).



Fonte: O autor

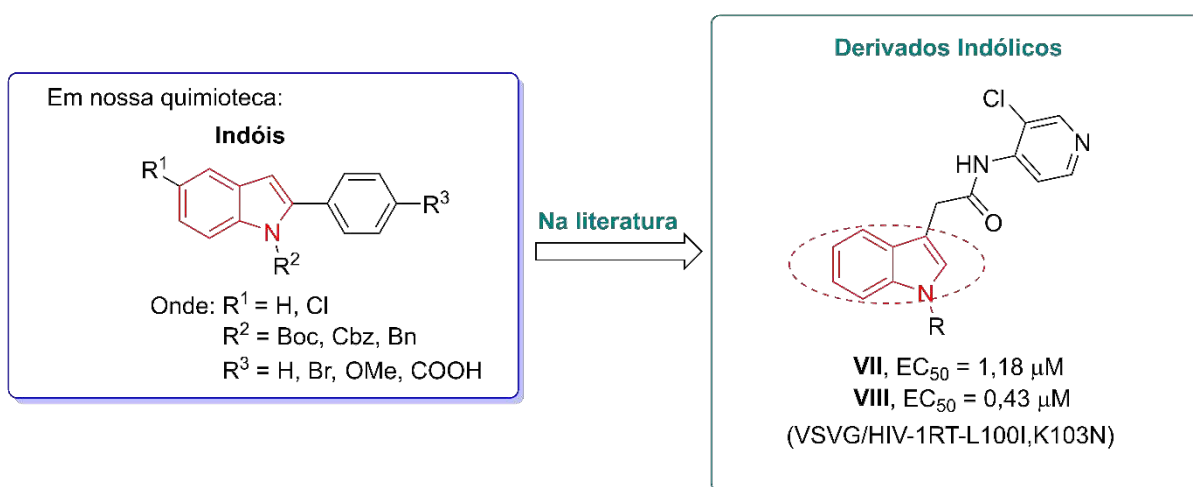
Os derivados de cumarina também estão presentes em nossa quimioteca e sua relevância como potenciais antivirais pode ser evidenciada por uma série de derivados reportados na literatura (HWU et al., 2019). Compostos conjugados foram sintetizados contendo a porção cumarina-guanosina e avaliados seus potenciais inibitórios contra o vírus da Chicungunha. Dentre os 21 derivados sintetizados, os compostos **IV**, **V** e **VI** apresentaram atividade antiviral com  $EC_{50}$  de 9,9, 10,3 e 13,9  $\mu\text{M}$ , respectivamente (**Figura I.9**). Baseados nas evidências experimentais, os autores acreditam que a porção cumarina presente nesses compostos conjugados foi essencial para a atividade, e as diretrizes de relação estrutura-atividade fornecem valiosas informações para o desenvolvimento de novos compostos antivirais.

**Figura I.9:** Identificação da classe das cumarinas (em vermelho) pertencentes à nossa quimioteca e ilustração do potencial antiviral da mesma descrito na literatura.



Os derivados indólicos podem ter sua acuidade como classe antiviral representada pelo trabalho de (XU et al., 2020). A partir de um produto natural isolado da raiz de *Isatis indigotica* foi racionalizada a síntese e o estudo de relação estrutura-atividade de 57 novos derivados. Dois deles, **VII** e **VIII** apresentaram atividade como inibidor da transcriptase reversa de DNA polimerase em seis de sete cepas de vírus testadas. O derivado **VIII** ( $EC_{50} = 0,43 \mu\text{M}$ ) se mostrou, inclusive, superior aos inibidores etravirina ( $EC_{50} = 1,08 \mu\text{M}$ ) e nevirapina ( $EC_{50} = 0,76 \mu\text{M}$ ) frente às cepas HIV-1RT-L100I/K103N (**Figura I.10**). A importância desse precedente é também suportada com relatos na literatura que indicam que fármacos responsáveis por inibir a transcriptase reversa de DNA polimerase podem ter atividade frente à coronavírus como SARS-CoV-2 de inegável relevância frente à atual pandemia por COVID-19 (CALY et al., 2020).

**Figura I.10:** Identificação da classe dos indóis (em vermelho) pertencentes à nossa quimioteca e ilustração do potencial antiviral da mesma descrito na literatura.

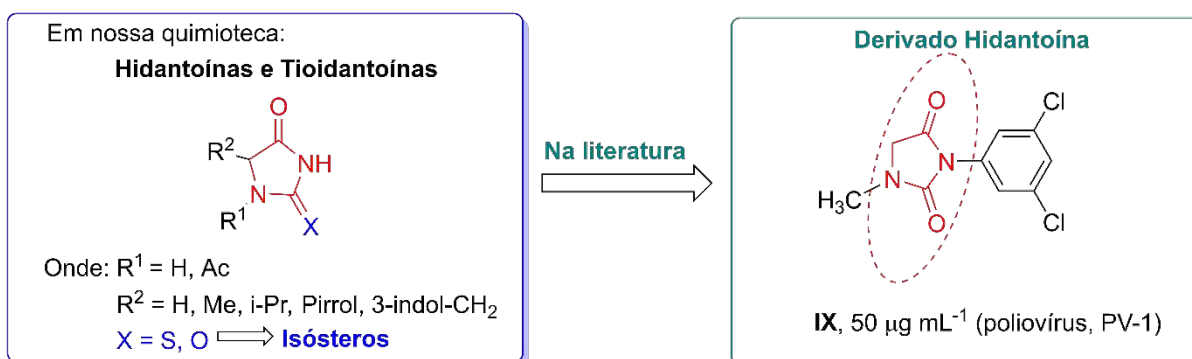


Fonte: O autor

Em nossa quimioteca consta também derivados de hidantoína cuja relevância da classe pode ser salientada pela atividade anti-enterovírus do derivado **IX** apresentado na **Figura I.11** (TIJSMA et al., 2016). Desde que foi levantada a possibilidade da hidantoína inibir a replicação de enterovírus por um mecanismo de ação duplo, investigou-se o efeito inibitório da hidantoína na replicação de poliovírus (PV-1). Nesse trabalho observou-se que  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de hidantoína foi suficiente para inibir a replicação do RNA viral, enquanto  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  da substância reduziu os níveis de RNA extracelulares e a quantidade de partículas infecciosas de vírus, apesar de

ter pouco efeito na replicação do RNA intracelular. Os autores concluem, portanto, que com  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de hidantoína, o mecanismo de ação predominante parece inibir a morfogênese do vírus. Como as hidantoínas apresentam potencial antiviral pode ser interessante também a avaliação das tiohidantoínas, que são seus isómeros correspondentes (**Figura I.11**).

**Figura I.11:** Identificação da classe de hidantoínas e tiohidantoínas (em vermelho, com isosterismo representado em azul) pertencentes à nossa quimioteca e ilustração do potencial antiviral dessas classes descrito na literatura.



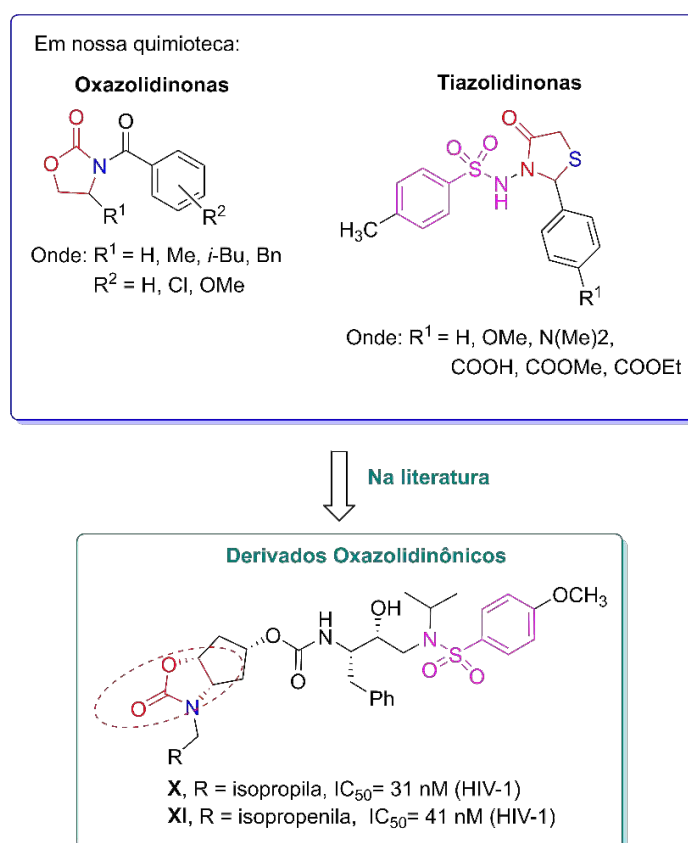
Fonte: O autor

Outros derivados sintetizados recentemente em nosso grupo de pesquisa apresentam em sua estrutura o núcleo oxazolidinônico (**Figura I.12**). Trabalhos descritos na literatura indicam atividades antivirais como inibidor de norovírus protease (DAMALANKA et al., 2018) e HIV-1 protease (GHOSH et al., 2018). Nesse último trabalho, foi desenvolvida uma série de derivados oxazolidinônicos com atividade boa a excelente em relação à inibição de HIV-1. O derivado **X** apresentou  $\text{IC}_{50}$  antiviral de 31 nM. Além disso, os derivados **X** e **XI** foram avaliados contra uma série de variantes de HIV-1 multirresistentes e altamente resistentes, e suas atividades antivirais foram comparáveis às observadas para o fármaco darunavir (**X**,  $\text{IC}_{50} = 23 \text{ nM}$ , **XI**,  $\text{IC}_{50} = 40 \text{ nM}$  e darunavir,  $\text{IC}_{50} = 3,5 \text{ nM}$  para HIV<sub>NL4-3</sub> e **X**,  $\text{IC}_{50} = 36 \text{ nM}$ , **XI**,  $\text{IC}_{50} = 33 \text{ nM}$  e darunavir,  $\text{IC}_{50} = 19 \text{ nM}$  para HIV-1<sub>ATV<sup>R</sup>5 $\mu$ M}</sub>). Esse excelente potencial apresentado pelo núcleo oxazolidinônico nos incentiva a avaliar outra classe de heterociclos de 5 membros contida em nossa quimioteca, as tiazolidinonas, onde também é possível observar a relação isostérica existente entre nitrogênio e enxofre (em azul na **Figura I.12**). Além disso, as nossas tiazolidinonas apresentam em suas estruturas o grupamento sulfonamida (em rosa na **Figura I.12**), que também está

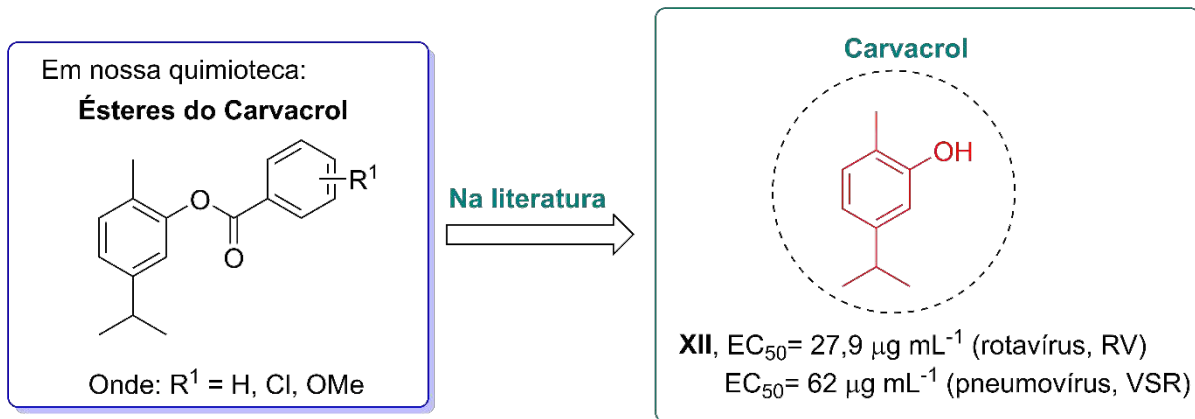
presente na estrutura dos derivados oxazolidinônicos **X** e **XI**, o que pode indicar a importância de tal grupamento para a atividade antiviral dessas substâncias.

Além dos derivados citados, também trabalhamos em nosso grupo de pesquisa com derivados ésteres de carvacrol **XII** (**Figura I.13**). O trabalho de (PILAU et al., 2011) mostra que óleos essenciais enriquecidos com carvacrol, e o próprio carvacrol são capazes de inibir *in vitro* diferentes vírus humanos e animais. Dentre eles, destacam-se os vírus humanos rotavírus (RV) e o vírus sincicial respiratório (pneumovírus, VSR) que, por serem vírus de RNA, pode-se relacionar as atividades com um potencial atividade inibitória ao SARS-CoV-2 e outros coronavírus. Nesse trabalho observa-se que o carvacrol sozinho exibiu alta atividade antiviral contra RV com um  $EC_{50}$  de  $27,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto sua capacidade inibitória junto ao vírus VSR foi de  $EC_{50}$  de  $62 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Figura I.12:** Identificação das classes de oxazolidinonas e tiazolidinonas (em vermelho, com isosterismo representado em azul e com o grupo sulfonamida evidenciado em rosa) pertencentes à nossa quimioteca e ilustração do potencial antiviral dessas classes descrito na literatura.



**Figura I.13:** Identificação dos ésteres de carvacrol (em vermelho) pertencentes à nossa quimioteca e ilustração do potencial antiviral dessas classes descrito na literatura.



Fonte: O autor

Dada a versatilidade das classes químicas componentes da quimioteca LaSMMed e relatos na literatura de substâncias contendo arcabouços estruturais semelhantes, que apresentam atividades antivirais importantes, decidimos investigar a potencial atividade inibitória das substâncias produzidas por nosso laboratório frente a M<sup>pro</sup> de SARS-CoV-2.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar possíveis inibidores de protease principal (M<sup>pro</sup>) de SARS-CoV-2 por meio de uma triagem virtual baseada em *docking* molecular, a partir da quimioteca do LaSMMed, e validar os resultados obtidos por simulações de dinâmica molecular e cálculos ADME.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Selecionar estruturas tridimensionais da M<sup>pro</sup> no servidor *Protein Data Bank* (PDB);
- ✓ Identificar o sítio de ligação para realizar o estudo de *docking* molecular;
- ✓ Realizar a validação do protocolo de *docking* molecular;
- ✓ Realizar a triagem virtual da quimioteca LaSMMed frente à M<sup>pro</sup> a partir do protocolo de *docking* validado;
- ✓ Analisar as interações intermoleculares previstas pelas simulações de *docking* molecular;
- ✓ Selecionar as poses dos compostos para simulações de Dinâmica Molecular.
- ✓ Avaliar a estabilidade dos complexos durante as simulações de Dinâmica molecular;
- ✓ Calcular a energia livre de ligação utilizando o método MM/PBSA;
- ✓ Realizar estudo *in silico* das substâncias mais promissoras na triagem virtual; para avaliar parâmetros farmacocinéticos teóricos relacionados à biodisponibilidade oral e absorção intestinal.

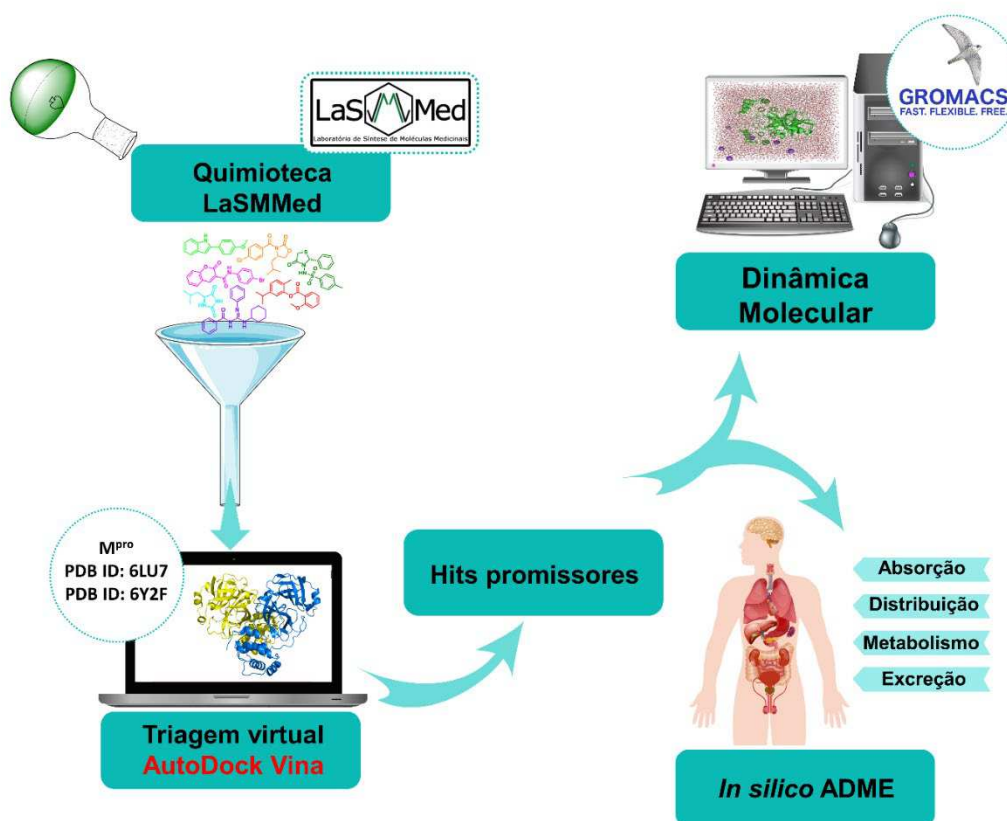
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dada a evidente necessidade de novas terapias mais acessíveis e seletivas anti-COVID-19, a M<sup>pro</sup> tem sido amplamente estudada como alvo farmacológico, principalmente usando abordagens de descoberta de novos fármacos auxiliadas por computador, como métodos baseados em ligantes e baseados em estruturas (MURATOV et al., 2021; WANG et al., 2022). Portanto, dadas as evidências prévias de possíveis atividades antivirais, decidiu-se explorar a quimioteca do LaSMMed em uma triagem virtual baseada em *docking* molecular contra a M<sup>pro</sup>.

Apesar de conter 247 substâncias, a quimioteca apresenta 313 estruturas, uma vez que as benzoilguanidinas podem ter três possíveis formas tautoméricas amino-imino (O'DONOVAN et al., 2013), e as tiazolidinonas foram obtidas como misturas racêmicas. Portanto, decidiu-se avaliar a influência do tautomerismo e da estereoquímica dessas substâncias nesta triagem virtual.

A triagem virtual foi realizada no AutoDock Vina. Posteriormente, esses complexos foram submetidos a simulações de dinâmica molecular para entender como esses compostos interagem e se ligam com a M<sup>pro</sup> em sistema aquoso. Por fim, realizamos a previsão *in silico* das propriedades físico-químicas relacionadas à fármaco-similaridade e propriedades farmacocinéticas dos possíveis inibidores selecionados (**Figura I.14**).

**Figura I.14:** Planejamento para a triagem virtual da quimioteca do LaSMMed Chemical Library (LMCL).



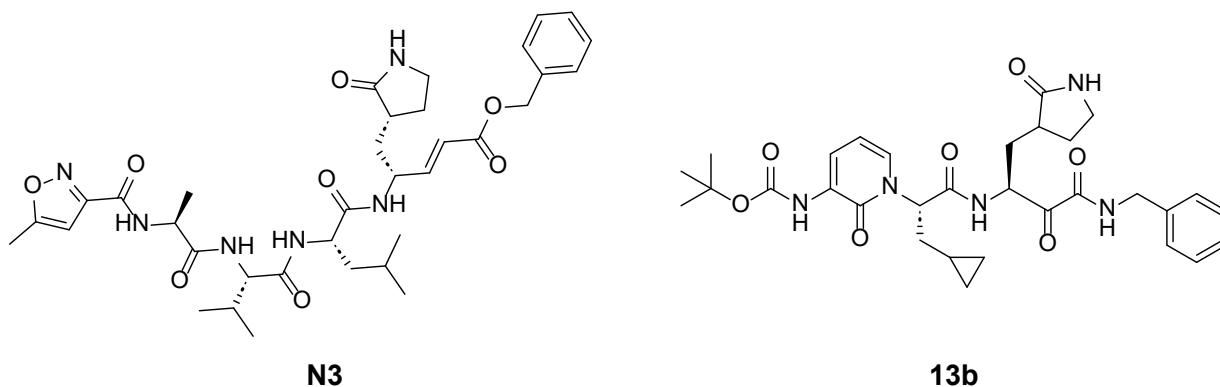
Fonte: O autor.

### 3.1 SELEÇÃO DAS ESTRUTURAS 3D DA M<sup>PRO</sup> E IDENTIFICAÇÃO DO SITIO DE LIGAÇÃO

Dessa forma, a triagem virtual se iniciou com a escolha da estrutura cristalográfica da M<sup>PRO</sup> de SARS-CoV-2 no PDB. O critério para seleção foi uma estrutura que possuísse um inibidor co-cristalizado. Portanto, tendo em vista a disponibilidade de várias estruturas tridimensionais da M<sup>PRO</sup> de SARS-CoV-2, decidiu-se avaliar nesse estudo duas delas: ID: **6LU7** (JIN et al., 2020) e ID: **6Y2F** (ZHANG et al., 2020).

A primeira estrutura escolhida identificada pelo código PDB **6LU7**, obtida por difração de raios-x com resolução de 2,16 Å, consiste em um complexo formado pelo protômero A da M<sup>PRO</sup> de SARS-CoV-2 ligado covalentemente com um acceptor de Michael com o código PDB **N3** (JIN et al., 2020, Figura 14). A segunda estrutura identificada pelo código PDB **6Y2F**, obtida por difração de raios-X com resolução de 1,95 Å, consiste em um complexo formado pelo protômero A da M<sup>PRO</sup> de SARS-CoV-2, ligado covalentemente com um inibidor  $\alpha$ -cetoamida com o código PDB **13b** (ZHANG et al., 2020) **Figura I.15**).

**Figura I.15:** Inibidores complexados com o protômero A da M<sup>pro</sup> de SARS-CoV-2 identificados como **N3 (6LU7)** e **13b (6Y2F)**.



**Fonte:** O autor.

Uma vez que as proteínas são flexíveis, podendo ser cristalizadas em diferentes conformações geradas por variações nas cadeias laterais de seus aminoácidos, decidiu-se trabalhar com essas duas estruturas (**6LU7** e **6Y2F**) visando uma melhor compreensão do processo de reconhecimento molecular. Essas variações conformacionais são relevantes, sobretudo, naqueles resíduos que estão presentes em possíveis sítios de ligação, uma vez que a forma do sítio pode mudar conforme elas se movem (STODDARD et al., 2020).

A M<sup>pro</sup> dos coronavírus normalmente têm vários subsítios de ligação, que compõe o local ativo. Com base na estrutura cristalina de M<sup>pro</sup> de SARS-CoV-2 (PDB ID 6LU7), quatro bolsos de ligação, S1, S1', S2 e S4, estão presentes (STODDARD et al., 2020), sendo formado pelos seguintes resíduos de aminoácidos (**Tabela I.2**).

**Tabela I.2:** Identificação dos quatro subsítios e seus respectivos resíduos de aminoácidos que formam o sítio de ligação do substrato da M<sup>Pro</sup>.

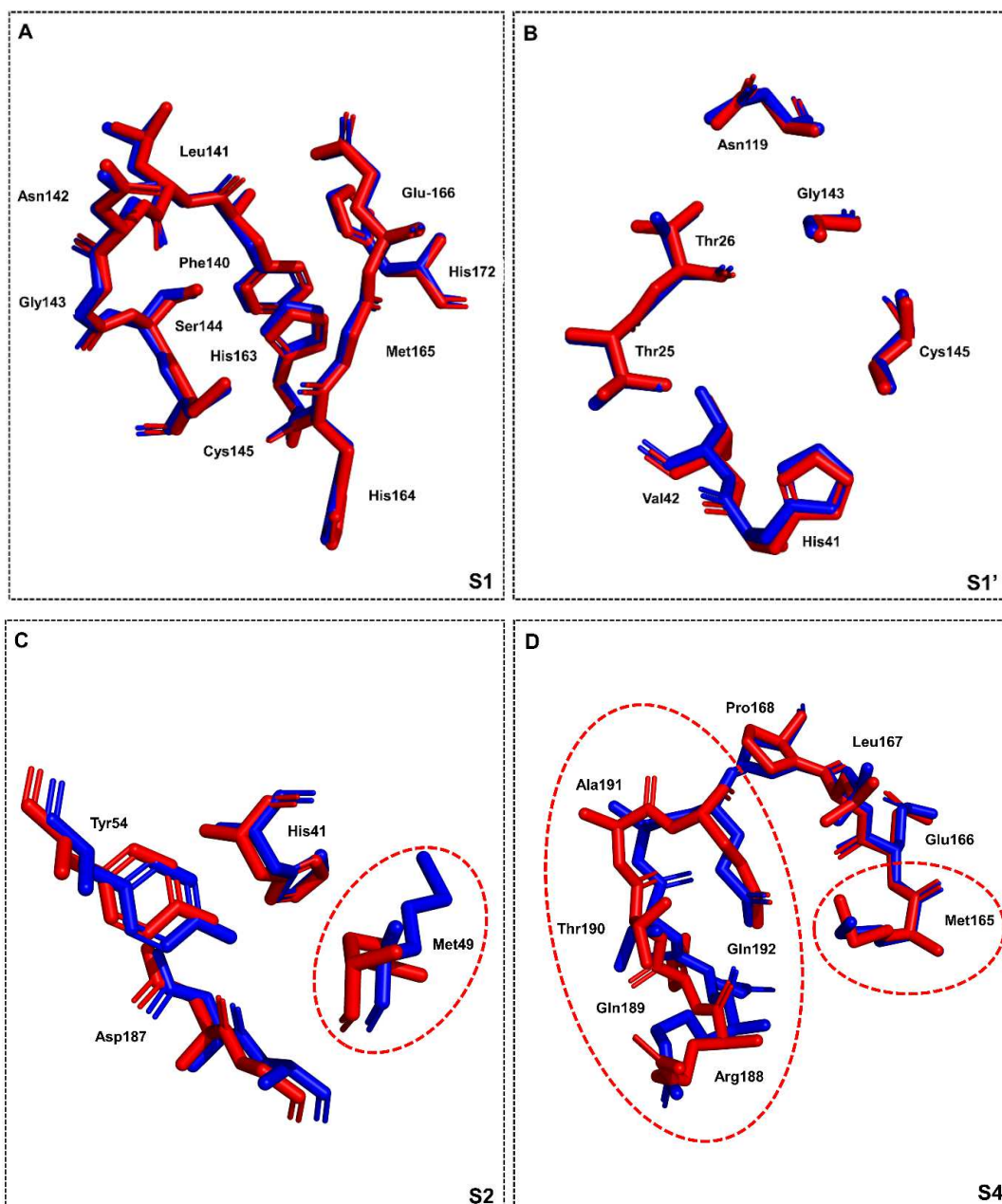
Subsítio	Aminoácidos	
	Cadeia Principal	Cadeia Lateral
S1	Leu141, Gly143, His164, Met165	Phe140, Asn142, Ser144, His163, His172, Glu166
S1'	Thr26	Val42, Asn119, Thr25, Cys145, Gly143
S2	Arg188	Tyr54, Asp187, Met49, His41
S4	Glu166, Thr190	Met165, Leu167, Pro168, Phe185, Arg188, Gln189, Ala191, Gln192

Portanto, uma comparação das estruturas cristalinas de M<sup>Pro</sup> de SARS-CoV-2 **6LU7** e **6Y2F** foi realizada para determinar variações estruturais através de diferentes conformações das cadeias laterais dos resíduos presentes no sítio ativo. Essa comparação foi realizada para verificar se essas variações poderiam contribuir para gerar diferentes poses de ligação para um possível inibidor.

A sobreposição de **6LU7** e **6Y2F** apresentou *Root Mean Square Deviation* (RMSD) de 0.70 Å. Os sítios de ligação do substrato S1 e S1' (**Figura I.16 A–B**) não apresentaram variação do ângulo diedro, enquanto o S2 e S4 (**Figura I.16 C–D**) consistiram em resíduos com uma maior variação do ângulo diedro. O subsítio S2 formado pelas cadeias laterais de Tyr54, Asp187, Met49 e His41, e a cadeia principal de Arg188, observou-se que o resíduo Met49 apresentou a mudança na conformação mais significava com RMSD de 2.790 Å. De acordo com Stoddard e colaboradores (STODDARD et al., 2020) essa mudança na orientação diminui o comprimento do subsítio S2 em pelo menos 3,1 Å. O último subsítio S4, criado pelas cadeias laterais de Met165, Leu167, Pro168, Arg188, Gln189, Thr190, Ala191, Gln192 e as cadeias principais de Glu166 e Thr190, consiste no subsítio com a maior variação de RMSD, onde os resíduos Met165, Arg188, Thr190, Ala191 e Gln192 mostraram-se ligeiramente variáveis com RMSD de 0,58 Å, 1,98 Å, 1,77 Å, 1,80 Å e 0,92 Å, respectivamente. Vale ressaltar ainda que o resíduo Gln189 apresentou valor de RMSD maior do que 2,5 Å (2,68 Å).

A diversidade de variações conformacionais pode produzir poses de ligação distintas para um mesmo composto, assim o uso de múltiplas conformações do sítio ativo ao realizar o *docking* molecular poderá ajudar na previsão de novos potenciais inibidores direcionados a M<sup>pro</sup> de SARS-CoV-2 (STODDARD et al., 2020).

**Figura I.16:** Variação de resíduos nos subsítios S1, S1', S2 e S4 da M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2



**Legenda:** Os resíduos de aminoácidos pertencentes a estrutura cristalográfica **6LU7** estão representados pela cor azul e os resíduos pertencentes a estrutura cristalográfica **6Y2F** estão representados pela cor vermelha. Os círculos em vermelho indicam os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo com variações conformacionais observadas: Met49 (RMSD de 2,79 Å), Met165 (0,58 Å), Arg188 (1,98 Å), Thr190 (1,77 Å), Ala191 (1,80 Å), Gln192 (0,92 Å) e Gln189 (2,68 Å).

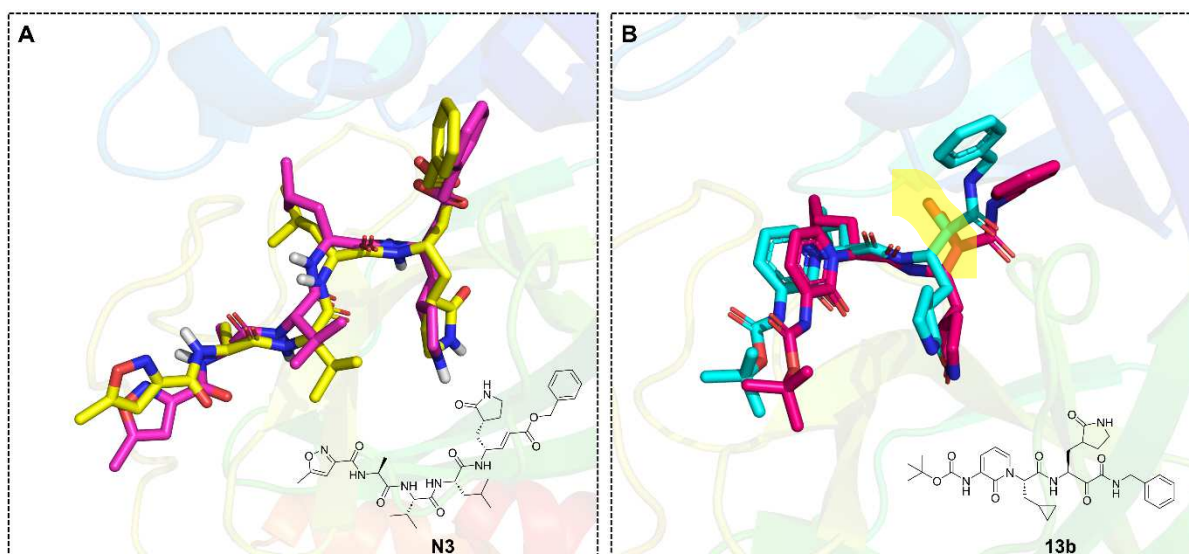
**Fonte:** O autor.

### 3.2 VALIDAÇÃO DO ESTUDO DE DOCKING MOLECULAR

A validação do protocolo de *docking* molecular foi realizada através do método de *redocking* para os ligantes **N3** e **13b** (PDB ID: **6LU7** e **6Y2F**, respectivamente) (**Figura I.15**), considerando o software Autodock Vina. Este processo consiste em comparar a conformação original de um ligante co-cristalizado com uma proteína e a conformação de um ligante que foi docado no sítio ativo desta mesma proteína (HARIONO et al., 2021). As funções que são capazes de retornar poses abaixo de 2 Å são considerados como tendo um desempenho bem-sucedido, indicando que as simulações são válidas (HEVENER et al., 2009).

Os resultados das melhores poses para **N3** e **13b** mostram valores de RMSD de 1,41 Å e 1,87 Å, respectivamente (**Figura. I.17**), indicando que o software Vina foi capaz de identificar a pose observada experimentalmente para cada complexo (HEVENER et al., 2009).

**Figura I.17:** Validação do protocolo de *docking* molecular pelo método de *redocking*.



**Legenda:** A) Pose obtida por *redocking* (amarelo) do **N3** e a pose original (rosa) do co-cristalizado com a M<sup>PRO</sup> (6LU7) B) Pose obtida por *redocking* (ciano) do ligante **13b** e pose original (rosa) do ligante co-cristalizado com a M<sup>PRO</sup> (6Y2F).

**Fonte:** O autor.

### 3.3 TRIAGEM VIRTUAL DA QUIMIOTECA DO LASMMED FRENTE A PROTEASE PRINCIPAL (M<sup>PRO</sup>) DE SARS-CoV-2

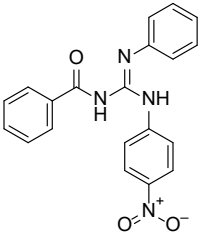
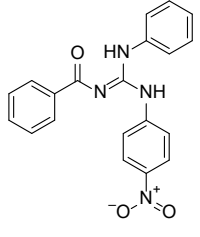
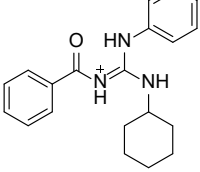
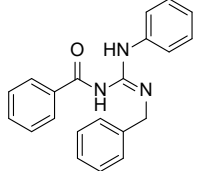
Após a validação do protocolo de *docking* molecular, através do AutoDock Vina,

realizou-se a triagem virtual das 313 estruturas presentes na quimioteca do LaSMMed nas duas estruturas cristalográficas (**6LU7** e **6Y2F**).

Após a triagem virtual baseada em *docking* molecular nas duas estruturas **6LU7** e **6Y2F** da M<sup>PRO</sup>, as 313 estruturas foram classificadas com base na média aritmética das energias de ligação previstas para cada estrutura, que variaram de -8,25 a -3,9 kcal/mol (**Apêndice A**).

Assim, selecionou-se quatro estruturas pertencentes a classe das benzoilguanidinas, a **LMed-136**, e seu tautômero **LMed-137**, **LMed-110** e **LMed-117** (**Tabela I.3**) que apresentaram energia de ligação média de -8 kcal/mol ou inferior, conforme metodologia proposta por Bepari e Reza (BEPARI; REZA, 2021).

**Tabela I.3:** Estruturas e energia de ligação média prevista para as quatro benzoilguanidinas selecionadas na triagem virtual

Ligantes	Estrutura	Energia de ligação prevista (kcal/mol)		
		6LU7	6Y2F	Média
LMed-136		-8,6	-7,9	-8,25
LMed-137		-8,5	-7,8	-8,15
LMed-110		-8,4	-7,7	-8,05
LMed-117		-8,9	-7,12	-8,01

Fonte: O autor.

As quatro benzoilguanidinas mostraram modos de ligação semelhantes, apesar de terem sido utilizadas duas proteínas (**6LU7** e **6Y2F**) com cadeias laterais com diferentes conformações no sítio ativo (**Figuras I.18**).

Analisando o complexo **6LU7-LMed-136** (**Figura I.18A**) este foi estabilizado por um número mais significativo de interações por ligação de hidrogênio, seis no total. Além das interações envolvendo o grupo guanidínio com os resíduos His164 (S1), Gln189 (S4) e Glu166 (S4), também estão presentes outras duas interações, como o grupo nitro e os resíduos Thr190 e Gln192, ambos no subsítio S4. A sexta ligação de hidrogênio ocorre entre a carbonila do grupo benzoíla com o resíduo catalítico His41 (S1'). O resíduo Glu166 tem papel fundamental na dimerização da M<sup>pro</sup>, que é essencial para a atividade catalítica da enzima (ANAND et al., 2003).

No entanto, o complexo **6Y2F - LMed-136** (**Figura I.18B**) mostrou interações de ligação de hidrogênio apenas com os resíduos de aminoácidos His164 (S1), Thr190 (S4) e a histidina catalítica (His41) no subsítio S1'.

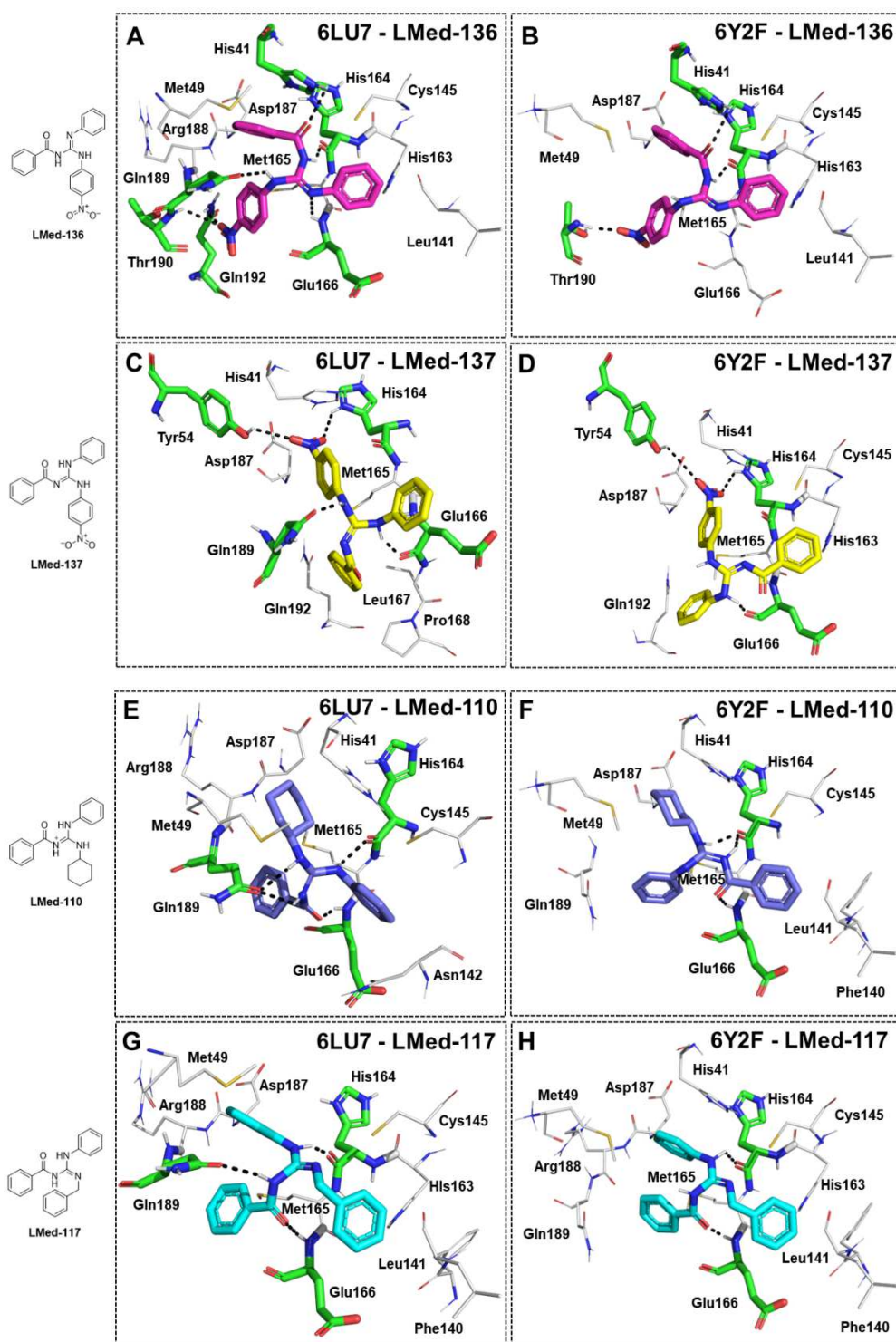
Inversamente, para o complexo **6LU7-LMed-137** (**Figura I.18C**), houve uma diminuição nas interações de ligações de hidrogênio em relação aos complexos de seu tautômero **LMed-136**, sendo observadas apenas quatro ligações de hidrogênio. Essas ocorreram apenas entre o grupo nitro e os resíduos Tyr54 (S2) e His164 (S1), bem como entre o grupo guanidínio e os resíduos Glu166 e Gln189 no subsítio S4. Em comparação, a principal alteração no complexo **6Y2F - LMed-137** (**Figura I.18D**) foi a perda da ligação de hidrogênio com o resíduo Gln189 (S4), que pode estar relacionada com a mudança conformacional da cadeia lateral do resíduo Gln189.

Para o complexo **6LU7-LMed-110** (**Figura I.18E**), observamos quatro ligações de hidrogênio, sendo duas envolvendo o grupo guanidínio com a cadeia lateral do resíduo Gln189 no subsítio S4; uma interação deste mesmo grupo com a carbonila da cadeia principal da His164 no subsítio S1, e a última entre a carbonila do grupo benzoíla com o nitrogênio da cadeia principal do resíduo Glu166 no subsítio S4. Em contraste, a principal alteração observada no complexo **6Y2F - LMed-110** (**Figura I.18F**) foi a perda das duas interações de ligação de hidrogênio com o resíduo Gln189 (S4). Para o **LMed-117**, observamos ligações de hidrogênio com interações semelhantes ao **LMed-110**, ou seja, com os resíduos de aminoácidos His164 (S1), Glu166 (S4) e Gln189 (S4), no complexo **6LU7 - LMed-117** (**Figura I.18G**), e apenas com os resíduos His164 (S1) e Glu166 (S4) no **complexo 6Y2F-LMed-117** (**Figura I.18H**). As interações hidrofóbicas entre as benzoilguanidinas selecionadas e o sítio

ativo da M<sup>pro</sup> estão relacionadas no apêndice B do presente capítulo.

Em resumo, as análises de *docking* indicaram que as quatro estruturas selecionadas possuem maior afinidade pelo subsítio S4, realizando ligações de hidrogênio essenciais que podem influenciar na atividade enzimática da M<sup>pro</sup>.

**Figura I.18:** Modo de ligação e interações moleculares das quatro melhores benzoilguanidinas com a M<sup>Pro</sup> (**6LU7** e **6Y2F**)



**Legenda:** (A–B) **LMed -136** (rosa); (C–D) **LMed -137** ( amarelo); (E–F) **LMed -110** (roxo); (G–H) **LMed -117** (ciano). Os resíduos de aminoácidos (brancos) representados por linhas realizam interações hidrofóbicas com os compostos. As linhas tracejadas pretas representam as ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos (verde) representados por bastões.

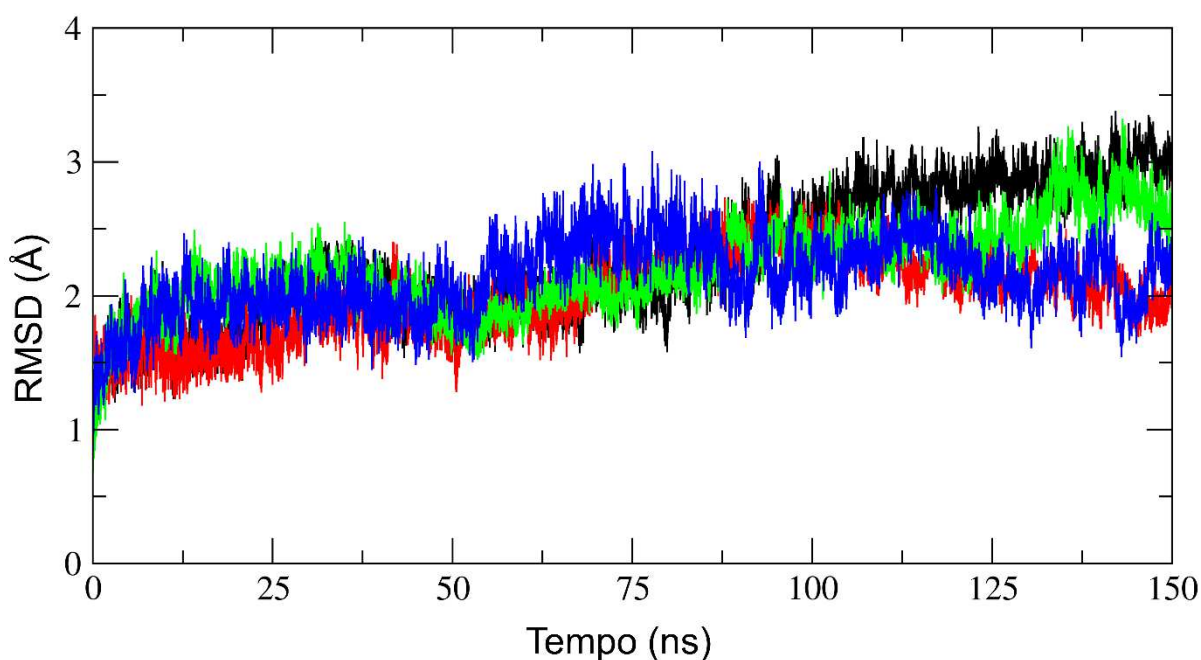
**Fonte:** O autor.

### 3.4 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR (DM)

Portanto, as poses das benzoilguanidinas **LMed-136**, **LMed-137**, **LMed-110** e **LMed-117** em complexo com a M<sup>pro</sup> de SARS-CoV-2 foram submetidas ao estudo de simulação de DM. Essa avaliação é importante para investigar a estabilidade conformacional do complexo ligante-proteína, a flexibilidade dos resíduos, principais interações por ligações de hidrogênio durante a trajetória simulada e energia livre de ligação (AL-KARMALAWY et al., 2021).

Após a execução da simulação MD por 150 ns, a estabilidade da proteína foi determinada analisando a média e desvio padrão do RMSD dos átomos de C $\alpha$  de cada complexo. O cálculo do RMSD das proteínas permite a quantificação do grau de mudanças conformacionais que podem ocorrer durante as simulações de DM (ZHANG; LAZIM, 2017). A média e desvio padrão dos valores de RMSD para os quatro sistemas das proteínas **LMed-110**, **LMed-117**, **LMed-136** e **LMed 137** foram observadas dentro do valor aceitável de  $< 2 \text{ \AA}$ , sendo  $1,88 \pm 0,40$ ,  $1,81 \pm 0,45$ ,  $1,97 \pm 0,26$  e  $1,74 \pm 0,34 \text{ \AA}$ , respectivamente. Esses valores de RMSD indicam que a proteína começou a encontrar uma posição de equilíbrio após os primeiros nanossegundos, tornando-se dinamicamente estável até o final da simulação (**Figura I.19**).

**Figura I.19:** Gráfico de RMSD dos átomos C $\alpha$  do protômero A da M<sup>pro</sup>.



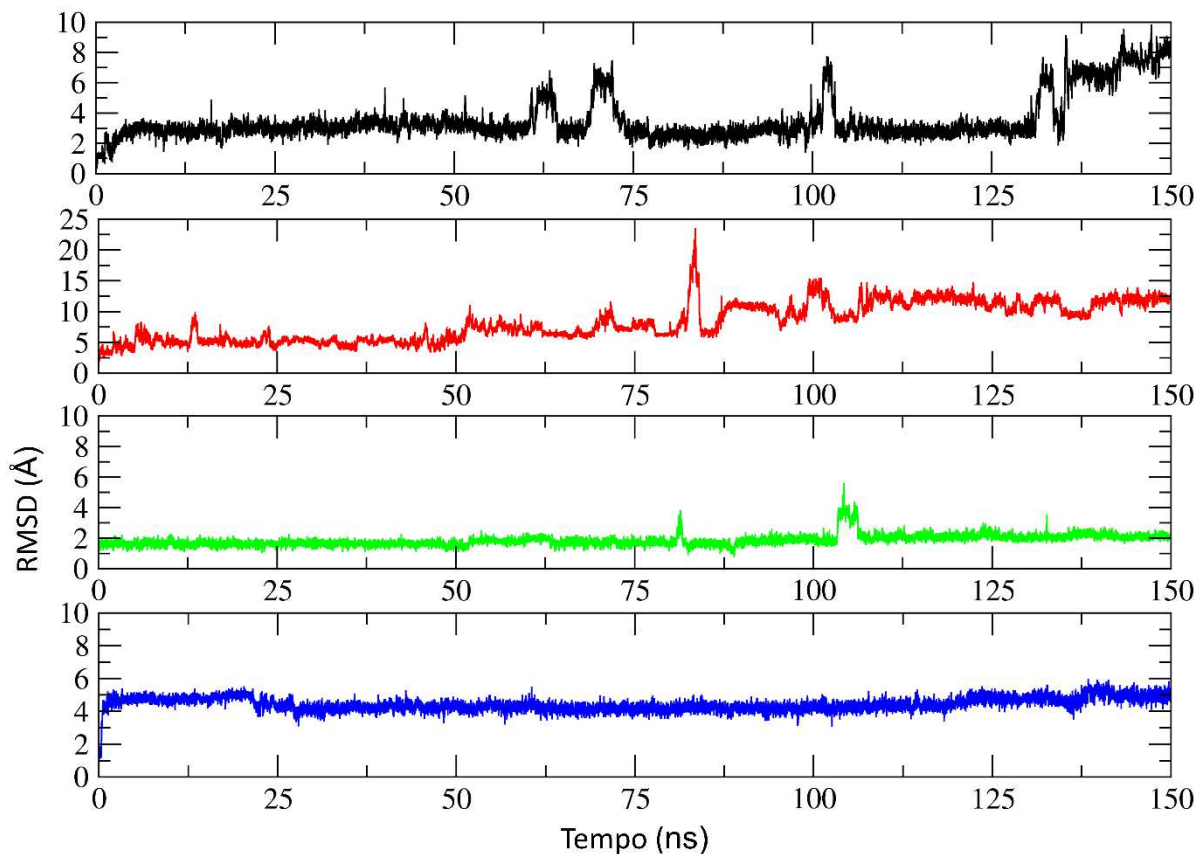
**Legenda:** **LMed-110** (linha preta), **LMed-117** (linha vermelha), **LMed-136** (linha verde) e **LMed 137** (linha azul).

**Fonte:** O autor

Os valores de RMSD do ligante foram analisados ao longo da trajetória. Ligantes com valores de RMSD mais baixos (ou seja,  $< 3 \text{ \AA}$ ) permanecem mais estáveis na pose inicial (WENG et al., 2021).

O RMSD dos inibidores ligados a  $M^{\text{pro}}$  revelam uma mudança de orientação no local de ligação em comparação com a pose inicial obtida no *docking* molecular. Com o **LMed-136** ( $3,53 \pm 1,49 \text{ \AA}$ ) e **LMed-137** ( $8,29 \pm 3,06 \text{ \AA}$ ), é possível observar mudanças bruscas de orientação no sítio de ligação em relação à pose de docagem, que podem indicar uma fraca interação com o sítio ativo da  $M^{\text{pro}}$ . Essa fraca interação pode indicar uma tendência do ligante em sair do sítio ativo durante a trajetória de DM (ALBUQUERQUE et al., 2020; DE SOUZA et al., 2019; UELISSON DA SILVA et al., 2022). Em contraste, **LMed-110** ( $1,86 \pm 0,37 \text{ \AA}$ ) move-se abaixo de  $2,0 \text{ \AA}$ , demonstrando uma ligeira mudança na orientação, mas retorna à posição inicial. Apesar do **LMed-117** ( $4,43 \pm 0,40$ ) mover-se acima de  $2,0 \text{ \AA}$ , após 5 ns, há uma tendência de estabilização no sítio ativo, indicando que o ligante, apesar de estável no sítio catalítico, sofreu algumas mudanças conformacionais para se estabilizar (**Figura I.20**).

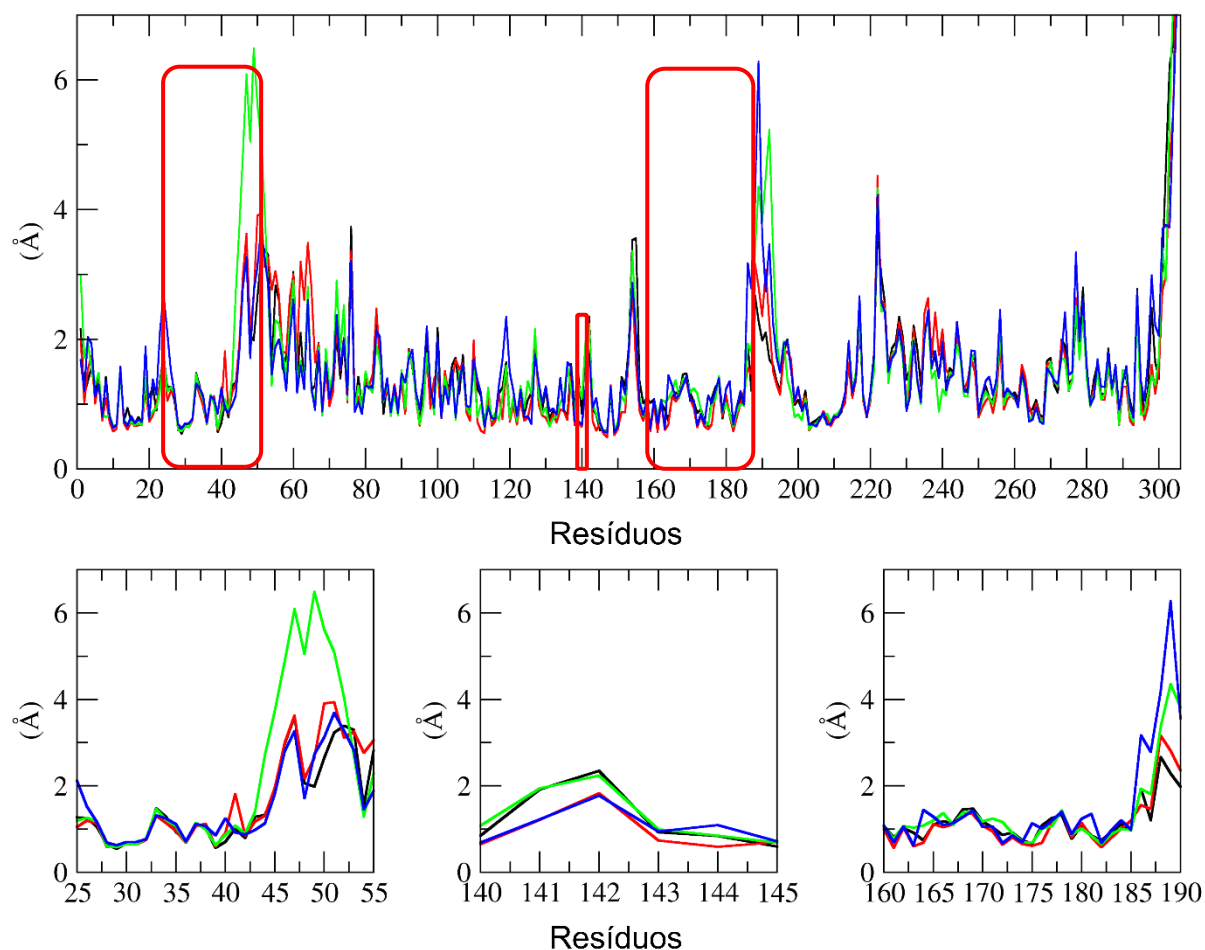
**Figura I.20:** Gráfico de RMSD dos átomos C $\alpha$  da M<sup>pro</sup> em complexo com a **LMed-136** (linha preta), **LMed-137** (linha vermelha), **LMed-110** (linha verde) e **LMed-117** (linha azul), durante o tempo de simulação de DM de 150 ns.



**Fonte:** O autor

Além disso, a flexibilidade estrutural dos resíduos de aminoácidos foi avaliada através dos átomos de C $\alpha$  usando o parâmetro *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF), definido como a flutuação residual de cada átomo em torno de sua posição média (SHAHRAKI et al., 2018). Para facilitar a análise da flexibilidade dos resíduos durante a simulação de DM, identificou-se quais resíduos estão próximos aos inibidores em até 5 Å. Portanto, esta análise (**Figura I.21**) indica que as flutuações significativas (> 3 Å) estão a mais de 5 Å de distância do sítio ativo, sugerindo que a presença desses inibidores não afeta a estabilidade da enzima (ALBUQUERQUE et al., 2020).

**Figura I.21:** Gráfico de RMSF dos átomos Ca da M<sup>pro</sup> em complexo com a **LMed-136** (linha preta), **LMed-137** (linha vermelha), **LMed-110** (linha verde) e **LMed-117** (linha azul), durante o tempo de simulação de DM de 150 ns.



**Legenda:** As caixas em vermelho indicam as regiões que possuem resíduos que formam o sítio ativo: (B) Thr25, Thr26, Leu27, His41, Val42, Cys44, Met49, Pro52, Tyr54; (C) Phe140, Leu141, Asn142, Gly143, Ser144, Cys145; (D) His163, His164, Met165, Glu166, His172, Val186, Asp187, Arg188, Gln189

**Fonte:** O autor

A análise das ligações de hidrogênio dos complexos M<sup>pro</sup> com **LMed-136**, **LMed-137**, **LMed-110** e **LMed-117**, foi analisada durante todo o intervalo de simulação, pois é um parâmetro crucial para prever o modo de ligação do ligantes no sítio ativo de M<sup>pro</sup>, visto que essas interações desempenham um papel importante no direcionamento do inibidor ao sítio de ligação, além de contribuírem para a afinidade energia de ligação e estabilidade proteína-ligante (J. R. YUNTA, 2017).

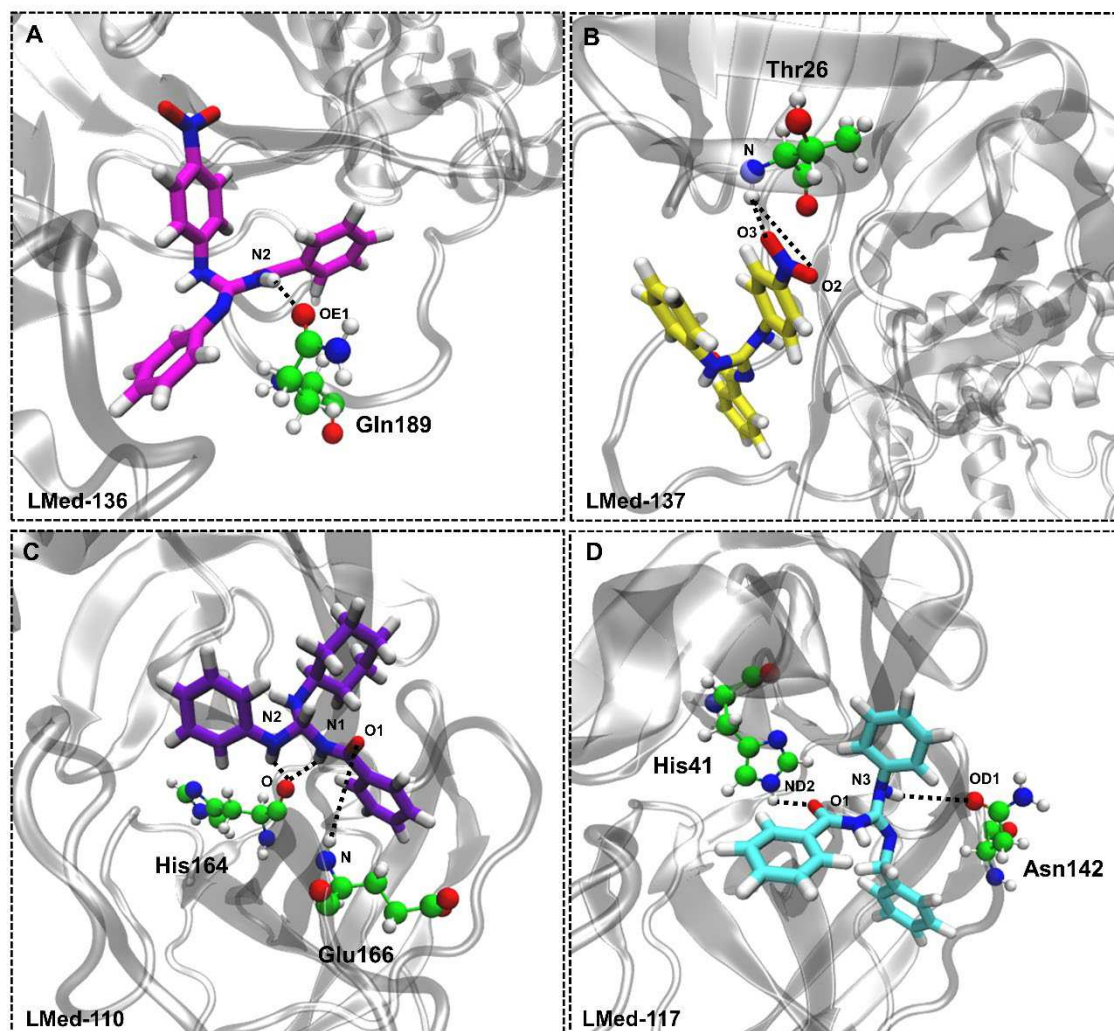
Analisando os complexos com o ligante **LMed-136** e com o seu tautômero

**LMed-137**, observou-se que ambos realizam mais interações por ligações de hidrogênio do que os ligantes **LMed-110** e **LMed-117**. Entretanto, as ligações têm um tempo de vida curto. O ligante **LMed-136 (Figura I.22A)** realizou duas ligações de hidrogênio com Gln189, uma com 42,02% de persistência e outra com tempo de vida curto (1,58%). As outras ligações de hidrogênio de vida curta são: duas com o resíduo Gly143 (1,02% e 1,06%) e duas com a histidina catalítica His41 (1,57% e 1,66%). Por outro lado, o **LMed-137 (Figura I.22B)** realiza várias ligações de hidrogênio, mas todas têm uma vida útil inferior a 10%. Entre elas, três com o resíduo Thr26 (7,10%, 6,72% e 4,29%), três com Asn51 (3,75%, 3,53% e 2,59%), uma com a His41 (2,44%), três com Asn119 (2,83%, 2,47% e 2,45%), dois com Cys145 (1,44% e 1,27%), uma com Tyr54 (1,09%) e três com Gln189 (1,55%, 1,04% e 1,01%). Novamente, devido ao curto tempo de vida dessas interações, foi possível confirmar a tendência de desprendimento desses dois ligantes no sítio ativo, conforme observado na análise de RMSD.

A análise do ligante **LMed-110 (Figura I.22C)** mostrou duas interações por ligação de hidrogênio com tempo de vida mais significativo (> 50%) com os resíduos His164 (69,39%) e Glu166 (57,48%). Além disso, His164 realizou outra interação de ligações de hidrogênio com o átomo de nitrogênio (N1) do ligante com um tempo de vida curto de 9,47%. Por fim, observou-se duas ligações de hidrogênio com um tempo de vida curto de 4,51% e 1,23% com os resíduos His41 catalítico e Asn142, respectivamente.

O **LMed -117 (Figura I.22D)** realizou ligações de hidrogênio com apenas dois resíduos. Com o resíduo Asn142, o ligante realizou uma interação por ligação de hidrogênio com tempo de vida curto (12,02%). Após 27 ns, é possível observar uma nova ligação de hidrogênio com a histidina catalítica (His41) com tempo de vida de 32,40%. Devido ao curto tempo de vida dessas interações, foi possível confirmar a tendência de desprendimento desse ligante no sítio ativo, conforme observado na análise de RMSD.

**Figura I.22:** Os modos de ligação representativo a partir da análise de cluster e interações de ligação de hidrogênio com tempos de vida mais longos (tempo de vida > 5,00%).



**Legenda:** (A) LMed -136 (rosa), (B) LMed -137 ( amarelo), (C) LMed -110 (roxo) e (D) LMed -117 (ciano).

**Fonte:** O autor.

Em projetos de descoberta de medicamentos auxiliados por computador, vários programas de *docking* molecular são utilizados para interpretar o modo de ligação e a afinidade de um ligante em relação a uma proteína. No entanto, a energia de ligação prevista pelos algoritmos de *docking* molecular não são precisas e, portanto, é imperativo empregar análises pós-*docking* para evitar falsos negativos e falsos positivos (AZAM et al., 2022).

Neste sentido, o método MM/PBSA combina cálculos energéticos baseados em mecânica molecular com cálculos de energia livre baseados em modelos implícitos

de solventes (POLI et al., 2020), sendo frequentemente usado para prever a energia de ligação precisa de um complexo proteína-ligante e os resultados obtidos podem ser explorados de forma mais racional na concepção de candidatos a fármaco.

A energia livre de ligação proteína-ligante pode ser definida como a soma das energias associadas com a interação de vácuo (energia potencial de vácuo) e interações dependentes de solvente (energias de solvatação polares e não polares), Portanto, a energia livre de ligação para cada complexo M<sup>pro</sup>-ligante foi calculada considerando o método MM/PBSA (*Molecular Mechanics/ Poisson-Boltzmann Surface Area*) (KUMARI; KUMAR; LYNN, 2014) para previsão de energia de ligação mais precisa, utilizando-se os *clusters* mais populosos (**Tabela I.4**).

**Tabela I.4:** Energia livre de ligação ( $\Delta G_{\text{binding}}$ ) para complexos M<sup>pro</sup>-ligantes.

Energia (Kcal/mol)	LMed -136	LMed -137	LMed -110	LMed -117
$\Delta E_{\text{vdw}}$	-34,59±2,18	-0,002±0,00	-37,87±2,70	-2,30±0,74
$\Delta E_{\text{eleger}}$	-6,37±2,47	0,26±0,03	-4,49±1,09	0,17±0,93
$\Delta E_{\text{solv}}$	21,14±2,28	-5,32±2,52	18,47±1,91	1,49±0,66
$\Delta E_{\text{sasa}}$	-3,80±0,22	-1,07±0,38	-4,17±0,24	-0,75±0,39
$\Delta G_{\text{binding}}$	-23,62±2,60	-6,13±2,54	-28,06±2,65	-1,39 ±0,03

$\Delta E_{\text{vdw}}$  (energia de van der Waal),  $\Delta E_{\text{eleger}}$  (energia eletrostática),  $\Delta E_{\text{solv}}$  (energia de solvatação polar),  $\Delta E_{\text{sasa}}$  (energia SASA),  $\Delta G_{\text{binding}}$  (energia de ligação).

**Fonte:** O autor

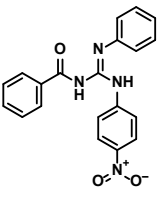
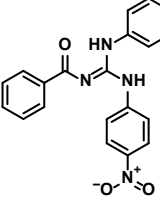
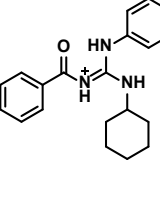
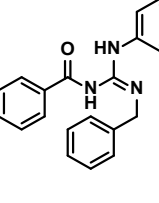
De acordo com os valores de energia livre de ligação, **LMed-110 e LMed-136** teriam melhores afinidades para M<sup>pro</sup> do que **LMed-117** e o tautômero **LMed-137**. Além disso, para todos os inibidores, as interações apolares ( $\Delta E_{\text{vdw}} + \Delta E_{\text{sasa}}$ ) seriam mais críticas para a estabilidade do complexo do que as interações eletrostáticas ( $\Delta E_{\text{eleger}}$ ). O equilíbrio apolar e polar pode estar relacionado às interações de ligação de hidrogênio, uma vez que a alta persistência de interações de ligação de hidrogênio contribui mais para a estabilidade do ligante no sítio de ligação (ALBUQUERQUE et al., 2020). O **LMed -117** tem um perfil semelhante como o **LMed-137**, o baixo valor de

energia livre de ligação pode estar relacionado à falta de interações de ligações de hidrogênio com alta persistência. Infelizmente, esse comportamento não é suficiente para manter o ligante estável no sítio ativo. Em geral, essa tendência de deslocamento das estruturas **LMed -117** e **LMed -137** para fora do sítio ativo é evidenciada pelo alto valor de RMSD. Portanto, pode-se afirmar que devido à melhor afinidade de ligação do **LMed -110** e **LMed -136**, ambos poderiam atuar como possíveis inibidores de M<sup>pro</sup> de SARS-CoV-2.

### 3.5 PREVISÕES *IN SILICO* DE PARÂMETROS DE FÁRMACO-SIMILARIDADE E FARMACOCINÉTICOS (ADME)

É de extrema relevância que os possíveis inibidores selecionados na Triagem Virtual apresentem um perfil farmacocinético adequado para serem avaliados em modelos animais. Nesse contexto, visando a realização de futuros testes *in vivo* das benzoilguanidinas (**LMed-136**, **LMed-137**, **LMed-110** e **LMed-117**), realizou-se estudo *in silico* de suas propriedades físico-químicas relacionadas à fármaco-similaridade (Regras de Lipinski e extensão de Veber) (**Tabela I.5**), o qual permite realizar uma predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral e absorção gastrointestinal de substâncias promissoras no campo de descoberta de novos fármacos (LIPINSKI, 2004; LIPINSKI et al., 1997a; VEBER et al., 2002).

**Tabela I.5:** Previsão *in silico* de propriedades físico-químicas relacionadas à fármaco-similaridade (Regras de Lipinski e extensão de Veber), e propriedades farmacocinéticas.

Propriedades				
	<b>LMed -136</b>	<b>LMed -137</b>	<b>LMed -110</b>	<b>LMed -117</b>
<b>MM (g mol<sup>-1</sup>)</b>	360,37	360,37	322,42	329,40
<b>cLogP</b>	3.20	3.25	3.44	4,00
<b>ALH</b>	4	4	1	2
<b>DLH</b>	2	2	3	2
<b>LR</b>	7	7	6	7
<b>tPSA ( Å<sup>2</sup>)</b>	99,31	99,31	55.10	53,49
<b>Num. Viol.</b>	0	0	0	0
<b>LogS</b>	-4,99	-4,99	-4,96	-5,20
<b>Absorção GI</b>	Alto	Alto	Alto	Alto
<b>Perm. BHE.</b>	Não	Não	Sim	Sim
<b>Substrato gp-P</b>	Não	Não	Não	Não
<b>Inibidor CYP1A2</b>	Não	Não	Sim	Sim
<b>Substrato CYP1A2</b>	Não	Não	Não	Não
<b>Inibidor CYPC19</b>	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Substrato CYPC19</b>	Não	Não	Não	Não
<b>Inibidor CYP2C9</b>	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Substrato CYP2C9</b>	Sim	Sim	Sim	Não
<b>Inibidor CYP2D6</b>	Não	Não	Não	Não
<b>Substrato CYP2D6</b>	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Inibidor CYP3A4</b>	Não	Não	Sim	Sim
<b>Substrato CYP3A4</b>	Não	Não	Não	Não

MM = massa molar; cLogP = log do coeficiente de partição (consenso); ALH = número de aceitadores da ligação de hidrogênio; DLH = número de doadores de ligações de hidrogênio; LR = número de ligações rotativas; tPSA = área de superfície polar topológica; Num. Viol. = número de violações das regras de Lipinski e Veber; LogS (ESOL) = log de solubilidade em água (mol L<sup>-1</sup>); Absorção GI = Absorção gastrointestinal; perm. BHE. = Permeabilidade da barreira hematoencefálica; Substrato gp-P = Substrato glicoproteína-P.

**Fonte:** O autor

As regras dos cinco de Lipinski e colaboradores (LIPINSKI, 2004; LIPINSKI et al., 1997a) são amplamente utilizadas para predizer, a semelhança de pequenas moléculas com fármacos conhecidos, assim dizem respeito a um conjunto de descritores moleculares que se relacionam à boa absorção e disponibilidade orais de um fármaco. A Regra dos Cinco de Lipinski prediz que a má absorção ou permeação é mais provável quando há mais de 5 doadores de ligação de hidrogênio, mais de 10 aceptores de ligação de hidrogênio, a massa molar é maior que 500 ou o Log calculado P (cLogP) é maior que 5 (LIPINSKI et al., 1997a, 2001). A extensão de Veber e colaboradores (VEBER et al., 2002) inclui dois novos parâmetros que são relacionados a permeabilidade e absorção, onde a substância deve apresentar 10 ou menos ligações rotáveis e área de superfície polar igual ou menor que 140 Å<sup>2</sup>, pode apresentar desta forma alta probabilidade de apresentar uma boa biodisponibilidade oral. Uma área superficial polar menor que 140 Å<sup>2</sup> correlaciona-se melhor com o aumento da taxa de permeação do que a lipofilicidade (clogP), bem como o aumento da contagem de ligações rotativas tem um efeito negativo na taxa de permeabilidade.

Após análise das propriedades físico-químicas, é possível notar que **LMed-136**, **LMed-137**, **LMed-110** e **LMed-117** não infringem essas regras, demonstrando que podem apresentar boa biodisponibilidade oral. Além disso, se enquadram nos parâmetros de Veber, indicando boa permeabilidade da membrana (VEBER et al., 2002). Além disso, os valores de LogS para **LMed-136**, **LMed-137** e **LMed-110** foram -4,99, -4,99 e -4,96, respectivamente, mostrando que os compostos têm solubilidade moderada em água.

Em relação às propriedades farmacocinéticas, os compostos devem apresentar alta absorção gastrointestinal, o que indica uma capacidade de atravessar barreiras celulares no trato GI. No que diz respeito à permeabilidade pela barreira hematoencefálica (BHE), apenas os compostos **LMed-110** e **LMed-117** poderiam ultrapassá-la, ocasionando a possibilidade de causarem efeitos adversos ou tóxicos no sistema nervoso central (SNC). Isso pode ser justificado pelo fato de a BHE permitir que os vasos sanguíneos que vascularizam o SNC regulem rigidamente o movimento de íons, moléculas e células entre o sangue e o cérebro, permitindo uma função neuronal adequada e proteção do tecido do sistema nervoso central (DANEMAN; PRAT, 2015).

A glicoproteína-P (gp-P), um transportador de efluxo de toxinas e xenobióticos para fora das células, desempenha um papel essencial na farmacocinética de vários

medicamentos, interferindo principalmente na absorção de medicamentos, resultando em baixa biodisponibilidade e/ou absorção não linear (OHASHI et al., 2019). Portanto, não são esperadas alterações relevantes na absorção desses compostos, uma vez que eles não atuariam como substrato para a gp-P.

As enzimas do citocromo P450 (CYP) são essenciais no metabolismo e eliminação de vários xenobióticos, incluindo fármacos (WASUKAN; KUNO; MANIRATANACHOTE, 2019). Aqui, foram avaliadas cinco isoformas CYP450 das famílias CYP1, CYP2 e CYP3 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4), visto que são as principais envolvidas nos metabolismos de fármacos. Após essas previsões, notou-se que **LMed-136** e seu tautômero **LMed-137** são possíveis inibidores das isoformas CYP2C19 e CYP2C9. Por outro lado, **LMed-110** e **LMed-117** podem ter interações medicamentosas mais significativas, pois provavelmente inibem quatro isoformas (CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4). Conseqüentemente, a inibição dessas isoformas pode diminuir a eficácia e aumentar os efeitos adversos e a toxicidade de fármacos coadministrados, indicando a necessidade de mais estudos para verificar a interação com fármacos metabolizados por essas enzimas.

Além disso, também verificamos se os compostos **LMed-136**, **LMed-137**, **LMed-110** e **LMed-117** poderiam atuar como possíveis substratos para CYPs. Essa previsão é útil porque, se uma substância se comporta como substrato para as CYPs, pode levar a uma baixa biodisponibilidade oral causada pelo metabolismo pré-sistêmico. Por exemplo, o nirmatrelvir, fármaco aprovado pelo FDA para o tratamento de COVID-19 é um substrato conhecido do CYP3A4, a enzima metabolizadora de fármacos mais importante (KLEIN; ZANGER, 2013), o que foi corroborado por previsões *in silico*, portanto deve ser administrado em combinação com o ritonavir (inibidor da CYP3A4) para minimizar o seu metabolismo e aumentar a sua meia-vida (FDA, 2021b). Em contraste, as previsões mostraram que nenhum dos compostos **LMed** são substratos do CYP3A4, o que pode ser considerado uma vantagem em comparação com o nirmatrelvir. No entanto, os compostos **LMed-136**, **LMed-137** e **LMed-110** poderiam ser possíveis substratos das isoformas CYP2C9 e CYP2D6, enquanto **LMed-117** é um possível substrato da isoforma CYP2D6.

Por fim, visando identificar quais seriam os átomos mais metabolicamente lábeis, foram realizadas previsões das posições de onde as reações metabólicas podem ser iniciadas pela análise dos locais de metabolismo (SOMs). O estudo mostrou que o carbono do grupo guanidínio é o mais suscetível à oxidação por

CYP2C9 e CYP2D6.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 SELEÇÃO E PREPARO DA ESTRUTURA PROTEICA E PREPARAÇÃO DOS LIGANTES N3 E 13B.

O estudo foi realizado com estruturas cristalográficas de duas M<sup>pro</sup>, uma delas complexada com o inibidor **N3** (PDB ID: **6LU7**, cadeia A, resolução 2,16 Å) (JIN et al., 2020) e a outra com um inibidor  $\alpha$ -cetoamida (**13b**) (PDB ID: **6Y2F**, cadeia A, resolução 1,95 Å) (ZHANG et al., 2020).

Os resíduos ausentes das estruturas proteicas foram adicionados usando a plataforma CHARMM -GUI (<http://www.charmm-gui.org/>) (LEE et al., 2016). Após, moléculas de água e inibidores co-cristalizados foram removidos da estrutura. Após a clivagem, o resíduo do aminoácido Cys145 e os inibidores **N3** e **13b** foram reconstruídos, fazendo as alterações necessárias.

### 4.2 QUIMIOTECA DO LASMMED

As estruturas 3D das estruturas dos ligantes pertencentes a quimioteca do LaSMMed foram desenhadas usando ChemDraw e convertidas para pdbqt usando Open Babel (O'Boyle et al., 2011). Por fim, a otimização da geometria foi realizada usando o campo de força MM2 implementado pelo ChemBio3D programa v.12.0 (PerkinElmer Informatics) (EVANS, 2014).

### 4.3 VALIDAÇÃO E TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM DOCKING MOLECULAR

Os experimentos de Triagem Virtual foram realizados usando o AutoDock Vina 1.1.2 (Trott & Olson, 2009). Inicialmente as estruturas das proteínas foram preparadas no AutoDockTools (ADT) v.1.5.6 (MORRIS et al., 2009). Todas as moléculas de água e os ligantes co-cristalizados **N3** e o  $\alpha$ -cetoamida (**13b**) foram removidos, átomos de hidrogênio polares foram adicionados e as cargas dos átomos das proteínas foram atribuídas pelos métodos de Kollman, de acordo com o protocolo previamente descrito por nosso grupo (DE CARVALHO et al., 2019; SANTIAGO-SILVA et al., 2021). Tendo em vista que a ligação covalente entre os ligantes **N3** e o  $\alpha$ -cetoamida (**13b**) com o enxofre do resíduo catalítico Cys145 foi clivada, realizou-se as correções necessárias tanto nos ligantes como nas proteínas.

Os inibidores **N3** complexado com 6LU7 e o  $\alpha$ -cetoamida (**13b**) complexado com 6Y2F foram utilizados como guia para a criação da grid box. Assim as coordenadas das grids box para a M<sup>pro</sup> foram ID: 6LU7 (x: -10,729; y: 12,417; z: 68,816) e 6Y2F (x: 10,879; y: -0,251; z: 20,753). A dimensão da grid box para ambas as proteínas foi 25 x 25 x 25 Å<sup>3</sup>, valor determinado para cobrir o sítio ativo.

O software foi configurado para retornar dez poses de ligação por ligante com exaustividade oito. Os ligantes foram classificados com base na energia de ligação (kcal/mol), as quais foram utilizadas para calcular a média aritmética da energia de ligação entre as enzimas.

O método foi devidamente validado por redocking, sendo os cálculos de RMSD realizados usando Software pyMOL (DELANO, 2002).

#### 4.4 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

Simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas usando o pacote GROMACS 2018.1 (ABRAHAM et al., 2015; BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995) com campo de força CHARMM36 (HUANG; MACKERELL, 2013) a partir da melhor pose obtida no *docking* molecular no software AutoDock4. Além disso, a preparação da topologia enzimática foi realizada conforme descrito por Albuquerque e colaboradores (ALBUQUERQUE et al., 2020), da Silva e colaboradores (DA SILVA et al., 2020) e Lima e colaboradores (LIMA et al., 2015).

A topologia do ligante foi adquirida através do servidor CHARMM General Force Field for organic moleculares (CGenFF) (<https://cgenff.umaryland.edu/initguess/>) (VANOMMESLAEGHE et al., 2009). Cada complexo proteína-ligante foi inserido e centralizado em uma caixa triclínica (dimensões da caixa: 3,982 x 4,337 x 5,086 nm; volume da caixa: 702,68 nm<sup>3</sup>), solvatado com água tipo TIP3P e, em seguida, neutralizado com íons positivos (Na<sup>+</sup>) ou íons negativos (Cl<sup>-</sup>).

Os sistemas foram submetidos a etapas de minimização de energia utilizando o método de descida mais íngreme com critério de convergência de 1000 kJ.mol<sup>-1</sup>.nm<sup>-1</sup>, seguido de gradiente conjugado até a potência 100 kJ.mol<sup>-1</sup>.nm<sup>-1</sup>.

Os sistemas minimizados foram submetidos a duas etapas consecutivas de equilíbrio, considerando 300 K de temperatura e 1 bar de pressão. Ambas as etapas foram realizadas durante um nanosegundo (ns) com restrição de posição para a

proteína e o ligante. A primeira etapa considerou o número de partículas, volume e temperatura constante (conjunto NVT), e a segunda etapa considerou o sistema como isotérmico-isobárico (conjunto NPT).

O controle de temperatura foi realizado com um termostato V-rescale (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007) e o controle de pressão com um barostato Parrinello-Rahman (PARRINELLO; RAHMAN, 1981). Primeiro, os átomos de hidrogênio no sistema foram congelados usando o algoritmo LINCS (*Linear Constraint Solver*) (HESS et al., 1997). Em seguida, as interações eletrostáticas de longa distância foram tratadas utilizando o algoritmo PME (*Particle-Mesh Ewald*) (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993; ESSMANN et al., 1995), e o raio de corte aplicado para as interações de van der Waals e de Coulomb foi de 1 nm.

Após a termalização do sistema, foram realizadas simulações de DM durante 150 ns, considerando o conjunto NPT, sem qualquer restrição de posição, usando dois femtosegundo (fs) de tempo de integração e um raio de corte para as interações a longa distância de 10 Å.

As trajetórias de simulação foram visualizadas pelo software Visual Molecular Dynamics (VMD v.1.9.3) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

Todos os complexos M<sup>pro</sup>-ligante foram avaliados em *Root Mean Square Deviation* (RMSD) e *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF) usando os módulos gmx\_rms e gmx\_rmsf disponíveis no pacote GROMACS. Os gráficos de variação de RMSD e RMSF foram traçados em função do tempo (ns) através do software XMGrace (TURNER, 2005). Além disso, a análise das ligações de hidrogênio foi avaliada com o módulo gmx\_hbond, disponível no GROMACS, associado ao programa HbMap2Grace (GOMES et al., 2009), considerando como distância de corte para as ligações de hidrogênio (DH...A) de 4,0 Å e o ângulo de corte HDA de 30°.

A análise de clustering foi realizada com o módulo gmx\_cluster, usando o método gromos. Depois disso, um total de 200 frames do cluster mais populoso foi usado para calcular a energia livre de ligação ( $\Delta G_{bind}$ ) (ALBUQUERQUE et al., 2020; DA SILVA et al., 2022).

A  $\Delta G_{bind}$  para os complexos M<sup>pro</sup>-ligante foram calculadas usando o método molecular mechanics/ Poisson-Boltzmann surface area (MM/PBSA) através do módulo gmx\_MMPBSA versão 5.1.2 (KUMARI; KUMAR; LYNN, 2014).

#### 4.5 PREVISÕES *IN SILICO* DE PARÂMETROS DE FÁRMACO-SIMILARIDADE E FARMACOCINÉTICOS

(ADME)

A análise *in silico* das propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e parâmetros relacionados à semelhança com fármacos e biodisponibilidade oral dos compostos selecionados na triagem virtual foram avaliados por filtros baseados na "Regra dos Cinco" de (LIPINSKI, 2004; LIPINSKI et al., 1997a) e extensão de (VEBER et al., 2002) usando a plataforma SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). A capacidade de inibir ou ser um substrato para uma das cinco principais isoformas das enzimas do citocromo P450 (CYP1A2 , CYP2C9 , CYP2D19 , CYP2D6 e CYP3A4) foi previsto usando o ADMETlab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/service/evaluation/cal>) (XIONG et al., 2021). Além disso, locais de predição do metabolismo (SOMP) para as cinco principais isoformas dos citocromos P450s foram previstos usando a plataforma Site of Metabolism Prediction ( <http://www.way2drug.com/SOMP>).

## 5 CONCLUSÃO

A fim de identificar possíveis inibidores de M<sup>pro</sup> do novo coronavírus SARS-CoV-2, foi realizada uma triagem virtual baseada em *docking* molecular de 313 estruturas, que compõem um espaço químico próprio, a quimioteca do LaSMMed. A partir dessa abordagem, identificou-se quatro benzoilguanidinas (**LMed-136**, **LMed-137**, **LMed-110** e **LMed-117**) com maior afinidade de ligação para M<sup>pro</sup>.

Este é o primeiro relato de benzoilguanidinas como possíveis inibidores contra M<sup>pro</sup> de SARS-CoV-2. Além disso, simulações de dinâmica molecular (150 ns) dessas quatro estruturas revelaram informações essenciais sobre as possíveis interações moleculares com o alvo molecular, como as mudanças conformacionais em relação aos resultados obtidos no *docking* molecular e a curta duração das ligações de hidrogênio. Após essas análises, **LMed-110** e **LMed-136** foram eleitos como potenciais substâncias-protótipo, considerando que realizaram ligações de hidrogênio com tempo de vida superior a 50%, o que indica uma maior afinidade pelo sítio ativo.

Por fim, avaliou-se as propriedades farmacocinéticas desses compostos usando preditores ADME *in silico*, o que indicou que o **LMed-136** apresenta propriedades semelhantes a fármacos em relação a biodisponibilidade oral, bem como boa farmacocinética de um modo geral. Nossos resultados apontam o **LMed-136** como um composto promissor, orientando-nos para as próximas etapas a serem realizadas neste trabalho.

Por fim, destacamos que este trabalho foi publicado com o título "***In silico* approach identified benzoylguanidines as SARS CoV 2 main protease M<sup>pro</sup> potential inhibitors**" na revista "Journal of Biomolecular Structure and Dynamics" (Anexo A). Além do artigo publicado, este trabalho gerou um segundo artigo de revisão intitulado **Identification of M<sup>pro</sup>-targeted SARS-CoV-2 inhibitors using molecular docking-based virtual screening**, submetido na revista "Medicinal Chemistry", o qual encontra-se em fase de revisão.

## CAPÍTULO II

### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE 4,8-DIMETOXINAFTALENIL CHALCONAS

#### 1 INTRODUÇÃO

##### 1.1 LEISHMANIOSE

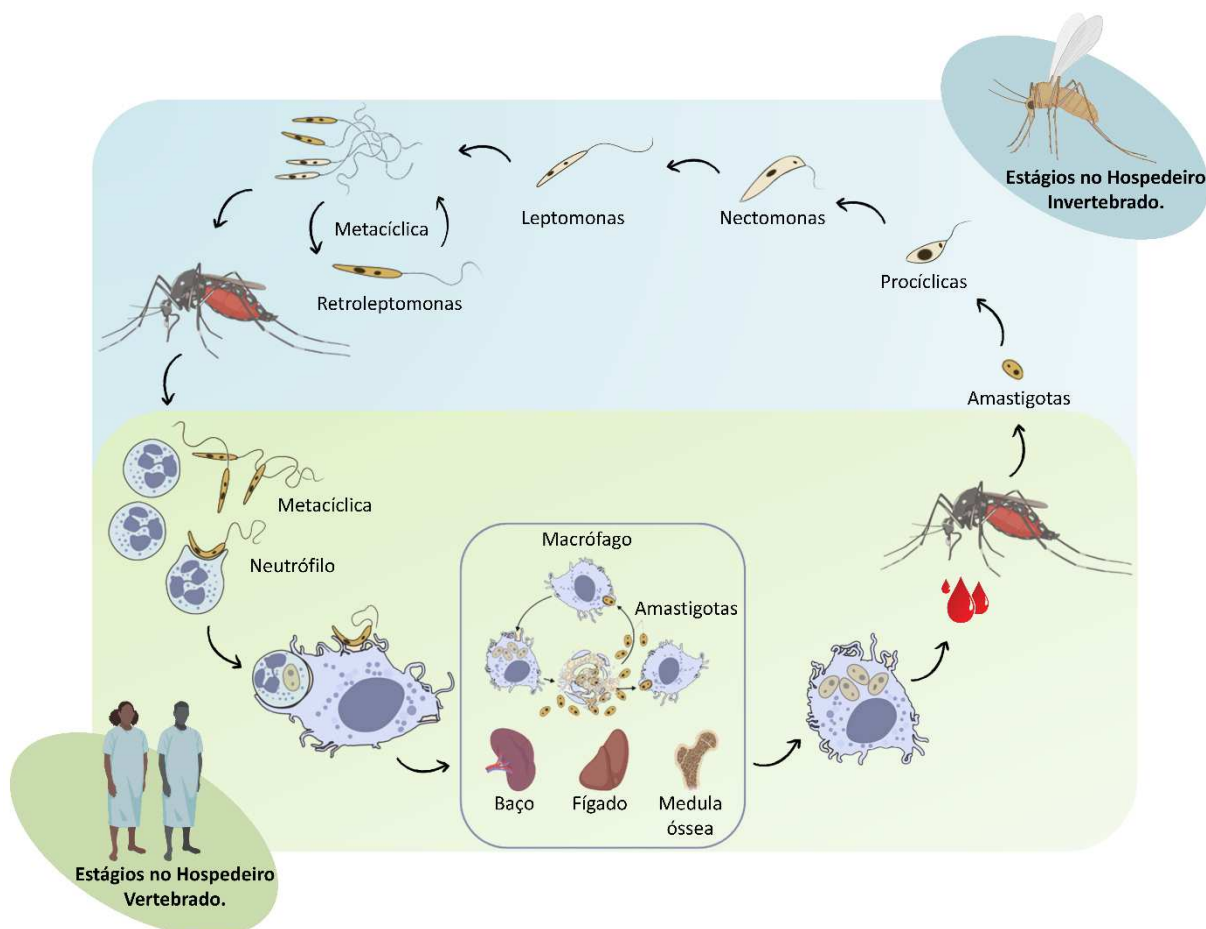
As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são um grupo diversificado de infecções predominantes em áreas tropicais, afetando assim majoritariamente comunidades pobres em regiões em desenvolvimento, sobretudo na África, Ásia e Américas. São causadas por uma variedade de patógenos, como vírus, bactérias, protozoários e vermes parasitas (helmintos) (HOTEZ et al., 2020). Essas doenças são responsáveis por uma grande morbidade e mortalidade, além de gerarem problemas econômicos para os países afetados.

Apesar do grande problema causado pelas doenças negligenciadas, entre os anos de 1975 e 1999, apenas 13 dos 1.393 medicamentos aprovados foram desenvolvidos especificamente para tratar alguma DTN, embora elas representem 11,4% da carga global de doenças (TROUILLER et al., 2002). Nos 11 anos seguintes (2000 – 2011) a situação não melhorou significativamente, uma vez que dos 850 novos agentes terapêuticos registrados, apenas 37 foram direcionados para DTN (PEDRIQUE et al., 2013). Entre 2000 e 2014, 66 novos agentes terapêuticos entraram em ensaios clínicos de fase I destinados a prevenir ou tratar DTNs, representando 1,65% dos ensaios de fase I neste período (JAIN et al., 2017). Esse baixo desempenho na descoberta de novos fármacos é reflexo da falta de um mercado lucrativo, mecanismos eficazes relacionados à política de saúde pública e baixo financiamento mundial em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) (CHATELAIN; IOSET, 2011). Nesse contexto, a leishmaniose é considerada uma doença tropical negligenciada, considerada endêmica em quase 90 países da África, Ásia, Oriente Médio, Europa, América Central e do Sul (WHO, 2023c).

Mais de 20 espécies de parasitas protozoários do gênero *Leishmania* são conhecidos como agentes etiológicos da doença, que são transmitidos ao hospedeiro vertebrado pela picada de um flebotomíneo fêmea infectado (WHO, 2023c). Portanto, o ciclo de vida desses parasitos é digenético, pois envolve dois diferentes

hospedeiros, ou seja, vetores de flebotomíneos, pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo ou ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo, e mamíferos suscetíveis, como roedores, cães e humanos. Além disso, os parasitos do gênero *Leishmanias* são protozoários dimórficos que se apresentam em duas principais morfologias. A forma promastigota flagelada reside no intestino do flebotomíneo e a forma amastigota imóvel habita o fagolisossoma ácido presente no interior dos macrófagos do hospedeiro vertebrado. A transmissão para o hospedeiro vertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo, quando o vetor infectado inocula na derme formas promastigotas metacíclicas, altamente infectantes. Posteriormente, esses parasitos são fagocitados principalmente por macrófagos. Os fagossomas contendo parasitos internalizados se fundem com lisossomos para formar fagolisossomos. As mudanças de temperatura entre o macrófago e o flebotomíneo, bem como o pH ácido do fagolisossoma, proporcionam o ambiente ideal para a conversão de promastigotas em amastigotas. Ao escapar dos mecanismos microbicidas dos macrófagos, as formas amastigotas iniciam um processo de multiplicação por divisão binária simples, eventualmente rompendo a célula e invadindo outros fagócitos mononucleares, podendo afetar diferentes tecidos e causar as diferentes manifestações clínicas da doença (**Figura II.1**) (CARTER et al., 2022).

**Figura II.1:** Ciclo biológico completo do protozoário parasita *Leishmania* spp.



**Fonte:** Adaptado de Serafim, Iniguez e Oliveira (SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA, 2020).

As manifestações clínicas da leishmaniose dependem da espécie do parasito envolvida, podendo variar desde a desfiguração física até a morte, se não for tratada. São divididas em três principais manifestações clínicas distintas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2023c).

A LC é considerada a forma mais comum da doença, sendo causada principalmente por *L. aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. tropica* (PACE, 2014). Nesta forma clínica, podem ser observadas úlceras cutâneas localizadas, únicas ou múltiplas. As lesões ulcerativas são geralmente indolores, rasas e circulares com bordas endurecidas bem definidas e um leito central de tecido de granulação que aumentam gradualmente de tamanho e podem desenvolver uma margem externa circular elevada, base granulada vermelha e exsudato amarelado na superfície ou uma escara crostosa espessa. Várias manifestações cutâneas da leishmaniose são

consideradas incomuns sendo elas LC difusa, LC disseminada e leishmaniose recidivante (BENNETT et al., 2015).

A segunda forma da doença é a LMC, que inicialmente causa sintomas como congestão nasal, coriza, desconforto, obstrução ou sangramento nasal. Entretanto, pode progredir para perfuração e eventual destruição do septo, resultando em colapso nasal, às vezes chamado de nariz de anta. A perfuração também pode ocorrer através do palato mole. O lábio superior pode estar envolvido além da mucosa bucal, faringe ou laringe (BENNETT et al., 2015). A LMC pode ser causa principalmente pelas espécies de *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis* e *L. peruviana* (PACE, 2014).

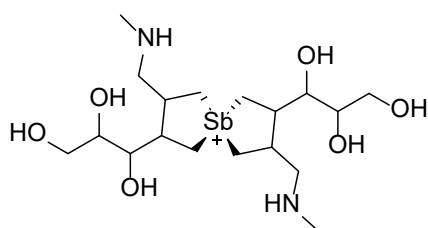
A terceira forma é a LV, também conhecida como calazar nas Américas, sendo considerada a forma mais grave da doença. É causada por *L. donovani*, *L. infantum* e *L. infantum chagasi*, no Novo Mundo (PACE, 2014). Esta forma crônica é fatal em mais de 95% dos casos, se não tratada. Os sintomas clínicos da LV incluem febre, anemia, perda de peso, diarreia, aumento do fígado e baço (hepatoesplenomegalia), redução do número de eritrócitos, leucócitos e plaquetas no sangue periférico (pancitopenia) e o aumento das imunoglobulinas (ou anticorpos) no sangue (hipergamaglobulinemia) (BENNETT et al., 2015).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para leishmaniose e correm risco de infecção. Estima-se que anualmente em todo o mundo ocorram cerca de 600 mil a 1 milhão de novos casos de LC e cerca de 50.000 a 90.000 novos casos de LV (WHO, 2023c). O Brasil é a área endêmica de maior extensão territorial que apresenta as taxas mais elevadas de notificação da doença. No período de 2018 a 2020, foram notificados ao sistema de informação de agravos de notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, 52.644 novos casos de LC e 8.880 novos casos de LV, sendo registrados 682 óbitos causados por LV neste mesmo período (SINAN, 2022).

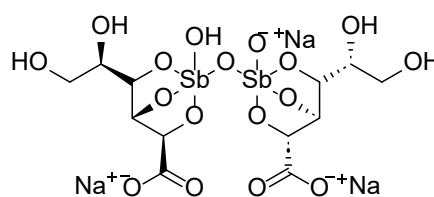
Apesar de apresentar uma ampla distribuição mundial e ser considerada um importante problema de saúde pública, não existem vacinas para a prevenção da leishmaniose em humanos. Assim, a terapia medicamentosa é crucial no combate da doença, porém os medicamentos disponíveis são limitados e apresentam diversos problemas, tais como: baixa eficácia; diversos efeitos adversos graves devido à alta toxicidade, o que pode culminar em resistência parasitaria; alto custo e necessidade de hospitalização para completar o tratamento, em consequência da dificuldade de

administração. Os principais fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose são antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®), anfotericina B (AmB), miltefosina, paromomicina e pentamidina (**Figura II.2**) (SINGH et al., 2016).

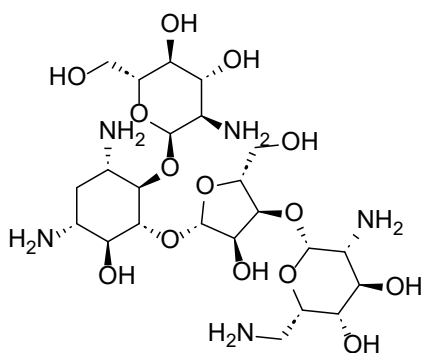
**Figura II.2:** Fármacos disponíveis para tratamento de leishmaniose.



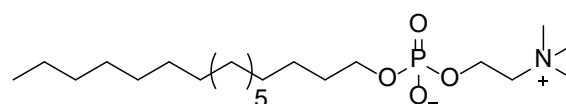
Antimoniato de meglumina



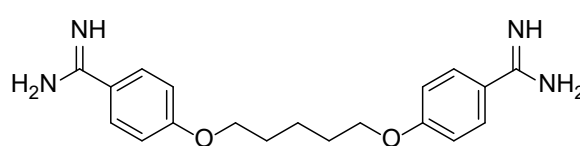
Estibogluconato de sódio



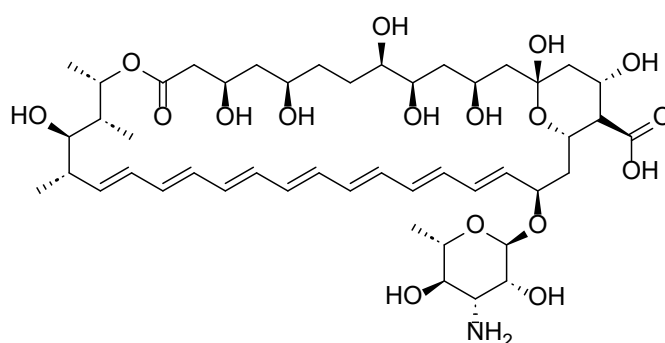
Paromomicina



Miltefosina



Pentamidina



Anfotericina B

Fonte: O autor.

Os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio) são utilizados na terapêutica para tratamento de leishmanioses desde 1945 e apresentam diversas limitações, como quadro de pancreatite durante o tratamento, pancitopenia, neuropatia periférica reversível, rigidez articular, problemas gastrointestinais, nefrotoxicidade e dor no local da aplicação. Apesar dos efeitos adversos significativos e graves associados à sua administração e da ampla

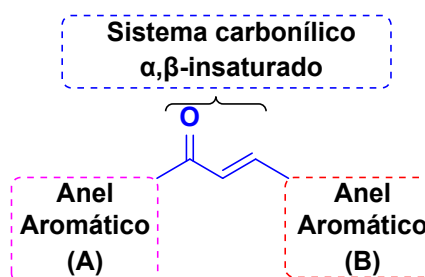
resistência aos seus efeitos antileishmania, eles ainda são usados como tratamento de primeira escolha em muitos países. Em casos em que os pacientes apresentam resistência aos antimoniais, recomenda-se o uso da AmB, um medicamento antifúngico, que apesar de sua eficácia, apresenta diversos efeitos adversos como náuseas, vômitos, diarreia e dor no estômago, dores musculares e articulares, dor de cabeça, perda de peso, hipotensão, anorexia e taquipnéia. Para superar tais efeitos, as preparações atualmente utilizadas são anfotericina B desoxicolato (Fungizone®), que causa nefrotoxicidade e outros efeitos adversos significativos, ou como formulação lipossomal (Ambisome®), que é mais segura, mas apresenta altos custos para aquisição (SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021; SINGH et al., 2016).

A paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, tem sido utilizada com algum sucesso contra LV e LC. Embora eficaz, apresenta efeitos adversos como elevação dos níveis de transaminases hepáticas, hepatotoxicidade, dor no local da injeção, náuseas, dor abdominal e diarreia. Já a pentamidina, uma diamidina aromática, apresenta taxa de cura inferior à AmB e apresenta alta toxicidade, podendo estar associada ao desenvolvimento de doenças cardíacas, hipotensão, diabetes mellitus, doenças gastrointestinais, assim, seu uso como monoterapia foi abandonado em áreas endêmicas. Atualmente, é recomendada como profilaxia secundária na coinfeção HIV-LV. Dentre todos os fármacos antileishmania disponíveis, a miltefosina é o único tratamento administrado por via oral aprovado para leishmaniose. Apesar das taxas de cura mais altas, apresenta vários efeitos adversos, como distúrbios gastrointestinais, hepatotoxicidade e toxicidade renal, além de ser teratogênica, logo não pode ser administrada em gestantes (SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021; SINGH et al., 2016).

## 1.2 CHALCONAS: DEFINIÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CHALCONAS NATURAIS E SINTÉTICAS

As chalconas, ou 1,3-diaril-2-propen-1-onas, são uma classe de substâncias na qual dois anéis aromáticos estão ligados por um sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado (**Figura II.3**). Por sua vez, esses anéis aromáticos podem ser benzênicos ou heterocíclicos com 5 ou 6 membros, contendo ou não substituintes com diferentes características estereo-eletrônicas, como halogênios, alquila, metoxila, hidroxila, nitro e muitos outros (BATOVSKA; TODOROVA, 2010).

**Figura II.3:** Estrutura geral das chalconas.



**Legenda:** Com destaque para a porção carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada (em azul) e os anéis aromáticos A (em vermelho) e B (em rosa).

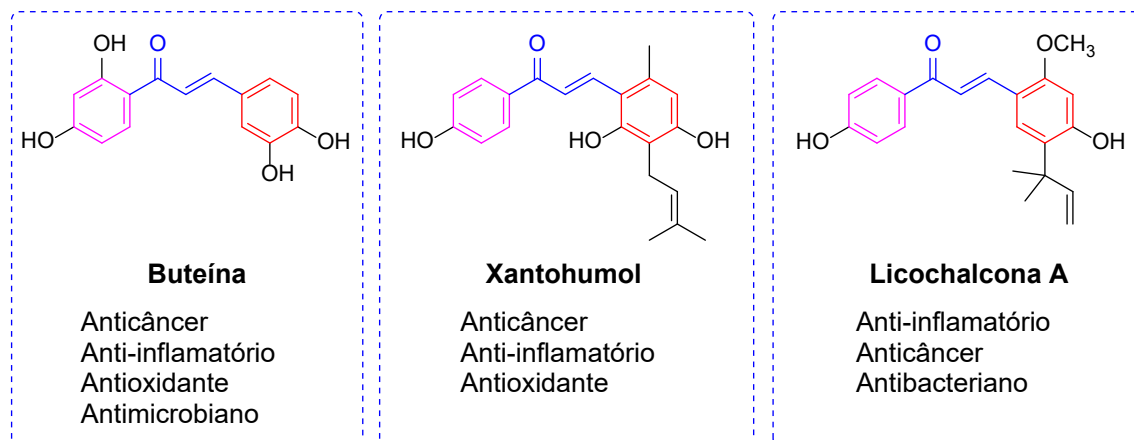
**Fonte:** O autor.

Esta classe tem sido extensivamente estudada e desperta o interesse em química medicinal e na descoberta de novos fármacos, uma vez que apresentam uma ampla diversidade de atividades biológicas já relatadas, como antileishmania (DE MELLO et al., 2018), anticancerígena (OUYANG et al., 2021), antimalárica (CHENG et al., 2020), anti-inflamatória (MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2017), antioxidante (MARTINS; FONSECA; REBELO, 2021), antibacteriana (XU et al., 2019), entre outras.

Evidências indicam que as atividades biológicas das chalconas estão diretamente ligadas à porção carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada, que pode atuar como aceptor de Michael frente a ataques nucleofílicos de grupos sulfidríla presentes em resíduos de cisteína, bem como de outros grupos tiois presentes em proteínas alvo (THAPA et al., 2021). Assim, a remoção total ou parcial deste fragmento pode levar a uma diminuição drástica ou perda completa da bioatividade (BATOVSKA; TODOROVA, 2010; K. SAHU et al., 2012).

Chalconas são encontradas em abundância na natureza. Elas são parte fundamental da biossíntese de flavonóides e isoflavonóides como precursores ou produtos, atuando na defesa da planta e nas interações planta-inseto, por exemplo (BATOVSKA; TODOROVA, 2010; RUDRAPAL et al., 2021). Licochalcona A (WANG et al., 2020b), buteína (JAYASOORIYA et al., 2018; UGAN; UN, 2020), e xantohumol (HARISH et al., 2021; TULI et al., 2022) são exemplos de chalconas obtidas por fontes naturais que possuem importantes atividades biológicas (**Figura II.4**).

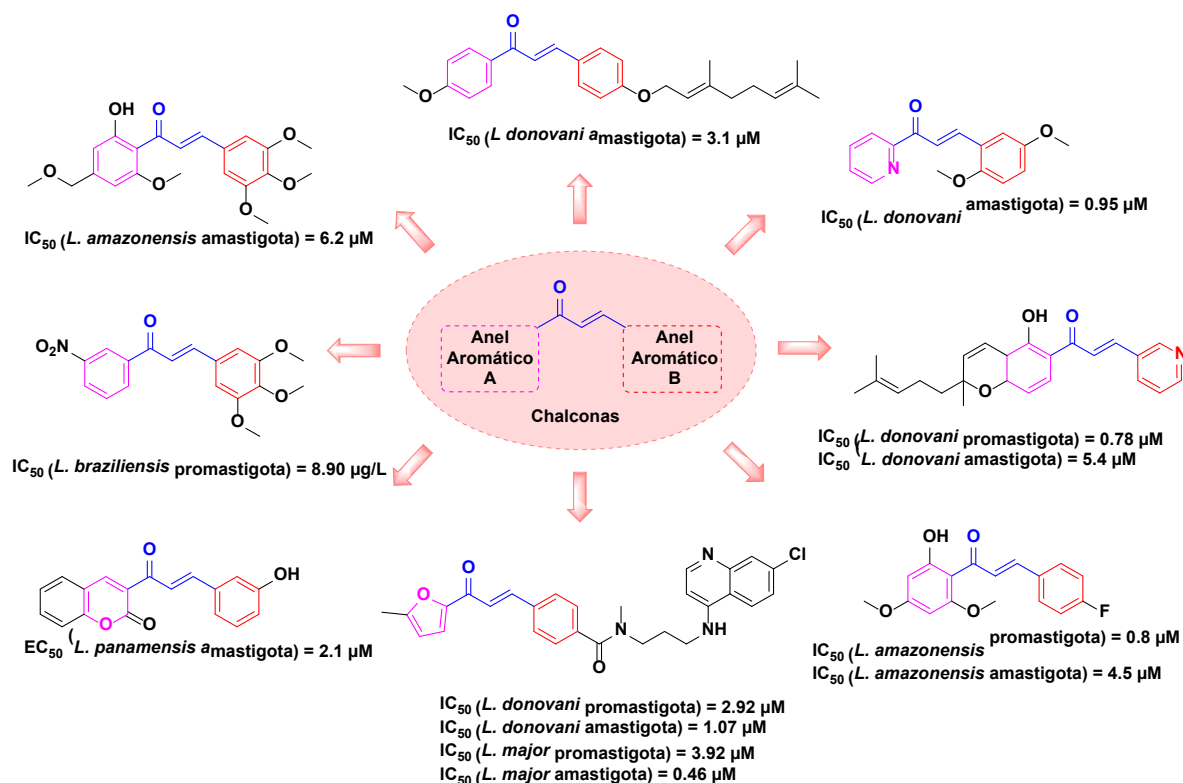
**Figura II.4:** Algumas chalconas naturais e suas atividades biológicas comuns.



Fonte: O autor.

Nas últimas décadas, novas chalconas vem sendo obtidas por meio de síntese orgânica, inspiradas pelos excelentes resultados biológicos demonstrados pelas chalconas isoladas da natureza. Atividades maiores que os análogos naturais são buscadas através de estratégias de química medicinal, buscando atividades promissoras nos mais variados alvos biológicos. Assim, as chalconas sintéticas também apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, como antifúngica, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, anticancerígena, antioxidante, antitripanossômica e antimalárica (ELKANZI et al., 2022; SINGH; ANAND; KUMAR, 2014). Além disso, derivados de chalconas (**Figura II.5**) têm potencial atividade antileishmania, mostrando-se promissores na descoberta de novos tratamentos para a leishmaniose causada por *L. donovani* (AUCAMP; N'DA, 2022; GUPTA et al., 2014; GUTTERIDGE et al., 2007; SHIVAHARE et al., 2014), *L. major* (AUCAMP; N'DA, 2022), *L. braziliensis* (MONGA et al., 2014), *L. amazonensis* (APONTE et al., 2010; BOECK et al., 2006), e *L. panamensis* (CUELLAR et al., 2022)

**Figura II.5:** Alguns derivados sintéticos de chalconas e suas atividades biológicas contra *Leishmania*.



Fonte: O autor.

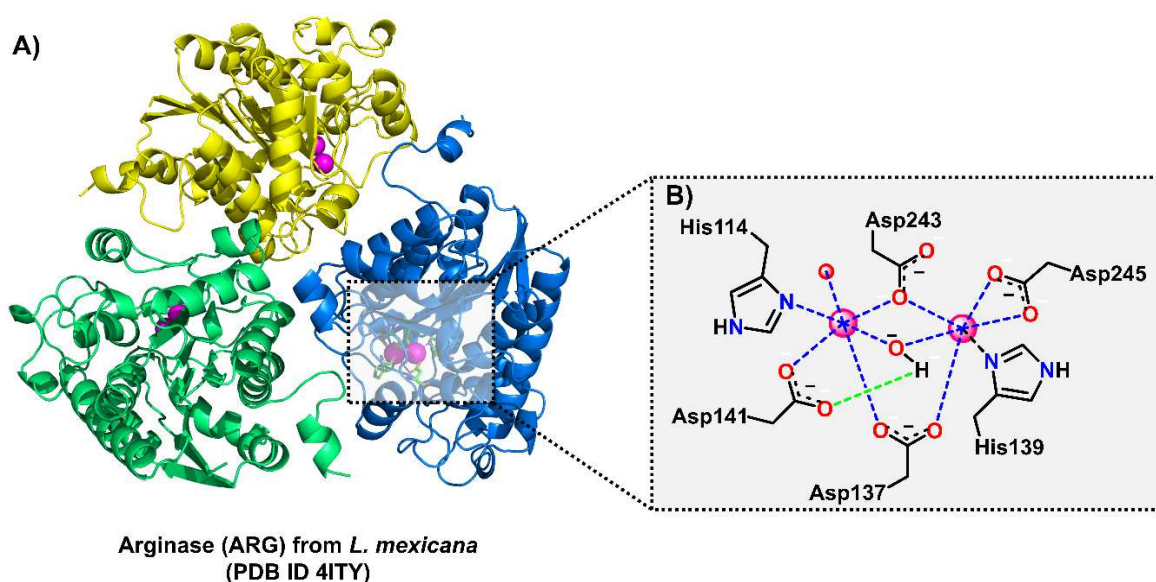
Devido esse vasto potencial antileishmania, as chalconas têm sido foco de estudos de SBDD visando a descoberta de novos fármacos. Além disso, essas estratégias visam ajudar a entender como essas chalconas podem inibir importantes alvos moleculares dentro de vias metabólicas essenciais presentes em várias fases do ciclo biológico do parasito, tais como: via glicolítica, metabolismo redox (tripanotiona), via de recuperação de purinas, biossíntese de poliaminas, biossíntese de folato, biossíntese de esterois, hipusina e glicosil fosfatidil inositol (GPI) (JAIN et al., 2022; RAJ et al., 2020). Nesse contexto, os próximos tópicos abordarão trabalhos sobre estratégias de SBDD combinadas com ensaios *in vitro* para demonstrar a atividade antileishmania dos derivados de chalconas a partir da interação com as enzimas arginase e tripanotiona redutase, dois alvos essenciais envolvidos na replicação, sobrevivência e virulência do parasito.

### 1.3 ARGINASE (ARG)

ARG (L-arginina amidinohidrolase, EC 3.5.3.1), pertencente ao ciclo da ureia,

localizada no glicosoma de promastigotas e amastigotas de *Leishmania* (DA SILVA et al., 2012), é uma metaloenzima com estrutura trimérica contendo um sítio ativo em cada monômero (**Figura II.6A**). Cada monômero apresenta dois íons de manganês ( $Mn^{2+}$ ) coordenados de forma octaédrica ou octaédrica distorcida com dois resíduos de histidina (His114 e His139), quatro resíduos de aspartato (Asp137, Asp141, Asp243 e Asp245) e dois ligantes não proteicos, um íon hidróxido na forma cataliticamente ativa e uma molécula de água (**Figura II.6B**) (D'ANTONIO et al., 2013).

**Figura II.6:** Representação cristalográfica da estrutura trimérica de *L. mexicana* ARG (PDB ID 4ITY)



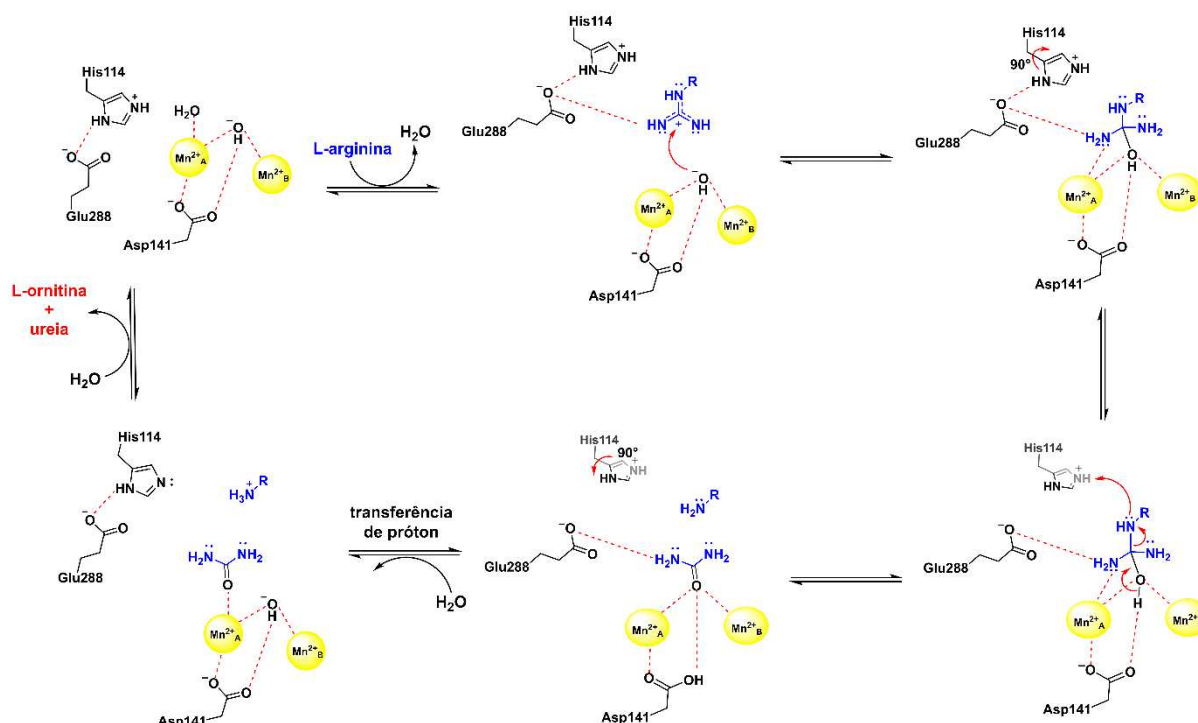
**Legenda:** A) Cada subunidade foi representada com uma cor diferente (azul marinho, amarelo e verde limão), e os íons de manganês foram representados como esferas magenta; B) A visão aproximada mostra os dois íons de manganês ( $Mn^{2+}$ ) coordenados em uma estrutura octaédrica. As esferas magenta e vermelha representam íons  $Mn^{2+}$  e uma molécula de água, respectivamente. A coordenação do metal e as interações das ligações de hidrogênio são demonstradas como linhas tracejadas azuis e verdes, respectivamente.

**Fonte:** O autor.

A ARG é a primeira enzima da via de biossíntese das poliaminas, sendo responsável por catalisar a hidrólise da L-arginina, produzindo L-ornitina e uréia (CHRISTIANSON, 2005; DA SILVA; FLOETER-WINTER, 2014). Os íons  $Mn^{2+}$  ativam uma molécula de água, formando uma ponte metálica com o íon hidróxido, que, posteriormente, ataca o carbono guanidínio da L-arginina, fornecendo assim o substrato necessário para a produção de poliaminas (**Esquema II.1**)

(CHRISTIANSON, 2005).

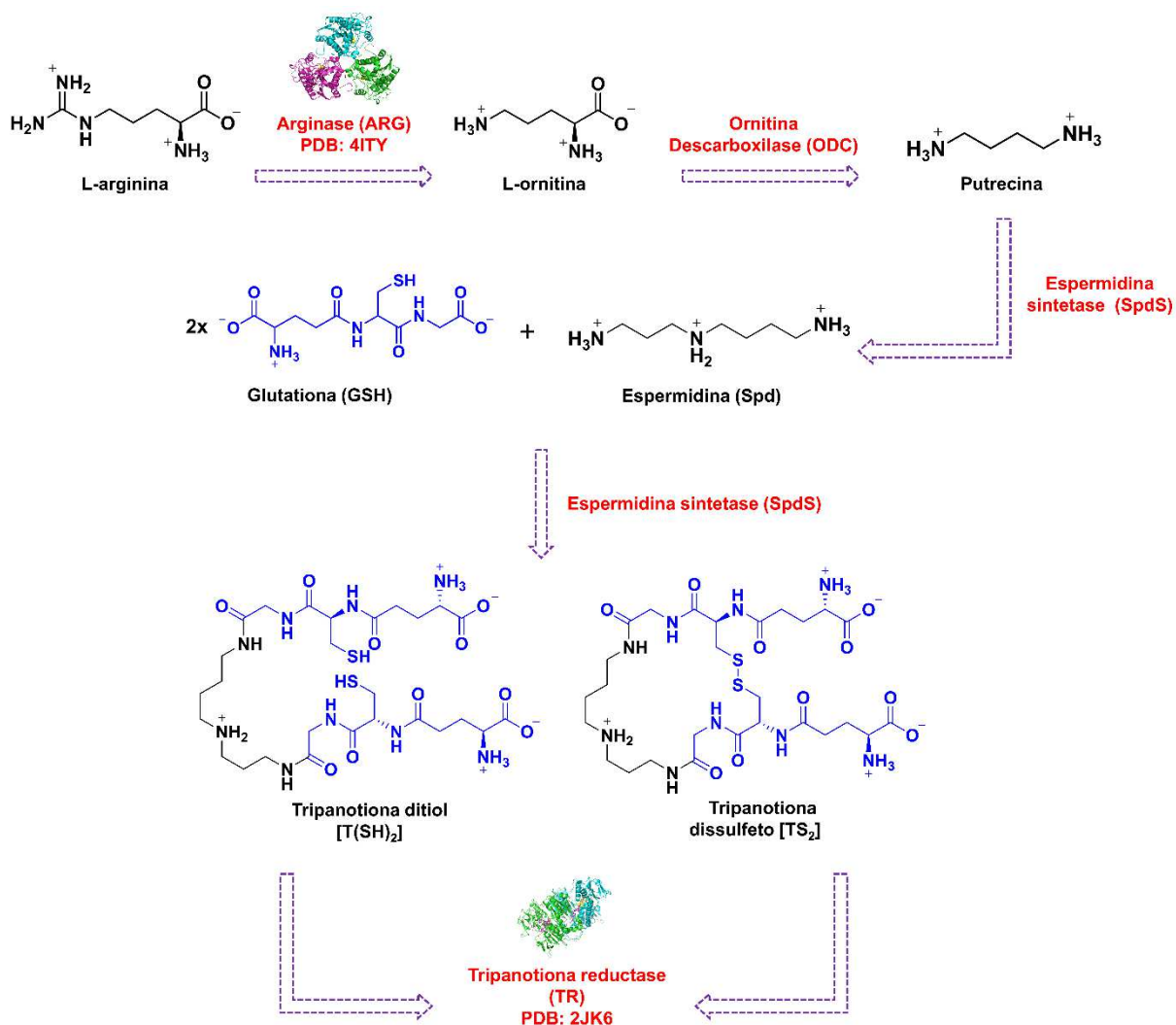
**Esquema II.1:** Mecanismo catalítico da arginase de *L. mexicana*.



**Fonte:** Adaptado do mecanismo catalítico da arginase I humana proposto por Di Costanzo e colaboradores (DI COSTANZO et al., 2005).

As poliaminas são metabólitos essenciais sintetizados como dito anteriormente, por um processo inicialmente envolvendo a ARG. Após a formação do substrato L-ornitina pela ação da ARG, ocorre a descarboxilação desse aminoácido em putrescina, a primeira poliamina da via, sendo esta etapa catalisada pela ornitina descarboxilase (ODC). Posteriormente, a espermidina sintetase (SpdS) usa putrescina como substrato para produzir espermidina (Spd). Assim a Spd e a glutathione (GSH) são substratos da tripanotona sintetase (TryS), produzindo tripanotona ( $T(SH)_2$ ). Este tiol é mantido reduzido pela tripanotona redutase (TR), uma enzima fundamental para a sobrevivência do parasito. O sistema  $T(SH)_2$ /TR está ausente no hospedeiro e contribui para a sobrevivência do parasita, pois serve para manter o balanço redox intracelular e a defesa contra espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas por macrófagos (**Figura II.7**) (COLOTTI; ILARI, 2011).

**Figura II.7:** Esquema representativo do metabolismo de poliaminas em *Leishmania* spp: da arginina à tripanotona.



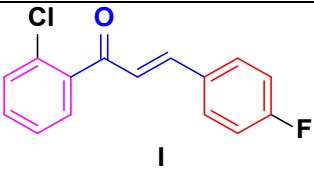
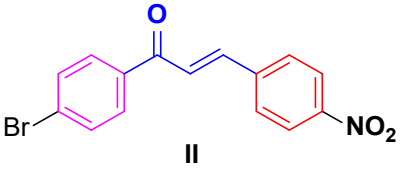
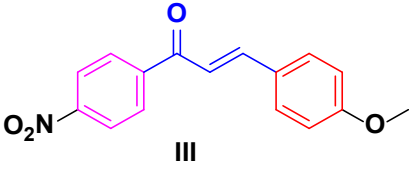
**Fonte:** Adaptado de Colotti e Ilari (COLOTTI; ILARI, 2011).

Um dos principais mecanismos de controle da *Leishmania* é a produção de óxido nítrico (NO) pelo óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS2). Como iNOS e ARG compartilham o mesmo substrato, a atividade da arginase pode efetivamente inibir processos dependentes de NO, esgotando as concentrações de substrato disponíveis para a biossíntese de NO (ACUÑA et al., 2017; CHRISTIANSON, 2005; PESSENDA; SILVA, 2020; REGUERA et al., 2009; STENGER et al., 1994). Por outro lado, a inibição da arginase pode efetivamente aumentar a biossíntese de NO, comprometendo a evasão da resposta imune do hospedeiro e afetando diretamente a replicação e infectividade do parasita (GAUR et al., 2007; REGUERA et al., 2009). Portanto, a arginase representa um alvo potencial para o tratamento da leishmaniose.

Nesse contexto, Garcia e colegas (GARCIA et al., 2021) avaliaram uma série de trinta e seis derivados de chalconas como potenciais inibidores da arginase de *Leishmania infantum* (LiARG). Dentre elas, três substâncias (**I**, **II** e **III**) exibiram os maiores valores de inibição de LiARG, sendo ( $69,5 \pm 7,9\%$ ,  $71,9 \pm 11,6\%$  e  $72,3 \pm 0,3\%$ , respectivamente (**Tabela II.1**). Os modos de ligação de **I**, **II**, e **III** apresentaram valores de ligação estimados de -4,42, -6,91 e -3,80 kcal/mol, respectivamente. Os resultados de *docking* sugerem que **I** interage com o sítio ativo do ARG através de três possíveis ligações de hidrogênio entre o átomo de oxigênio do grupo carbonila e as cadeias laterais polares dos resíduos Ser151, Asn153 e His155. Além disso, o grupo 2-clorofenil realiza interações hidrofóbicas com His140, Ala141, Ser151, Ala193 e Pro259. Em contraste, **II** forma uma ligação de hidrogênio entre seu grupo carbonila e o átomo de nitrogênio da cadeia lateral de Asn153, além de interagir por contatos hidrofóbicos com os resíduos His140, His155 e Ala193. Em relação ao ligante **III**, foram observadas três ligações de hidrogênio. Duas delas estão entre o grupo carbonila do ligante e o átomo de oxigênio das cadeias laterais dos resíduos His155 e Arg261, enquanto a terceira ocorre entre as cadeias do grupo hidroxí-imino- $\lambda$ 1-oxidanil-fenil e o nitrogênio amídico da cadeia lateral Asn153. Além disso, **III** também apresenta interações hidrofóbicas com His140.

Em relação à atividade antileishmania, a substância **I** apresentou a maior atividade contra promastigotas de *L. infantum* ( $CI_{50}$ :  $74,1 \pm 10,0 \mu M$ ), enquanto as substâncias **II** e **III** apresentaram os melhores resultados contra amastigotas intracelulares ( $CI_{50}$ :  $42,3 \pm 17,1$  e  $43,7 \pm 13,7 \mu M$ , respectivamente). Além disso, a substância **II** apresentou maior seletividade contra parasitas do que células hospedeiras (macrófagos), com índice de seletividade (IS) de 107,1, superior ao fármaco de referência anfotericina B (Fungizone®) (GARCIA et al., 2021).

**Tabela II.1:** Inibição de LiARG, atividades biológicas em *L. infantum* nas formas promastigotas (CI<sub>50-Pro</sub>) e amastigotas (CI<sub>50-ama</sub>) e índices de seletividade (IS) das chalconas I – III, relatada por Garcia e colaboradores.

Substâncias	Atividade biológica			
	Inibição LiARG	CI <sub>50-Pro</sub> ( $\mu$ M)	CI <sub>50-ama</sub> ( $\mu$ M)	IS
 <p>I</p>	69,5 $\pm$ 7,9%	74,1 $\pm$ 10,9	111,5 $\pm$ 19,8	4.3
 <p>II</p>	71,9 $\pm$ 11,6%	398,0 $\pm$ 44,2	42,3 $\pm$ 17,1	107,1
 <p>III</p>	72,3 $\pm$ 0,3%	319,1 $\pm$ 14,3	43,7 $\pm$ 13,7	26.2

Fonte: O autor.

#### 1.4 TRIPANOTIONA REDUTASE (TR)

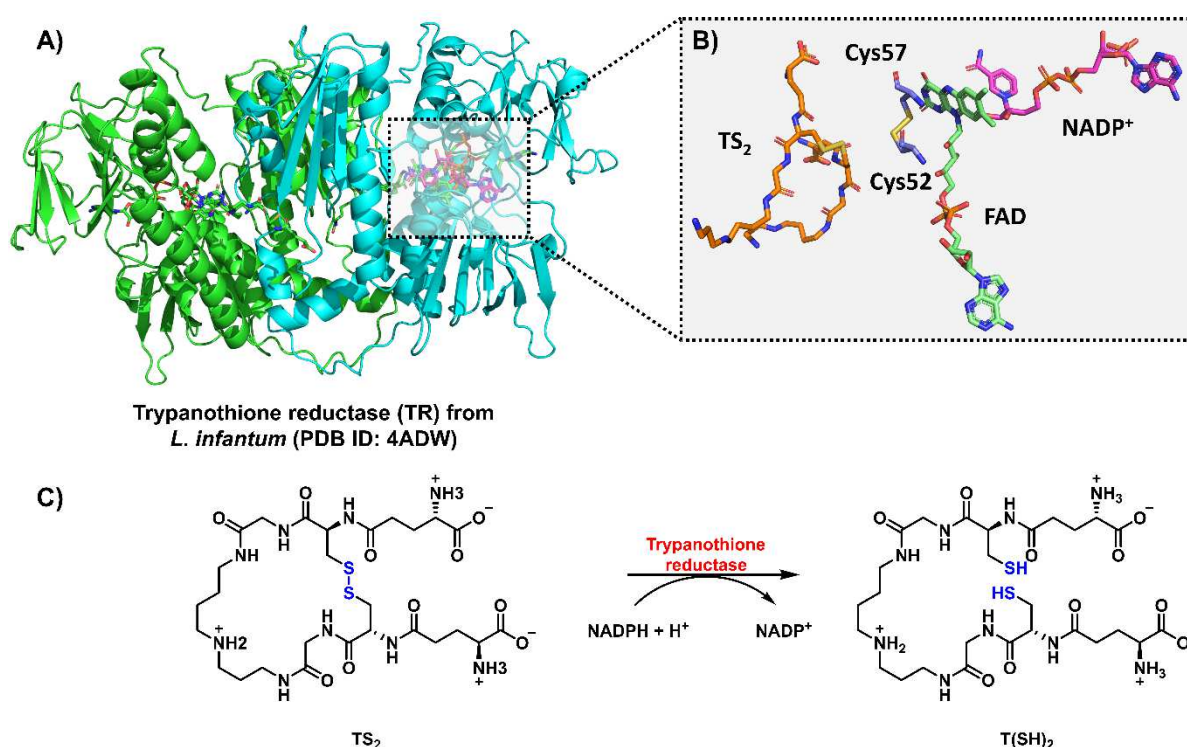
Como mencionado anteriormente, as poliaminas são essenciais para a produção do tiol tripanotiona ( $N^1, N^8$ -bis(glutationil)espermidina, T(SH)<sub>2</sub>, **Figura II.8C**), um importante antioxidante de baixo peso molecular encontrado em tripanossomatídeos, que desempenha um papel essencial na regulação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (VÁZQUEZ et al., 2017). Como a tripanotiona é necessária para a sobrevivência do parasita e está ausente no hospedeiro vertebrado, todas as enzimas envolvidas na defesa contra danos causados por oxidantes, são consideradas alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos (FAIRLAMB; CERAMI, 1992).

Nesse contexto, a tripanotiona redutase (TR) (EC 1.8.1.12) é essencial para todos os tripanossomatídeos. TR é uma flavoenzima dissulfeto redutase dependente de NADPH. Encontrada como um homodímero com dois sítios ativos idênticos (**Figura II.8A**), com três domínios: um domínio de ligação ao FAD, um domínio de ligação ao

NADPH e um domínio de interface. A flavoenzima catalisa a redução dependente de NADPH da forma tripanotiona dissulfeto ( $TS_2$ ) para a sua forma ditiol  $[T(SH)_2]$ . NADPH e  $TS_2$  se ligam a diferentes cavidades voltadas para lados opostos do anel isoaloxazina de FAD (**Figura II.8B**) (MÜLLER et al., 2003).

O mecanismo da reação depende da transferência de dois elétrons do NADPH para o anel flavina do FAD, que é reduzido e, prontamente, transfere elétrons para a ponte dissulfeto entre as cisteínas catalíticas Cys52-Cys57. Quando as cisteínas são reduzidas, o  $TS_2$  oxidado se liga à proteína, onde Cys52 ataca a ligação dissulfeto do substrato, formando um dissulfeto misto. Finalmente, o ataque de Cys57 em Cys52 permite a liberação reduzida de  $T(SH)_2$  (**Figura 9C**) (BATTISTA et al., 2020; MÜLLER et al., 2003).

**Figura II.8:** Representação cristalográfica da estrutura dimérica de *L. infantum* TR (PDB ID 4ADW)



**Legenda:** A) Cada subunidade foi representada com uma cor diferente (ciano e verde); B) Na aproximação do do sítio ativo, o substrato ( $TS_2$ , laranja), FAD (verde),  $NADP^+$  (magenta) e cisteínas catalíticas (roxo); C) Reação catalisada por TR.

**Fonte:** O autor.

Considerando que a TR é um alvo crucial para a sobrevivência do parasita e um alvo promissor para o desenvolvimento de novas terapias antileishmania, Ortalli e

colegas (ORTALLI et al., 2018) avaliaram trinta e um novos derivados de chalconas frente a *L. donovani*, dentre as quais a chalcona **IV** se destacou como a mais promissora da série ( $CI_{50}$  / 72h 3,0  $\mu$ M e IS = 200). Uma compreensão funcional e estrutural do mecanismo de inibição foi obtida por simulações de *docking* molecular da substância **IV** (**Figura II.9**) nos estados reduzido (PDB ID 4ADW) e oxidado (PDB ID 2JK6) da TR de *L. infantum*, exibindo energia de ligação de -7,63 kcal/mol ( $K_i$  = 2,56  $\mu$ M) e -6,66 kcal/mol ( $K_i$  = 13,19  $\mu$ M), respectivamente. Além disso, observou-se que a substância **IV** se liga a TR nos estados oxidado e reduzido na mesma cavidade hidrofóbica junto às duas cisteínas catalíticas (Cys52 e Cys57), estabelecendo ligações de hidrogênio com os resíduos Lys61, Glu467 e Ser470. Além disso, a avaliação *in vitro* da inibição da atividade enzimática revelou que a composto **IV** inibe competitivamente a ligação de dissulfeto de tripanotona ( $TS_2$ ) a TR com  $K_i$  na ordem de  $0,45 \pm 0,11$   $\mu$ M (ORTALLI et al., 2018).

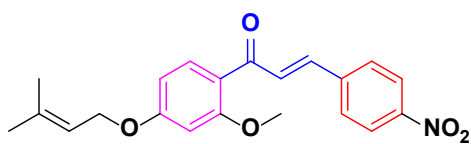
No trabalho de Wazir e colegas (WAZIR et al., 2018) foi relatado que a chalcona **V** (**Figura II.9**) mostrou promissora atividade antileishmania *in vitro* contra formas promastigotas de *L. tropica* ( $CI_{50}$  = 0,81  $\mu$ g/L) em comparação com o medicamento de referência antimoniato de meglumina ( $CI_{50}$  de 7,44  $\mu$ g/mL). Estudos de citotoxicidade *in vitro* destacaram que o composto não tem efeito tóxico sobre os glóbulos vermelhos humanos. Assim, por meio de estratégias de *docking* molecular, os autores puderam investigar as possíveis interações do composto com o sítio ativo da cadeia A da enzima TR. O *docking* molecular relatou que o composto interage favoravelmente com a enzima com uma pontuação de -6,318 kcal/mol. A análise detalhada do modo de inibição do composto revelou que o átomo de oxigênio do grupo nitro ( $NO_2$ ) presente na posição *meta* do anel B do ligante, representado em vermelho na **Figura II.9**, estabelece uma ligação de hidrogênio com os resíduos Thr51 e Cys52, assim como o nitrogênio forma uma ponte salina com resíduo Asp327. Também é possível observar que o oxigênio da carbonila estabelece uma ligação de hidrogênio com o resíduo Lys60, além do forte empilhamento  $\pi - \pi$  do anel A do ligante, representado em rosa na **Figura II.9**, com o grupo fenil do Trp198 resíduo. Além disso, o átomo de cloro na posição *para* do anel B estabeleceu uma ligação de halogênio.

Ünver e colegas (ÜNVER et al., 2019) identificaram dois novos derivados de chalcona contendo bases de Schiff e tiofeno em suas estruturas (**VI** e **VII**, **Figura II.9**) que apresentaram concentrações inibitórias mínimas (CIM) de 2.500 e 10.000  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> contra formas promastigotas de *L. infantum*, respectivamente. Portanto, os autores

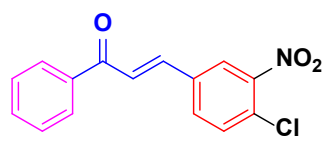
decidiram investigar as possíveis interações dos compostos com o domínio de ligação ao FAD da TR. Os resultados de *docking* molecular revelaram boas interações com o alvo, onde o composto **VI** apresentou maior afinidade pelo sítio de ligação, pois obteve um valor de pontuação menor (-10,989 kcal/mol) que o composto **VII** (-10,674 kcal/mol). A análise das interações com a enzima indicou que o composto **VII** realiza ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos Asp35, Asn179 e Arg290. Além disso, o resíduo Tyr198 realiza uma interação  $\pi - \pi$  com o grupo benzila do composto **VII**. O composto **VI** demonstrou o mesmo número de ligações de hidrogênio, com resíduos Ser178, His461 e Ala365. Essas interações podem ser relevantes para alterar a função catalítica da enzima e levando à sua inibição.

Osman et al. (OSMAN et al., 2022) relataram a síntese e atividade antileishmania de cinco derivados de chalcona obtidos pela reação de Claisen-Schmidt. O estudo mostrou que a chalcona mais promissora **VIII** (**Figura II.9**) apresentou atividade antileishmania *in vitro* promissora contra as formas promastigotas de *L. donovani*, com  $CI_{50}$  da ordem de  $0,03 \pm 0,16 \mu M$ , com toxicidade mínima e boa biodisponibilidade oral. Utilizando técnicas de *docking* molecular e simulações de dinâmica molecular, os autores investigaram se a atividade observada ocorre via inibição da enzima TR. A estrutura terciária do TR de *L. donovani* foi modelada por homologia utilizando o servidor SWISS-Model. Os resultados de *docking* revelaram que a chalcona **VIII** interage com alta afinidade (-8,6 kcal/mol) com o sítio ativo do TR através de uma ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio do grupo carbonila com o resíduo Thr335. Além disso, foram formadas ligações pi-enxofre e pi-alquila entre o grupo fenila da chalcona com os resíduos Ser14, Cys57, Tyr198, Ile199, Asp327 e Ala338. Adicionalmente, simulações de dinâmica molecular revelaram a estabilidade e flexibilidade do complexo formado. Este relato demonstra a importância do núcleo de chalcona no desenvolvimento de novas terapias e propõe que a chalcona **VIII** pode ser um potencial novo candidato para o tratamento da leishmaniose visceral.

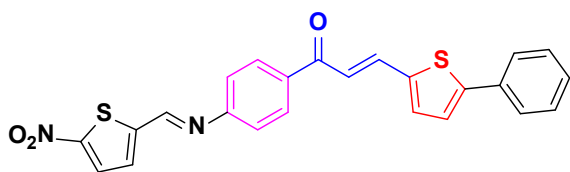
**Figura II.9:** Derivados de chalconas (IV – VIII) e suas atividades inibitórias e biológicas contra *Leishmania* spp, frente a TR.



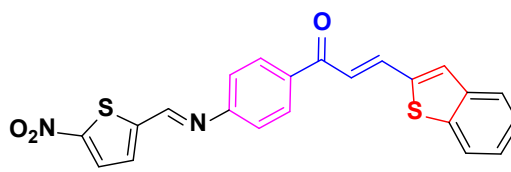
IV

%Inibição = 0.45  $\mu$ M $IC_{50}$  (*L. donovani* promastigota) = 3.0  $\mu$ M $IC_{50}$  (*L. donovani* amastigota) = 14.0  $\mu$ M

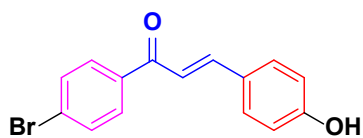
V

 $IC_{50}$  (*L. tropica* promastigota) = 0.81  $\mu$ g/L

VI

CIM (*L. infantum* promastigota) = 2.500  $\mu$ g/mL

VII

CIM (*L. infantum* promastigota) = 10.000  $\mu$ g/mL

VIII

 $IC_{50}$  (*L. donovani* promastigota) = 0.03  $\pm$  0.16  $\mu$ M

Fonte: O autor.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Por meio de ensaios *in vitro* e estudos *in silico*, avaliar o potencial antileishmania de 4,8-dimetoxinaftalenil chalconas frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- ✓ Avaliação *in vitro* da atividade antileishmania de nove 4,8-dimetoxinaftalenil chalconas frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- ✓ Determinar a citotoxicidade *in vitro* das chalconas frente linhagens celulares de macrófagos murinos J774A.1;
- ✓ Elucidar mecanismos de morte celular induzido pelas substâncias mais promissoras sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- ✓ Avaliação *in vitro* das substâncias mais promissoras frente macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*;
- ✓ Realizar estudo *in silico* das substâncias mais promissoras para avaliar parâmetros farmacocinéticos teóricos relacionados à biodisponibilidade oral, absorção intestinal e toxicidade;
- ✓ Realizar estudo de *docking* molecular das substâncias mais promissoras frente as enzimas arginase (ARG) e tripanotona redutase (TR).

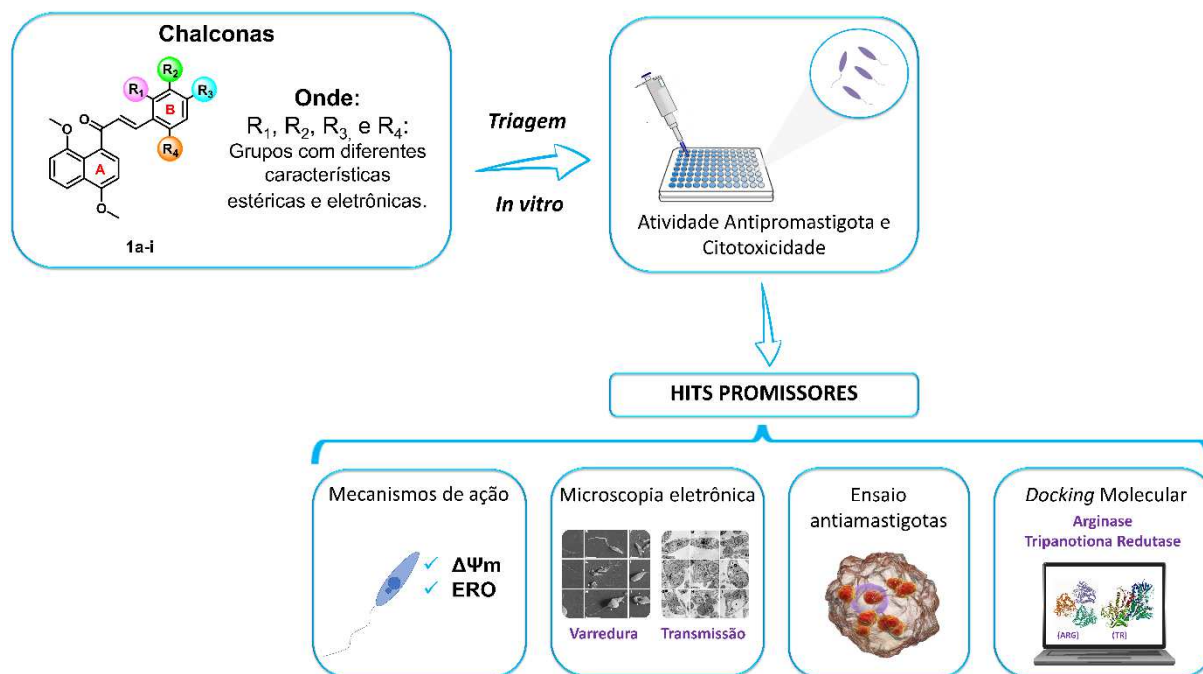
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA *IN VITRO* DOS DERIVADOS DE 4,8-DIMETOXINAFTALENIL CHALCONA (**1A–I**)

Tendo em vista a importância dos derivados de chalconas no campo da Química Medicinal e o seu destacado potencial antileishmania reportado na literatura, tais substâncias podem ser apontadas como interessantes pontos de partida para a descoberta de novos fármacos no combate às leishmanioses. Assim nosso grupo de pesquisa se sentiu encorajado a avaliar uma série de nove 4,8-dimetoxinaftalenil chalconas (**1a–i**), as quais foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Raoni Schroeder B. Gonçalves (Laboratório de Catalise e Síntese Orgânica – Universidade Federal do Rio de Janeiro). Essas substâncias foram sintetizadas em rendimentos que variaram de 15 a 73% e foram devidamente caracterizadas por técnicas espectroscópicas (OLIVEIRA, 2020)

Assim, o potencial antileishmania dos derivados de chalcona contendo a porção 4,8-dimetoxinaftalenil foi avaliado *in vitro* frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*, bem como suas citotoxicidades em linhagens celulares de macrófagos murinos (J774A.1). O potencial das substâncias foi estimado com base em seus valores de concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) e índice de seletividade (IS). Em seguida, realizou-se ensaios biológicos *in vitro* como despolarização mitocondrial, geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e análises morfológicas e ultraestruturais, visando a elucidação dos mecanismos de ação das substâncias mais relevantes frente as formas promastigotas. Na sequência, avaliou-se tais substâncias frente as formas amastigotas. Posteriormente, com o intuito de realizar futuros testes *in vivo*, calculou-se *in silico* as propriedades físico-químicas relacionadas à fármaco-similaridade e propriedades farmacocinéticas dos possíveis agentes antileishmania selecionados. Por fim, foram realizadas simulações de *docking* molecular em dois alvos essenciais de *L. amazonensis*, ARG e TR (**Figura II.10**).

**Figura II.10:** A abordagem do planejamento experimental para a avaliação da atividade antileishmania de derivados de 4,8-dimetoxinaftalenil chalcona (**1a-i**).



**Fonte:** O autor.

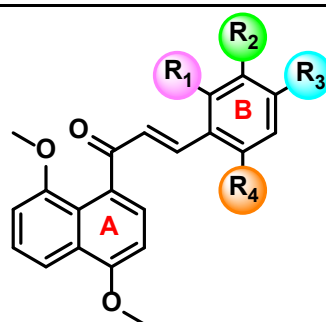
Inicialmente, o efeito antileishmania das chalconas sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliado *in vitro* por meio da determinação da proliferação de parasitos incubados com diferentes concentrações (10, 25, 50 e 130  $\mu\text{M}$ ) por 24 h. Essa espécie se encontra amplamente distribuída em todo o território brasileiro, sendo capaz de produzir um amplo espectro de doenças em humanos, tais como a leishmaniose cutânea e mucocutânea (BARRAL et al., 1991).

A avaliação da citotoxicidade é tão importante quanto a atividade antileishmania. Portanto, a viabilidade celular das substâncias **1a-i** foi avaliada através do método desenvolvido por Mosmann, baseado na oxidação mitocondrial de macrófagos murinos, que utiliza o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) como corante vital. O mecanismo envolve reações com enzimas redutoras tais como as desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente viáveis, que clivam o anel de tetrazólio, convertendo o reagente MTT, de coloração amarelada, em um composto de coloração rósea, chamado de formazano (*E,Z*-1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano). Os cristais de formazano são insolúveis e se acumulam próximo a membrana plasmática, embora também se encontrem no meio de cultura, é necessário que essa substância seja

solubilizada para que as medidas de absorvâncias sejam tomadas, permitindo a mensuração de atividade mitocondrial pela mudança de coloração do meio de amarelado para róseo (MOSMANN, 1983).

Baseado nos resultados de inibição dos parasitos, expressos em termos de  $CI_{50}$ , e da citotoxicidade em macrófagos murinos, expressos em termos de concentração citotóxica média ( $CC_{50}$ ), ambos expressos em micromolar ( $\mu M$ ), calculou-se o índice de seletividade (IS), que mensura o quanto uma substância é ativa contra o parasito sem causar danos às células de mamíferos (**Tabela II.2**).

**Tabela II.2:** Atividade antileishmania *in vitro* contra formas promastigotas ( $CI_{50}$ ), citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) e índices de seletividade (IS).



**1a-i**

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	$CI_{50}$ ( $\mu M$ ) <sup>a</sup>	$CC_{50}$ ( $\mu M$ ) <sup>b</sup>	IS <sup>c</sup>
<b>1a</b>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	264,1 ± 0,12	414,8 ± 0,04	1,7
<b>1b</b>	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	67,1 ± 0,16	246,7 ± 0,03	3,7
<b>1c</b>	H	Cl	Cl	H	13,4 ± 0,08	194,3 ± 0,06	14,5
<b>1d</b>	Cl	H	H	Cl	94,1 ± 0,06	126,8 ± 0,09	3,4
<b>1e</b>	Cl	H	Cl	H	37,7 ± 0,06	561,1 ± 0,03	5,9
<b>1f</b>	H	H	NO <sub>2</sub>	H	3,3 ± 0,34	372,9 ± 0,04	112,6
<b>1g</b>	H	NO <sub>2</sub>	H	H	14,5 ± 0,09	366,0 ± 0,13	23,2
<b>1h</b>	H	H	H	H	26,1 ± 0,09	872,3 ± 0,13	33,44
<b>1i</b>	H	H	Br	H	24,3 ± 0,05	434,0 ± 0,05	17,8
<b>AmB</b> <sup>d</sup>	-----	-----	-----	-----	0.68 ± 0,21	49,72 ± 0,00	73,17

**Legenda:** <sup>a</sup> Valores de uma concentração inibitória de 50% de parasitas ( $CI_{50}$ ),  $CI_{50} \pm EPM$ . <sup>b</sup> Valores da concentração de citotoxicidade de 50% de macrófagos ( $CC_{50}$ ),  $CC_{50} \pm EPM$ . <sup>c</sup> IS = índice de seletividade ( $CC_{50}/CI_{50}$ ). <sup>d</sup> A anfotericina B foi utilizada como medicamento de referência.

**Fonte:** O autor

Analisando a **Tabela II.2**, nota-se que as atividades antipromastigota variaram amplamente, com valores de  $CI_{50}$  variando de  $3,3 \pm 0,34$  a  $264,1 \pm 0,12$   $\mu\text{M}$ . No entanto, todas as substâncias **1a–i** não mostraram toxicidade para células de mamíferos, mostrando valores de  $CC_{50} > 100$   $\mu\text{M}$ , o que reflete em substâncias com valores de  $IS > 10$ , como **1c**, **1f**, **1g**, **1h** e **1i**. Isso demonstra que essas substâncias são mais tóxicas para o parasito do que para as células hospedeiras, logo são mais seletivas ao parasito.

Além disso, os resultados obtidos (**Tabela II.2**) permitiram a realização de uma análise preliminar da relação estrutura-atividade (SAR) dessa série de chalconas. Por exemplo, evidenciou-se que a presença de grupos doadores de elétrons no anel B, como o grupo metoxila, leva a uma diminuição da atividade antileishmania em comparação com o derivado não-substituído **1h** ( $CI_{50} = 26,1 \pm 0,09$   $\mu\text{M}$ ). No entanto, esta diminuição foi menor para o derivado *meta*-metoxilado, **1b**, ( $CI_{50} = 67,1 \pm 0,16$   $\mu\text{M}$ ) do que para o derivado *para*-metoxilado (**1a**;  $CI_{50} = 264,1 \pm 0,12$   $\mu\text{M}$ ). Os efeitos de diferentes grupos retiradores de elétrons, como bromo (em **1i**), cloro (em **1c**, **1d** e **1e**) e nitro (em **1f** e **1g**) também foram investigados. Para a substância **1i**, a presença do átomo de bromo levou a um pequeno aumento na atividade ( $CI_{50} = 24,3 \pm 0,05$   $\mu\text{M}$ ). Com relação aos derivados clorados dissustituídos (**1c–e**), observou-se que a presença de pelo menos um átomo de cloro na posição *orto* (**1d** e **1e**) promove um aumento nos valores de  $CI_{50}$  ( $CI_{50} = 94,1 \pm 0,06$  e  $37,7 \pm 0,06$   $\mu\text{M}$ , respectivamente), que podem estar associados ao efeito *orto* sobre a atividade biológica (FUJITA, 1981). Isso é mais evidente para a substância, que possui dois átomos de cloro nas posições *orto*, sendo a menos ativa das substâncias substituídas por cloro. A substância **1c**, sem cloro na posição *orto*, apresentou a melhor atividade dentre os derivados clorados e foi ainda mais ativo do que os derivados não-substituído (**1h**) e bromado (**1i**). Para os derivados nitrados **1f–g** foram encontradas boas atividades, sendo o derivado *para*-nitrado **1f** o mais ativo da série ( $CI_{50} = 3,3 \pm 0,34$   $\mu\text{M}$ ), sendo quase cinco vezes mais ativo do que o derivado *meta*-nitrado ( $CI_{50} = 14,5 \pm 0,09$   $\mu\text{M}$ ).

Esta análise mostra que a substância **1f** é a mais promissora em termos de atividade ( $CI_{50} = 3,3 \pm 0,34$   $\mu\text{M}$ ). Além disso, é importante destacar que nossa substância apresentou uma toxicidade muito menor quando comparada ao fármaco de referência (AmB) resultando em um índice de seletividade de 112,6, que é 1,5 vezes mais seletivo em comparação a anfotericina B (73,17). Esse potencial pode ser corroborado por evidências da literatura que apontam que na descoberta de fármacos

para leishmanioses, os critérios para eleger um composto promissor são:  $CI_{50} < 10 \mu M$  e  $IS \geq 10$  (KATSUNO et al., 2015).

### 3.2 MECANISMO DE AÇÃO EM PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS*

Devido ao potencial apresentado nos ensaios preliminares de atividade antileishmania, a substância **1f** foi selecionada para ser submetida a outros ensaios *in vitro*, visando a compreensão de seu possível mecanismo de ação em formas promastigotas, que incluíram a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) e a despolarização da membrana mitocondrial.

A relevância desses ensaios é baseada no fato de que a resposta mais efetiva dos macrófagos contra a infecção por *Leishmania* spp é mediada pela produção de moléculas microbidas tóxicas, como ERO e óxido nítrico (NO). Essas espécies desencadeiam um mecanismo bem estabelecido para eliminar o parasita, levando à resolução da infecção e eliminação do parasita sem danificar as células hospedeiras (FANG, 2004). Ademais, é bem conhecido que altas concentrações de ERO podem causar efeitos nocivos nas mitocôndrias, levando a uma redução no potencial de membrana. Como essa organela é essencial para a produção de ATP, sua disfuncionalidade leva à morte do parasita (SMIRLIS et al., 2010).

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado através do corante éster etílico de tetrametil-rodamina (TMRE), um corante fluorescente vermelho de permeabilidade celular, carregado positivamente, que se complexa com mitocôndrias ativas devido à sua carga negativa relativa. As mitocôndrias despolarizadas ou inativas têm um potencial de membrana diminuído e não conseguem sequestrar o TMRE. Por sua vez, a perda significativa do potencial de membrana torna as células exauridas, acarretando morte subsequente (CROWLEY; CHRISTENSEN; WATERHOUSE, 2016).

Os resultados mostraram que o tratamento com a substância **1f** (**Figura II.11A**) reduz o potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), tendo em vista a diminuição da intensidade de fluorescência total da sonda catiônica de TMRE em comparação com o controle, indicando comprometimento da membrana mitocondrial. No entanto, nenhuma diferença foi encontrada nas duas concentrações testadas ( $CI_{50}$  e  $2 \times CI_{50}$ ).

Considerando a disfunção mitocondrial observada em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **1f**, avaliou-se a produção de ERO usando o método de

conversão da sonda não-fluorescente diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>CFDA) em uma substância fluorescente denominada 2,7-diclorofluorescina (DCF), que se apresenta como um excelente indicador de espécies oxidantes como peróxidos, superóxidos, e óxido nítrico (GUNASEKAR et al., 1995). Assim, após a realização desses ensaios, observou-se um aumento substancial nos níveis intracelulares de ERO após tratamento (**Figura II.11B**).

Sabe-se que parasitas do gênero *Leishmania* possuem uma única mitocôndria, sendo esta organela essencial para a sobrevivência do parasito, pois desempenham um papel central no metabolismo energético, uma vez que durante a fosforilação oxidativa, os elétrons são movidos através da cadeia respiratória mitocondrial e um gradiente de prótons é estabelecido através da membrana mitocondrial interna como fonte de energia para a produção de adenosina trifosfato (ATP). Portanto, danos irreversíveis e disfunção dessa organela vital tem consequências desastrosas em sua sobrevivência (FIDALGO; GILLE, 2011; MONZOTE; GILLE, 2010).

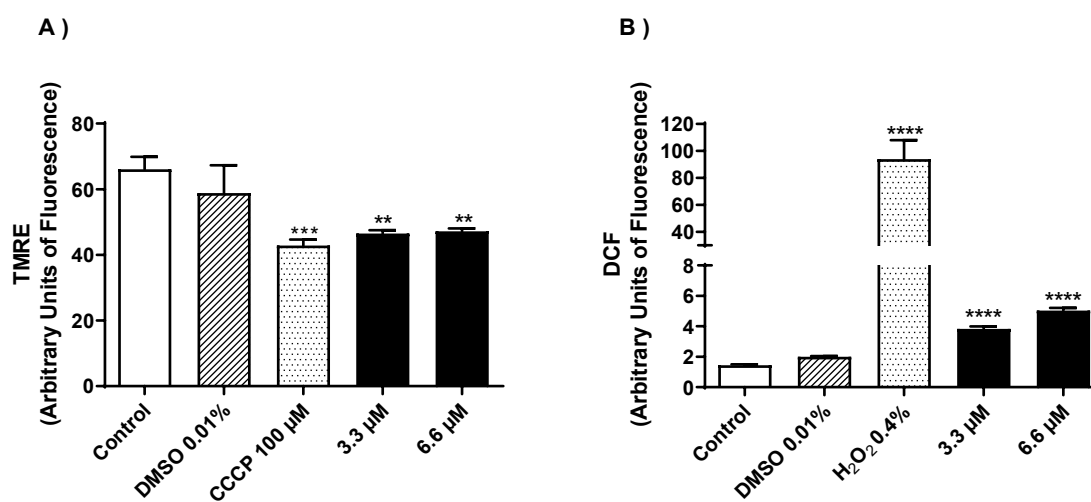
A mitocôndria desempenha um papel fundamental na orquestração da apoptose, um processo controlado de autodestruição e dependente de energia, que exhibe características morfológicas e bioquímicas específicas, como encolhimento celular, bolhas na membrana plasmática, perda do potencial de membrana mitocondrial, condensação da cromatina e fragmentação nuclear, sendo um mecanismo-chave para induzir a morte celular programada (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972)

Embora a despolarização mitocondrial seja crítica, é a elevação subsequente nos níveis de ERO geradas a partir da mitocôndria que desempenha o papel de efetores citotóxicos na apoptose. Nas espécies de *Leishmania* há um nível basal de ERO mantido pelas mitocôndrias dentro das células para sinalização fisiológica. O início da disfunção mitocondrial devido à ruptura de sua integridade estrutural causa vazamento na cadeia de transporte de elétrons e, portanto, eleva os níveis de ERO (KATHURIA et al., 2014).

Agentes antileishmania induzem estresse oxidativo causando efeitos deletérios na mitocôndria, ocasionando uma redução no potencial de membrana que define sua funcionalidade, gerando ERO (KATHURIA et al., 2014). As ERO são importantes moléculas microbicidas que combatem a infecção por patógenos, o que, por sua vez, induz a morte de protozoários, sendo um dos componentes fundamentais para desencadear a morte por apoptose (SMIRLIS et al., 2010).

Portando, esses ensaios sugerem que **1f** poderia induzir a morte celular programada em *L. amazonensis* por disfunção mitocondrial, causando uma elevação de ERO em níveis citotóxicos dentro das células.

**Figura II.11:** Efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. amazonensis* e produção de ERO induzida pelo tratamento com **1f**.



**Legenda:** Os parasitos foram tratados por 24 h com a substância **1f** ( $Cl_{50}$  e  $2 \times Cl_{50}$ ). **(A)** determinação de ROS usando fluorescência DCF, **(B)** ensaios TMRE do potencial de membrana mitocondrial.

\*\* Diferença significativa em relação ao controle ( $p \leq 0,01$ ), \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ) e \*\*\*\* ( $p \leq 0,0001$ ).

**Fonte:** O autor

### 3.3 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS EM PROMASTIGOTAS

A fim de aprimorar o entendimento acerca do mecanismo de indução de morte celular, avaliou-se as alterações morfológicas (formato da célula, comprimento do flagelo) e ultraestruturais (organelas) provocadas nas formas promastigotas de *L. amazonensis* pelo tratamento com **1f** por meio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), respectivamente.

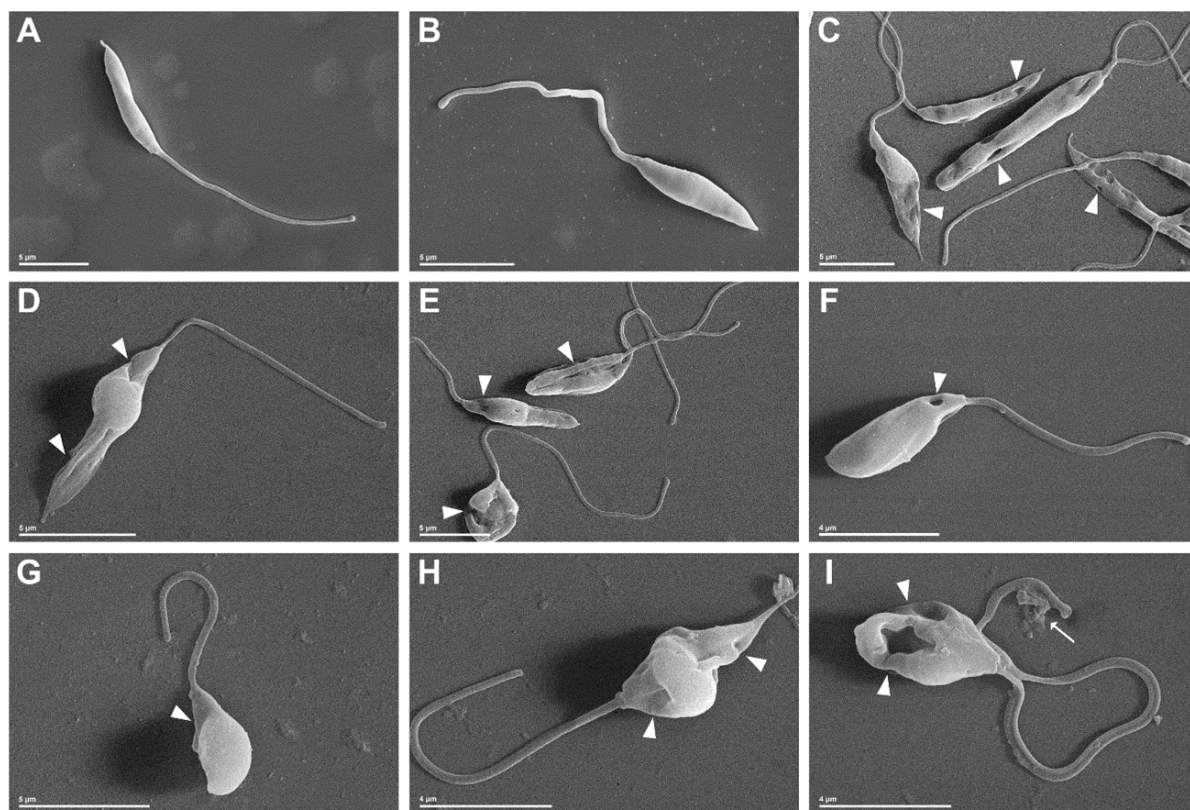
O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um instrumento que cria imagens ampliadas que revelam informações em escala microscópica sobre tamanho, forma, composição, cristalografia e outras propriedades físicas e químicas de uma amostra. O princípio operacional básico do MEV envolve a criação de um feixe de elétrons energéticos finamente focalizados por meio de emissão de uma fonte de elétrons. Esse feixe varre a superfície da amostra, interagindo com a matéria, gerando

diferentes tipos de sinais, fornecendo assim informações sobre a morfologia e composição química da amostra (GOLDSTEIN et al., 2018).

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) é um instrumento que realiza uma análise da microestrutura interna da amostra, avaliação de nanoestruturas como partículas, fibras e filmes finos e imagens de átomos. Nesta técnica, um feixe de elétrons energéticos é transmitido através de uma amostra e a interação dos elétrons com a amostra gera uma imagem da estrutura interna da amostra. O MET oferece uma resolução significativamente melhorada ( $0,0001 \mu\text{m}$ ), cerca de uma a duas ordens de grandeza superior à do MEV (KOHL; REIMER, 2008).

Analisando as micrografias obtidas por MEV, nota-se que os parasitas não tratados (**Figura II.12A**) e aqueles tratados com DMSO (0,01%) (**Figura II.12B**) exibiram características normais, compatíveis com um corpo alongado, flagelo proporcional ao tamanho do corpo, superfície celular lisa e intacta e morfologia bem preservada. No entanto, parasitas tratados com **1f** nas concentrações de  $3,3 \mu\text{M}$  (**Figura II.12C – F**) e  $6,6 \mu\text{M}$  (**Figura II.12G – I**) por 24 h mostraram alterações morfológicas, como forma arredondada e redução do tamanho do corpo celular, rugosidade da superfície celular e danos na região do flagelo.

**Figura II.12:** Alterações morfológicas em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com  $CI_{50}$  3,3  $\mu$ M e  $2\times CI_{50}$  6,6  $\mu$ M de **1f** por 24 h, analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

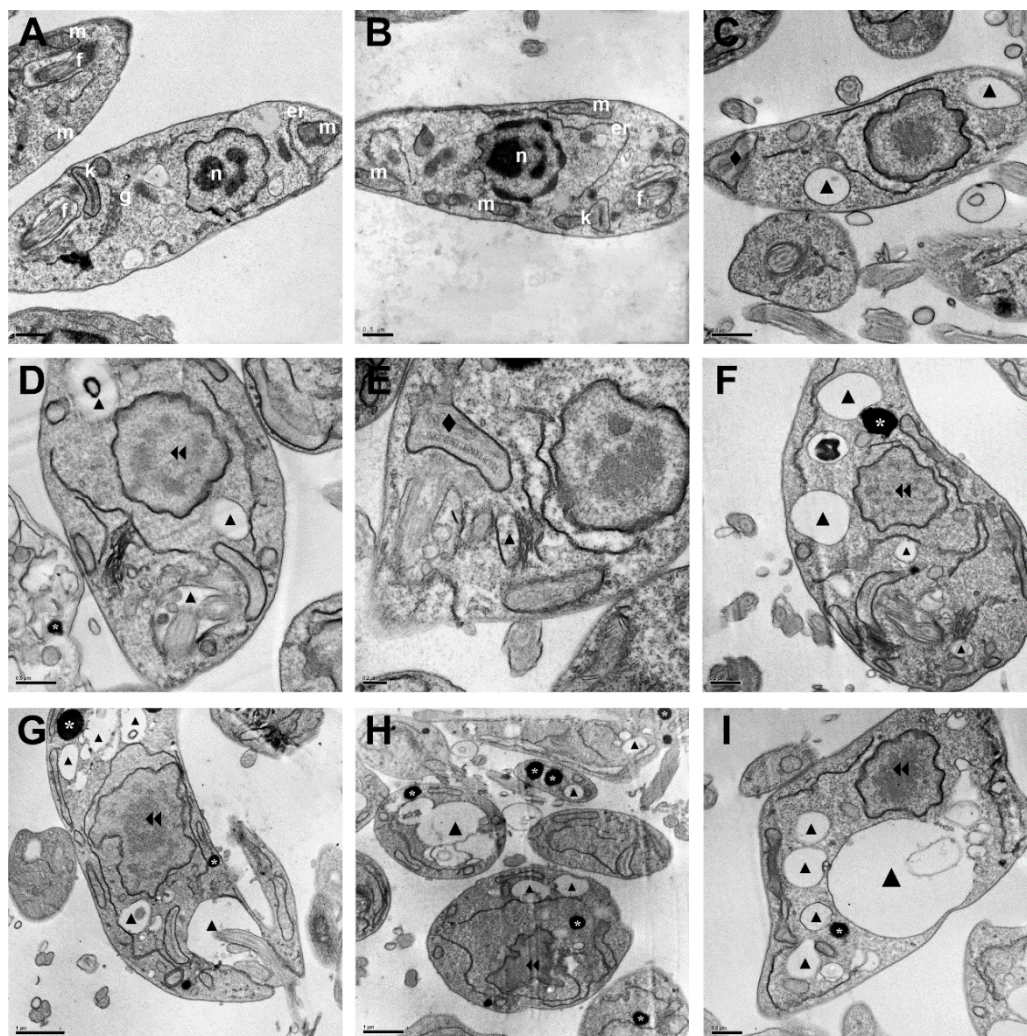


**Legenda:** (A) promastigotas não tratadas, (B) promastigotas tratadas com veículo (DMSO 0,01%), (C – F) promastigotas tratadas com  $CI_{50}$  3,3  $\mu$ M de **1f**, (G – I) promastigotas tratadas com  $2\times CI_{50}$  6,6  $\mu$ M de **1f**. (seta branca) lesão na região do flagelo (triângulo branco) lesão da membrana plasmática. Barras de escala = 5  $\mu$ m (A – E, G) e 4  $\mu$ m (F, H, I).

**Fonte:** O autor

A análise por MET evidenciou que tanto os parasitas não tratados (**Figura II.13A**) quanto os tratados com DMSO (0,01%) (**Figura II.13B**) tinham estruturas bem preservadas do núcleo, mitocôndrias, cinetoplasto, região do flagelo e aparelho de Golgi. No entanto, o tratamento com concentrações crescentes de **1f** sendo 3,3  $\mu$ M (**Figura II.13C – F**) e 6,6  $\mu$ M (**Figura II.13G – I**) por 24 h mostrou um aumento nos vacúolos autofágicos, acúmulo de corpos de armazenamento de lipídios, inchaço mitocondrial e alterações nucleares.

**Figura II.13:** Alterações ultraestruturais em promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com  $Cl_{50}$  3,3  $\mu$ M e  $2 \times Cl_{50}$  6,6  $\mu$ M de **1f** por 24 h, analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET).



**Legenda:** (A) promastigotas não tratadas, (B) promastigotas tratadas com veículo (DMSO 0,01%), (C – F) promastigotas tratadas com  $Cl_{50}$  3,3  $\mu$ M de **1f**, (G – I) promastigotas tratadas com  $2 \times Cl_{50}$  6,6  $\mu$ M de **1f**. (er) retículo endoplasmático, (f) flagelo, (g) aparelho de Golgi, (k) cinetoplasto, (m) mitocôndria, (n) núcleo, (▲) vacúolos autofágicos, (\*) corpos de armazenamento de lipídios, (◆) inchaço mitocondrial, (▶▶) alteração nucleares. Barras de escala = 1  $\mu$ m (G, H), 0,5  $\mu$ m (A – D, F, I) e 0,2  $\mu$ m (E).

**Fonte:** O autor

Alterações morfológicas e ultraestruturais em promastigotas de *L. amazonensis* induzidas por **1f** foram estudadas usando microscopia eletrônica, que continua sendo o padrão para diagnosticar a natureza da morte celular. As observações das alterações morfológicas e ultraestruturais revelaram que o tratamento com **1f** resultou

em características morfológicas típicas de apoptose, como redução do corpo celular, flagelação irregular, existência de alterações nucleares como núcleo picnótico e inchaço mitocondrial (BRITTA et al., 2014; NETO et al., 2011), além da produção de ERO observado no ensaio bioquímico.

Entretanto, a hipótese de um processo autofágico não pode ser descartada, tendo em vista que encontramos evidências morfológicas de autofagia. A autofagia é um processo biológico envolvido na manutenção do ciclo de vida do parasita, remoção de componentes celulares danificados e modulação da imunidade do hospedeiro através da formação de estruturas denominadas vacúolos autofágicos. Esse processo pode ser ativado durante o estresse celular, que é causado por um aumento na produção de ERO. Embora a autofagia possa servir como um mecanismo de proteção contra a apoptose, a autofagia excessiva pode resultar em morte celular (LOCKSHIN; ZAKERI, 2004).

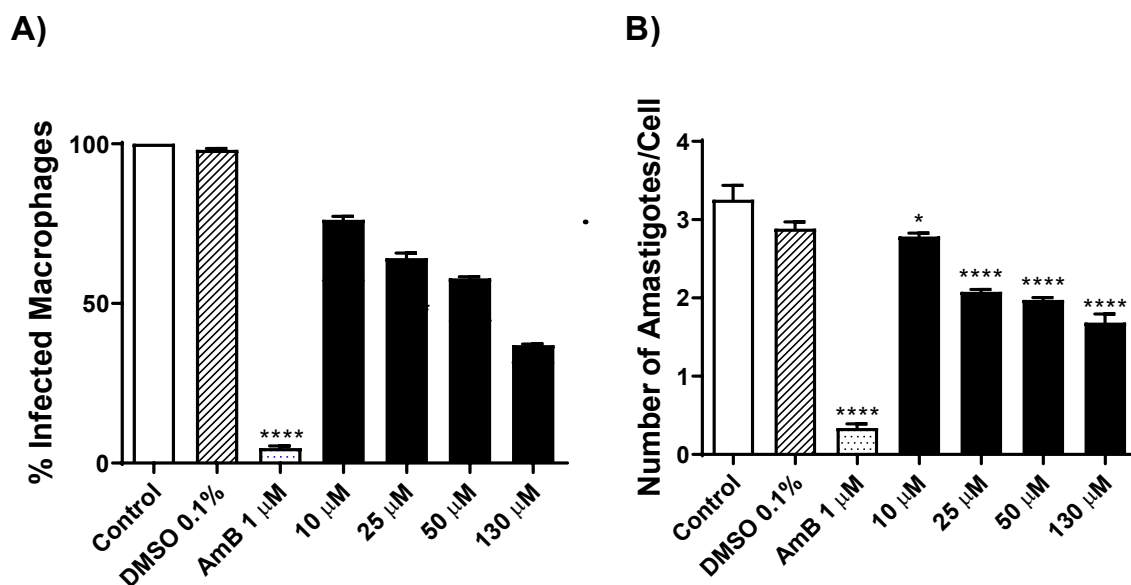
Outro efeito importante da substância **1f** sobre os parasitos foi o acúmulo de corpos lipídicos intracelulares, indicando alterações nos fosfolipídios e no conteúdo de esteróis (GODINHO et al., 2013).

#### 3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA EM *L. AMAZONENSIS* - FORMAS AMASTIGOTAS INTRACELULARES

Um fármaco destinado ao tratamento da leishmaniose deve ter como alvo principal as formas amastigotas (intramacrofágica), sendo capaz de realizar a redução do número de parasitos dentro do hospedeiro. Portanto, o efeito antiamastigota da substância **1f** em macrófagos infectados por *L. amazonensis* também foi investigado (**Figura II.14**). Os resultados mostraram que 24 h após a infecção, os grupos controle negativo e veículo (DMSO) foram semelhantes com  $98,09 \pm 0,44\%$  e  $96,97\% \pm 0,85\%$  de macrófagos infectados, respectivamente. O tratamento com **1f** nas concentrações de 10, 25, 50 e 130  $\mu\text{M}$  levou a reduções para  $23,81 \pm 1,07\%$ ,  $35,78 \pm 1,59\%$ ,  $42,15 \pm 0,49\%$  e  $63,04 \pm 0,35\%$ , respectivamente (**Figura II.14A**). Além disso, o número de amastigotas por macrófago também foi reduzido para  $14,14 \pm 0,04\%$ ,  $36,20 \pm 0,02\%$ ,  $39,33 \pm 0,03\%$  e  $45,27 \pm 0,10\%$  (**Figura II.14B**) em relação aos controles, respectivamente. Notavelmente, o  $\text{CI}_{50}$  de **1f** para amastigotas intracelulares foi de  $18,5 \pm 1,19 \mu\text{M}$ . Analisando os resultados no estágio intracelular, a substância **1f** reduziu significativamente a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago em todas as concentrações testadas (10 – 130  $\mu\text{M}$ ). O

fármaco de referência (AmB) resultou em redução de  $95,25 \pm 0,65\%$  na porcentagem de macrófagos infectados e reduziu em  $89,55 \pm 0,05\%$  o número de amastigotas por macrófago.

**Figura II.14.** Efeito da chalcona **1f** em macrófagos infectados por *L. amazonensis*. Macrófagos infectados por *L. amazonensis* foram tratados por 24 h com 10, 25, 50 e 130  $\mu\text{M}$ .

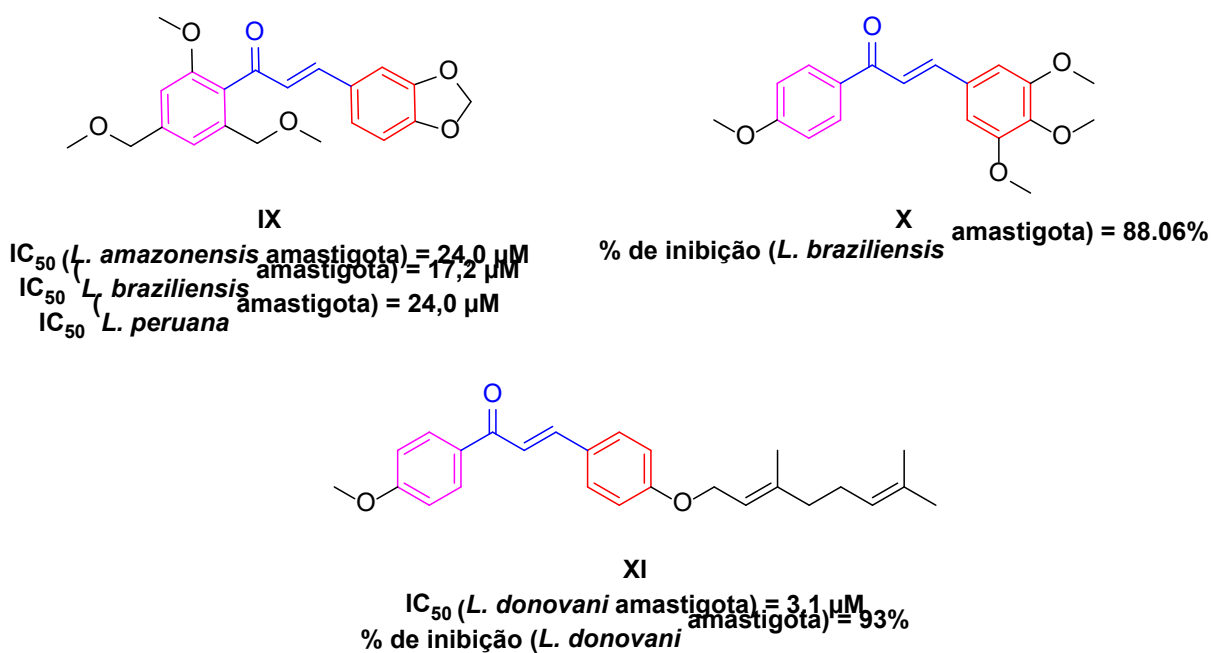


**Legenda:** (A) a porcentagem de macrófagos infectados e (B) o número de amastigotas por macrófago foram avaliados. Controle (macrófago infectado), veículo (DMSO 0,1%) e AmB (1  $\mu\text{M}$ ) foram usados como controles positivos. Os valores representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. \* Diferença significativa em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ), \*\*\*\* ( $p \leq 0,0001$ ).

**Fonte:** O autor

Esses resultados são semelhantes aos de outros estudos sobre formas amastigotas de *L. braziliensis* (DE MELLO et al., 2014), *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. peruviana* (APONTE et al., 2010), *L. donovani* (GUPTA et al., 2014), confirmando que as chalconas, em geral, possuem boa atividade antileishmania (**Figura II.15**).

**Figura II.15:** Derivados sintéticos de chalconas e suas atividades biológicas contra formas amastigotas de *Leishmania*.



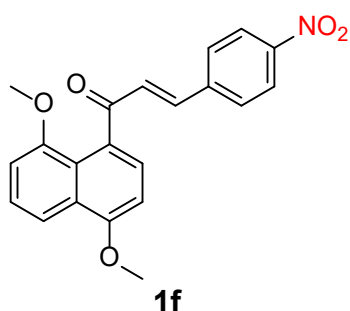
Fonte: O autor.

### 3.5 ESTUDO IN SILICO PARA PREVER PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS E DE TOXICIDADE PREVISÃO DE ADME

Em seguida, foram realizadas análises *in silico* das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas para prever o comportamento da substância **1f** em organismos vivos (**Tabela II.3**).

**Tabela II.3.** Previsão *in silico* das propriedades físico-químicas (Regra 5 de Lipinski e extensão de Veber), farmacocinética e toxicidade do **1f**.

	#	1f
Físico-química	MM (g·mol <sup>-1</sup> ) (≤500) *	363,36
	cLog P <sub>ow</sub> (≤5) *	3,53
	ALH (≤10) *	5
	DLH (≤5) *	0
	ALH + DLH (≤12) *	5
	LR (≤10) *	6
	tPSA ( ≤140 Å <sup>2</sup> ) *	81,35
	Nº Violações *	0
	LogS (ESOL) *	-5,10
Farmacocinética	Absorção GI*	Alto
	Permeabilidade BHE *	Não
	Substrato da gp-P *	Não
	Inibidor CYP1A2 **	Não
	Substrato CYP1A2 **	Sim
	Inibidor CYP2C19 **	Sim
	Substrato CYP2C19 **	Não
	Inibidor CYP2C9 **	Sim
	Substrato CYP2C9 **	Sim
	Inibidor CYP2D6 **	Não
	Substrato CYP2D6 **	Sim
	Inibidor CYP3A4	Sim
Substrato CYP3A4	Sim	



**Legenda:** MM: Massa molecular, cLog P<sub>ow</sub> : Consenso do coeficiente de partição, ALH: número de aceptores de ligações de hidrogênio, DLH: número de doadores de ligações de hidrogênio, LR: número de ligações rotacionáveis, tPSA: área de superfície polar topológica, LogS (ESOL) = log de solubilidade em água (mol·L<sup>-1</sup>); GI: gastrointestinal, BHE: barreira hematoencefálica, CYP: isoformas das enzimas do citocromo P450 . \* Plataforma SwissADME; \*\* Plataforma ADMETlab 2.0.

**Fonte:** O autor

A análise das propriedades físico-químicas relacionadas a fármaco-similaridade indica que o derivado **1f** não viola a regra de Lipinski, sugerindo que poderia ter boa biodisponibilidade após ser administrado por via oral (LIPINSKI et al.,

1997b), bem como atende aos parâmetros propostos por Veber, indicando boa permeabilidade através de membranas (VEBER et al., 2002). Além disso, o valor de LogS (DELANEY, 2004) mostrou que a substância **1f** é moderadamente solúvel em água.

Com relação às propriedades farmacocinéticas, a substância **1f** apresentaria alta absorção gastrointestinal e não conseguiria permear a barreira hematoencefálica (BHE), cuja função é a manutenção da homeostase no sistema nervoso central (BAGCHI et al., 2019). Esta substância não atua como substrato para a gp-P, então não são esperadas alterações significativas na absorção, distribuição e eliminação da substância **1f**.

Com relação as enzimas do citocromo P450 (CYP), a substância **1f** mostrou a capacidade de inibir três isoformas, CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4. O CYP2C19 é o principal responsável pelo metabolismo de fármacos como inibidores da bomba de prótons e antidepressivos (DESTA et al., 2002), portanto, é improvável que ocorram interações medicamentosas importantes em pacientes com leishmaniose. No entanto, CYP3A4 é a enzima de fase I hepática e intestinal mais abundante, responsável pelo metabolismo de mais de 50% dos fármacos (ZHOU, 2008), e CYP2C9 é responsável por aproximadamente 15% do metabolismo de fármacos, incluindo anti-inflamatórios não esteróides (MINERS; BIRKETT, 1998), utilizado no tratamento da leishmaniose cutânea. A inibição dessas isoformas pode diminuir a eficácia e aumentar os efeitos adversos e a toxicidade de fármacos coadministrados, indicando a necessidade de mais estudos para verificar a interação com fármacos metabolizados por essas enzimas CYP.

Além disso, verificou-se também se a substância **1f** poderia atuar como um possível substrato para CYPs. Essa previsão é útil porque, se uma substância se comporta como substrato dos CYPs, pode levar a uma baixa biodisponibilidade oral causada por um metabolismo pré-sistêmico. Assim, as predições indicaram que a substância **1f** poderia ser um substrato das isoformas CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4. Além disso, através da análise dos locais de metabolismo (SOMs), verificou-se que os carbonos dos grupos metoxila, nas posições 4 e 8 do anel naftaleno, são suscetíveis à ação dos CYPs, uma vez que essas enzimas são conhecidas por realizar a hidroxilação de carbonos  $\alpha$  a heteroátomos, que resultam em O-desmetilação (ORTIZ DE MONTELLANO, 2010).

### 3.6 DOCKING MOLECULAR

Além da investigação dos mecanismos de ação, decidiu-se analisar, por meio de um estudo de *docking* molecular, as possíveis interações existentes entre a chalcona **1f** e dois alvos enzimáticos de *L. amazonensis*, a arginase (ARG) (D'ANTONIO et al., 2013) e a tripanotiona redutase (TR) (BAILEY et al., 1993). Essas enzimas são dois importantes alvos moleculares, uma vez que desempenham um papel fundamental no crescimento e sobrevivência do parasita.

Quando uma célula falha em manter a homeostase celular utilizando a capacidade antioxidante total disponível, é gerado estresse oxidativo que acelera o processo de apoptose. Para proteger as células da apoptose mediada por ERO, o parasito deve controlar cuidadosamente o nível de ERO, regulando positivamente a defesa antioxidante (MANDAL et al., 2016). Desta forma, a concentração celular de ERO é controlada por enzimas antioxidantes. As poliaminas biossintetizadas pela ARG, são cruciais para exercer atividade antioxidante, pois estão envolvidas na produção do tiol tripanotiona ( $N^1, N^8$ -bis(glutathionil)espermidina,  $T(SH)_2$ ) (FAIRLAMB et al., 1985). A TR, por sua vez, atua para retornar a tripanotiona que foi oxidada nos processos de detoxificação de ERO para a sua forma reduzida, utilizando NADPH como fonte de elétrons, representando um eficiente sistema de defesa antioxidante nesse grupo de parasitos (MANTA et al., 2013). O equilíbrio entre a geração e eliminação de ERO por enzimas antioxidantes ajuda a manter a função celular. Portanto, a inibição dessas enzimas pode levar a um aumento geral nos níveis intracelulares de ERO, causando a morte celular (GARREL et al., 2007), corroborando para os resultados observados de despolarização da membrana mitocondrial e aumento substancial na geração de ERO.

Devido à falta de estruturas 3D experimentais de ARG e TR de *L. amazonensis* no Protein Data Bank (PDB), foram construídos modelos 3D por modelagem de homologia. A modelagem de homologia, também conhecida como modelagem comparativa é um dos métodos computacionais de previsão de estrutura usados para determinar a estrutura 3D de uma proteína a partir de sua sequência de aminoácidos. Essa abordagem se baseia no fato biológico de que, quando duas sequências compartilham alta similaridade/identidade, suas respectivas estruturas também são semelhantes. A modelagem de homologia é considerada o mais preciso dos métodos de previsão de estrutura computacional (MUHAMMED; AKI-YALCIN, 2019). Portanto,

os modelos foram construídos considerando as estruturas da ARG em *L. mexicana* (95,4% de identidade) e TR em *C. fasciculata* (76,8% de identidade), conforme metodologia e validação, publicadas em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (CAMARGO et al., 2020; SANTIAGO-SILVA et al., 2021)

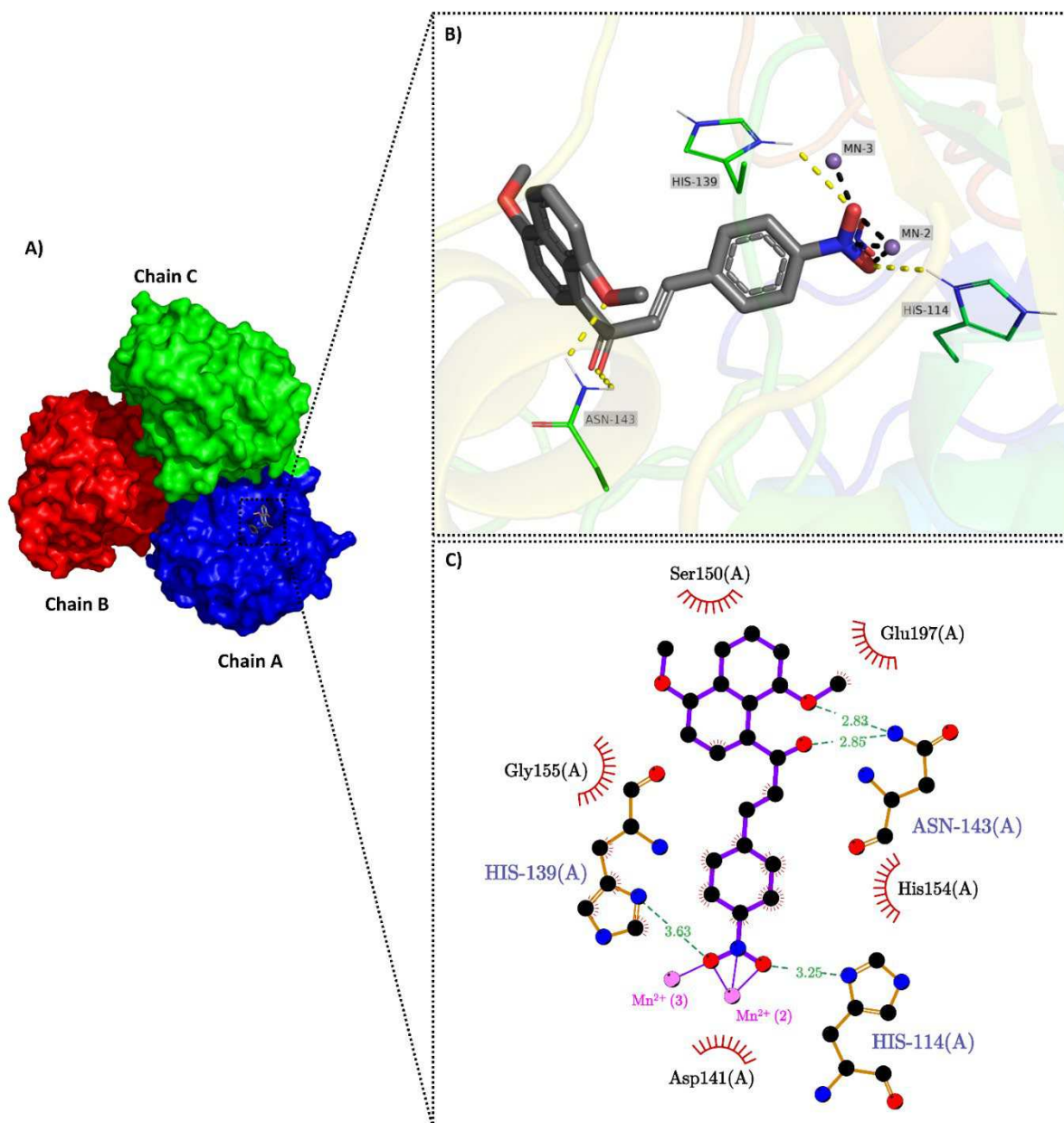
Devido à ausência de inibidor co-cristalizado no sítio ativo da ARG e TR, realizamos a validação e o *docking* molecular com base na abordagem de consenso, conforme procedimento realizado pelo nosso grupo de pesquisa (DE CARVALHO et al., 2019; SANTIAGO-SILVA et al., 2021). A validação por consenso é um método útil, pois melhora o desempenho de ajuste da pontuação e a previsão de conformações e poses (FEHER, 2006). Para realizar o *docking* de consenso, utilizou-se o Autodock4.2 e o Vina, pois eles empregam diferentes esquemas de tipagem de átomo, diferentes otimizadores globais, diferentes otimizadores locais e diferentes funções de pontuação (HOUSTON; WALKINSHAW, 2013).

Assim, utilizou-se esse método para prever e visualizar as interações mais favoráveis entre **1f** e os sítios ativos de ARG e TR, considerando o consenso entre pelo menos duas funções de pontuação (RMSD < 2,0 Å). A análise do consenso gerado a partir da melhor pose obtida pelas diferentes funções de pontuação utilizadas neste estudo apresentou um RMSD de 0,75 Å entre o algoritmo genético lamarckiano (LGA) e o algoritmo genético (GA) para a enzima ARG e um RMSD de 1,77 Å entre as mesmas funções para a enzima TR.

ARG, que é um homotrímero (**Figura II.16A**), com cada subunidade contendo dois íons  $Mn^{2+}$ , críticos para a atividade catalítica. Portanto, apenas o sítio ativo da cadeia A foi considerado para análise das interações proteína-ligante. Os resultados obtidos indicaram que a substância **1f** interage por ligação de hidrogênio com os resíduos Asn143, His139 e His114. Estes dois últimos são fundamentais, uma vez que a His139 é conservada na família ARG e está envolvida na coordenação com o aglomerado binuclear de manganês no sítio ativo (RECZKOWSKI; ASH, 1992), enquanto a His114 participa diretamente do mecanismo catalítico dessa enzima (**Esquema II.1**) (MÉNDEZ-CUESTA; MÉNDEZ-LUCIO; CASTILLO, 2012). Isso sugere que tais ligações de hidrogênio contribuem significativamente para a estabilidade do complexo proteína-ligante. Além disso, pode-se observar que o grupo nitro está envolvido na coordenação com os íons de  $Mn^{2+}$  (**Figura II.16B**). Isto é claramente importante não apenas para a estabilidade do complexo, mas também para a inibição da atividade enzimática, que envolve diretamente a participação desses íons no mecanismo

catalítico (CALDWELL et al., 2015). Também é importante observar que a substância **1f** exibiu interações hidrofóbicas com os resíduos Asp141, Ser150, His154, Gly155 e Glu197 (**Figura II.16C**).

**Figura II.16:** Análise das interações proteína-ligante **ARG-1f**.



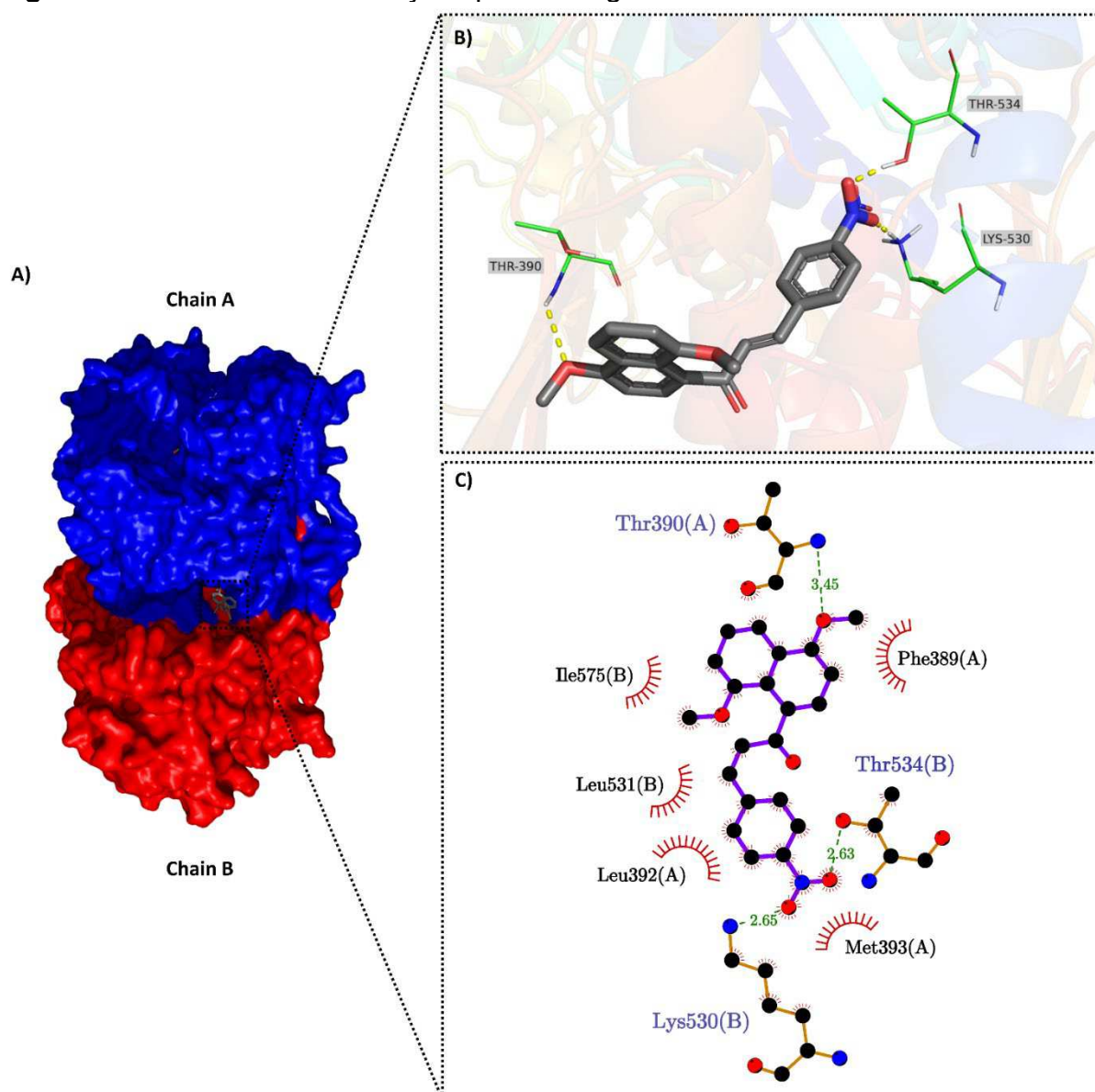
**Legenda:** (A) Representação da superfície da forma trimérica de ARG. A cadeia A é azul, a cadeia B é vermelha, a cadeia C é verde e o ligante **1f** é apresentado como bastões cinza. (B) Uma visão ampliada do bolso de ligação do substrato. Resíduos interagindo via ligação de hidrogênio são mostrados em linhas. Os dois íons de manganês ( $Mn^{2+}$ ) são mostrados como esferas roxas. As ligações de hidrogênio com o ligante **1f** são mostradas como linhas tracejadas amarelas, e a interação com o metal é mostrada como linha tracejada preta. (C) Representação 2D gerada por LigPlot<sup>+</sup> de prováveis interações entre a substância **1f** e resíduos do domínio catalítico de ARG. As linhas roxas indicam

interações com íons  $Mn^{2+}$ . As linhas tracejadas verdes representam interações de ligações de hidrogênio. Os arcos com raios representam resíduos não ligantes envolvidos em contatos hidrofóbicos.

**Fonte:** O autor

A estrutura TR ativa é homodimérica (**Figura II.17A**), com cada monômero composto por três domínios - um domínio que contém um sítio de ligação ativo para  $T(S)_2$  e domínios de ligação alostérica para ligação de FAD e NADPH (BAIOCCO et al., 2009). Definiu-se o sítio de *docking* apenas como o sítio de ligação ao substrato, não incluindo as regiões alostéricas. Como o FAD está fortemente ligado a TR, este local não estaria disponível para inibidores *in vitro* (O'SULLIVAN et al., 2015). Ademais, o sítio ativo da TR é uma grande fenda localizada na interface da cadeia A e da cadeia B. Nesta interface existe um canal que conecta os dois sítios ativos (SALMON-CHEMIN et al., 2001). Dada esta característica estrutural e analisando o complexo entre a substância **1f** e a enzima TR, observou-se que o grupo nitro está parcialmente inserido neste canal, formando duas ligações de hidrogênio com os resíduos Lys530 e Thr534. Por outro lado, o grupo metoxila ligado ao grupo naftila fica fora do canal e interage com a cadeia lateral do Thr390 (**Figura II.17B**). Além das interações de ligação de hidrogênio, a substância também interage hidrofobicamente com os resíduos Leu392, Met393, Phe389, Leu531 e Ile575 (**Figura II.17C**). Essas interações observadas no complexo proteína-ligante podem estar relacionadas à inibição enzimática, levando ao aumento observado nos níveis de ROS, uma vez que o TR desempenha um papel único no metabolismo redox baseado em tripanotiona e na defesa oxidativa.

Figura II.17: Análise das interações proteína-ligante TR-1f.



**Legenda:** (A) Representação da superfície da forma dimérica de TR. A cadeia A é azul, a cadeia B é vermelha e o ligante **1f** é apresentado como bastões cinza. (B) Uma visão ampliada do bolso de ligação do substrato. Resíduos interagindo via ligação de hidrogênio são mostrados em linhas. As ligações de hidrogênio com o ligante **1f** são mostradas em linhas tracejadas amarelas. (C) Representação 2D gerada por LigPlot\* de prováveis interações entre a substância **1f** e resíduos do domínio catalítico de TR. As linhas tracejadas verdes representam interações de ligações de hidrogênio. Os arcos com raios representam resíduos não ligantes envolvidos em contatos hidrofóbicos.

**Fonte:** O autor

A energia de ligação calculada no estudo de *docking* para a interação da enzima **ARG-1f** (-11,94 kcal/mol) indica maior estabilidade do que para a enzima **TR-1f** (-7,61 kcal/mol), ou seja, esses resultados sugerem que o **1f** interage mais eficientemente com resíduos críticos no sítio ativo do ARG, sugerindo que o derivado

**1f** pode ser considerado um possível inibidor para este alvo. Conseqüentemente, estes resultados sugerem que esta substância deve ser indicada para estudos antileishmania posteriores.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

#### 4.1.1 Manutenção das formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO) foram mantidas em meio de cultura 199 (GIBCO, Invitrogen, Nova York, NY, EUA) pH 7,18–7,22 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (GIBCO, Invitrogen, Nova York, NY, EUA), tampão HEPES 1M, urina humana 1%, L -glutamina 1%, estreptomicina 10 µg/mL e penicilina 10 U/mL (GIBCO, Invitrogen, NY, EUA) e sódio 10% bicarbonato. A cultura do parasito foi mantida em incubadora BOD a 24 °C em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>. Em todos os experimentos foram utilizadas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento (cultivo de 5 dias).

#### 4.1.2 Efeito das substâncias em promastigotas de *L. amazonensis*

As atividades foram avaliadas pelo ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) (MOSMANN, 1983). As formas promastigotas de *L. amazonensis* (10<sup>6</sup> células/mL) foram colocadas em placas de 96 poços e tratadas com os derivados de chalcona (**1a–i**) em diferentes concentrações (10, 25, 50 e 130 µM) e mantidas em uma incubadora BOD por 24h a 24°C. Uma solução de MTT (10 µL de um estoque de 5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionada a cada poço e, após 4h, as placas foram avaliadas em  $\lambda = 550$  nm usando um espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, Multiskan GO, Waltham, MA, EUA). Promastigotas de *L. amazonensis* mantidas em meio de cultivo M199 sem tratamento ou com DMSO 0,01% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) serviram como controle negativo e veículo. 1 µM de anfotericina B (AmB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi usado como controle positivo. Os resultados das atividades antipromastigotas foram expressos como metade das concentrações inibitórias máximas para 50% dos

parasitas ( $CI_{50}$ ) em  $\mu\text{M}$ . Os valores de  $CI_{50}$  foram calculados como a média de três experimentos independentes realizados em duplicata.

#### 4.1.3 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos

O efeito citotóxico das substâncias **1a-i** nas linhas celulares de macrófagos murinos J774A.1 (TIB-67, ATCC, Manassas, EUA) foi avaliado usando o ensaio MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), (MOSMANN, 1983). Os macrófagos foram plaqueados em placas de 96 poços a uma densidade de  $10^4$  células/poço e tratados com as chalconas **1a-i** em diferentes concentrações (10, 25, 50 e 130  $\mu\text{M}$ ) por 24h (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ). As células foram lavadas, MTT (5 mg/mL) adicionado e as células foram incubadas por 4h. O produto MTT foi diluído com 100  $\mu\text{L}$  de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e analisado a 550 nm em espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, Multiskan GO, Waltham, MA, EUA) a 550 nm. 0,5% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em comparação com o grupo controle. A concentração citotóxica para 50% das células ( $CC_{50}$ ) foi calculada por regressão não linear à curva dose-resposta usando o software estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA, 500.288).

#### 4.1.4 Índice de Seletividade (SI)

A metade da concentração inibitória máxima para 50% dos parasitos ( $CI_{50}$ ) foi determinada em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com as nove chalconas, e a concentração citotóxica que causa a morte de 50% das células ( $CC_{50}$ ) em macrófagos murinos (J774A.1).  $CI_{50}$  e  $CC_{50}$  foram calculados por regressão não linear usando o software estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., EUA, 500.288). O índice de seletividade das substâncias testadas foi expresso como  $SI = CC_{50}$  em macrófagos peritoneais /  $CI_{50}$  em formas promastigotas.

#### 4.1.5 Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ )

Para avaliar se a chalcona mais promissora (**1f**) altera o potencial de membrana mitocondrial, realizamos um ensaio usando coloração com éster etílico de tetrametil-

rodamina (TMRE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para tanto, promastigotas ( $10^6$  células/mL) foram tratados com  $3,3 \mu\text{M}$  ( $\text{Cl}_{50}$ ) e  $6,6 \mu\text{M}$  ( $2 \times \text{Cl}_{50}$ ) por 24h e incubados com  $25 \text{ nM}$  de TMRE por 30 min a  $24^\circ\text{C}$  e analisados usando um leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3, PerkinElmer, Turku, Finlândia), a  $480/580 \text{ nm}$ . Cianeto de carbonila *m*-clorofenilhidrazona ( $100 \mu\text{M}$ ) (CCCP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi usado como controle positivo e o veículo (DMSO  $0,01\%$ ) foi usado como controle negativo.

#### 4.1.6 Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) em formas promastigotas de *L. amazonensis*

Para avaliar a geração de ERO em formas promastigotas de *L. amazonensis*, parasitas ( $10^6$  células/mL) foram tratadas com a chalcona mais promissora (**1f**) a  $3,3 \mu\text{M}$  ( $\text{Cl}_{50}$ ) e  $6,6 \mu\text{M}$  ( $2 \times \text{Cl}_{50}$ ) por 24h e incubados com  $10 \mu\text{M}$  de uma sonda permeante, diacetato 2',7'-diclorofluoresceína ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído em DMSO no escuro por 45 min,  $24^\circ\text{C}$ , com conversão para a altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Como controle positivo foi utilizado peróxido de hidrogênio ( $0,4\% \text{ H}_2\text{O}_2$ ) e o veículo (DMSO  $0,01\%$ ) como controle negativo. A produção de ERO foi medida como um aumento na fluorescência causado pela conversão do corante não fluorescente para o fluorescente 2,7-diclorofluoresceína, com um comprimento de onda de excitação de  $488 \text{ nm}$  e emissão de  $530 \text{ nm}$  em um leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3, PerkinElmer, Turku, Finlândia).

#### 4.1.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

MEV foi realizada para analisar mudanças morfológicas na topografia da superfície celular. Promastigotas ( $10^6$  parasitas/ mL) foram tratados com  $3,3 \mu\text{M}$  ( $\text{Cl}_{50}$ ) e  $6,6 \mu\text{M}$  ( $2 \times \text{Cl}_{50}$ ) de **1f** por 24h a  $25^\circ\text{C}$ . Após o tratamento, os parasitos foram fixados em glutaraldeído a  $2,5\%$  (Merck, Darmstadt, Alemanha) em tampão cacodilato de sódio  $0,1 \text{ M}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e aderido à lamínulas cobertas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 60 min. Os parasitos foram desidratados com concentrações crescentes de etanol (Synth, Diadema, Brasil) ( $30\text{--}$

100%), submetidos à secagem em ponto crítico (Baltec SCD-030), metalizados com ouro e visualizados em um microscópio eletrônico de feixe duplo de alta resolução FEI SCIOS.

Para avaliar as alterações ultraestruturais por MET, as promastigotas foram tratadas e fixadas conforme descrito acima. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas com OsO<sub>4</sub> 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ferrocianeto de potássio 0,8% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e CaCl<sub>2</sub> 10,0 mM ( Synth, Diadema, Brasil) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 h à temperatura ambiente e protegido da luz. As amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, desidratadas em concentração aumentada de acetona (Synth, Diadema, Brasil) (50-100%), inclusive em resina EPON, e polimerizadas a 60 °C por 72 h. Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo (RMC Boeckler, Tucson, EUA), depositados em grade de cobre e contrastados com acetato de uranila 5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e citrato de chumbo 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 20 e 10 min, respectivamente. A análise foi realizada usando um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400.

#### 4.1.8 Ensaio Antiamastigotas

Os macrófagos murinos J774A.1 ( $5 \times 10^5$  células/ mL) foram cultivados em placas de 24 poços. Após a infecção, as promastigotas não internalizados foram removidos por lavagem com PBS, e os macrófagos aderentes infectados foram tratados com a chalcona mais promissora (**1f**) em concentrações não citotóxicas (10, 25, 50 e 130  $\mu$ M) por 24 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Meio RPMI 1640, DMSO (0,01%) e AmB (1  $\mu$ M) foram usados como controle negativo, veículo e controle positivo, respectivamente. Em seguida, as células foram coradas com Leishman (Laborclin, Pinhais, Brasil) e 20 campos foram analisados por imersão aumentada (aumento de 1000x) usando um microscópio óptico (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tóquio, Japão) para determinar a % de macrófagos infectados e número de amastigotas/células.

#### 4.1.9 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Três experimentos independentes foram realizados, cada um com conjuntos de dados

duplicados. Os dados foram analisados usando o software estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., EUA, 500.288). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por um teste t e ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ .

#### 4.2 PREVISÕES *IN SILICO* DE PARÂMETROS DE FÁRMACO-SIMILARIDADE E FARMACOCINÉTICOS (ADME)

A análise *in silico* das propriedades ADME e parâmetros relacionados à semelhança com fármacos e biodisponibilidade oral da substância **1f** foi realizada conforme procedimento descrito no Capítulo I.

#### 4.3 DOCKING MOLECULAR

##### 4.3.1 Preparação de Proteínas e Ligantes

Os modelos estruturais de ARG e TR de *L. amazonensis* foram construídos por modelagem de homologia com o auxílio do servidor SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>) (BIASINI et al., 2014). A sequência proteica de LaARG e LaTR foi obtida do banco de dados UniProt (número de acesso: O96394 e Q0GU43, respectivamente) (ILARI et al., 2018). As estruturas 3D usadas como modelo foram ARG de *L. mexicana* (D'ANTONIO et al., 2013) (PDB: 4ITY, resolução: 1,80 Å) e TR de *Crithidia fasciculata* (BAILEY et al., 1993)(PDB ID: 1TYP, Resolução: 2,80 Å), obtido do Protein Data Bank (PDB). Esses modelos foram validados de acordo com Camargo e colaboradores (CAMARGO et al., 2020).

A estrutura 3D da chalcona mais promissora (**1f**) foi construída no ChemDraw versão 20.0.0.41 (PerkinElmer Informatics) (EVANS, 2014). A otimização da geometria foi então realizada usando o campo de força PM7 implementado no MOPAC2016 (Molecular Orbital Package) (STEWART, 2016).

##### 4.3.2 Docking Molecular de Consenso

O *docking* molecular foi realizado usando AutoDock v. 4.2 (MORRIS et al., 1998) e AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2009). As preparações de proteínas e ligantes foram realizadas usando AutoDockTools (ADT) v.1.5.6 (MORRIS et al., 2009). Todas as moléculas de água foram removidas, átomos de hidrogênios polares foram adicionados e as cargas de Kollman e Gasteiger foram adicionadas. O centro da caixa de grade da ARG para AutoDock foi centralizado entre os íons de manganês em x: 15,141, y: -15,1248, z: -5,40, tamanho 40 × 50 × 38 Å e espaçamento de 0,375 Å, para o AutoDock Vina as mesmas coordenadas foram definidas, com um tamanho de 20 × 23 × 19 Å. Para TR, a caixa de grade para AutoDock foi centralizada no sítio de ligação do substrato T(S)<sub>2</sub> em x: 71,856, y: 10,434, z: 12,967, tamanho 60 × 60 × 60 Å e espaçamento de 0,375 Å, para AutoDock Vina, o tamanho foi definido como 24 × 24 Å.

Os cálculos de *docking* molecular foram realizados considerando a função de pontuação híbrida, implementada no Vina, e o algoritmo genético (GA) e genético lamarckiano (LGA) (MORRIS et al., 1998), implementados no Autodock. Os ligantes realizaram 10 execuções iterativas e a pose com melhor pontuação no *docking* foi considerada para o cálculo do desvio médio quadrado médio (RMSD).

A análise de interações intermoleculares e os cálculos de RMSD foram realizados usando pyMOL versão 1.7.4.4 (DELANO, 2002). Os gráficos 2D foram gerados usando LigPlot+ v.2.2. versão (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011)

## 5 CONCLUSÃO

A fim de identificar possíveis novos agentes antileishmania, relatou-se a avaliação de nove 4,8-dimetoxinaftalenil chalconas (**1a-i**) frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Dentre as substâncias avaliadas a ((*E*)-1-(4,8-dimetoxinaftalen-1-il)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona), denominada **1f**, foi a mais promissora com um  $CI_{50} = 3,3 \pm 0,34 \mu\text{M}$  (promastigotas), bem como apresentou um perfil de baixa citotoxicidade ( $CC_{50} = 372,9 \pm 0,04 \mu\text{M}$ ) e um alto índice de seletividade ( $SI = 112,6$ ). Além disso, o **1f** causou redução nos macrófagos infectados e no número de amastigotas por célula, culminando na eliminação dos parasitos intracelulares, com  $CI_{50} = 18,5 \pm 1.19 \mu\text{M}$ .

Estudos *in silico* das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas indicaram que a substância **1f** pode apresentar boa biodisponibilidade oral e absorção intestinal. O estudo de *docking* molecular indicou que o **1f** apresentou uma maior afinidade pela ARG do que o TR, devido o maior número de interações realizadas. Esses achados são fundamentais para revelar moléculas promissoras para novas terapias antileishmania baseadas na inibição de ARG, direcionando-nos para novos estudos planejamento de substâncias bioativas para otimização de propriedades farmacocinéticas e dinâmicas através de modificações estruturais.

Por fim, destacamos que este trabalho foi publicado com o título “**Antileishmanial activity of 4,8-dimethoxynaphthalenyl chalcones on *Leishmania amazonensis***” na revista “Antibiotcs” (Anexo B). Além do artigo publicado, este trabalho gerou outros dois artigos de revisão: a) “**Promising molecular targets related to polyamine biosynthesis in drug discovery against leishmaniasis**” publicado na revista “Medicinal Chemistry” (Anexo C) e b) “**Molecular targets for chalcones in antileishmanial drug discovery**”, submetido e aceito na revista “Mini-Reviews in Medicinal Chemistry”. (Anexo D)

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, set. 2015.
- ACHARYA, C. et al. Recent Advances in Ligand-Based Drug Design: Relevance and Utility of the Conformationally Sampled Pharmacophore Approach. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 1, p. 10, 3 mar. 2011.
- ACUÑA, S. M. et al. Arginase expression modulates nitric oxide production in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187186, 14 nov. 2017.
- ALBUQUERQUE, S. O. et al. Biological evaluation and molecular modeling of peptidomimetic compounds as inhibitors for O-GlcNAc transferase (OGT). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 154, p. 105510, nov. 2020.
- AL-KARMALAWY, A. A. et al. Molecular Docking and Dynamics Simulation Revealed the Potential Inhibitory Activity of ACEIs Against SARS-CoV-2 Targeting the hACE2 Receptor. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 227, 4 maio 2021.
- ANAND, K. et al. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5626, p. 1763–1767, 13 jun. 2003.
- APONTE, J. C. et al. In vitro and in vivo anti-*Leishmania* activity of polysubstituted synthetic chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 1, p. 100–103, jan. 2010.
- ASTUTI, I.; YSRAFIL. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, n. 4, p. 407–412, jul. 2020.
- ATHER, A. et al. Coronavirus Disease 19 (COVID-19): Implications for Clinical Dental Care. **Journal of Endodontics**, v. 46, n. 5, p. 584, 1 maio 2020.
- AUCAMP, J.; N'DA, D. D. In vitro antileishmanial efficacy of antiplasmodial active aminoquinoline-chalcone hybrids. **Experimental Parasitology**, v. 236–237, p. 108249, maio 2022.
- AZAM, F. et al. An in-silico analysis of ivermectin interaction with potential SARS-CoV-2 targets and host nuclear importin  $\alpha$ . **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 6, p. 2851–2864, 2022.
- BAGCHI, S. et al. In-vitro blood-brain barrier models for drug screening and permeation studies: an overview. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 13, p. 3591–3605, out. 2019.
- BAILEY, S. et al. Substrate interactions between trypanothione reductase and N1-glutathionylspermidine disulphide at 0.28-nm resolution. **European Journal of Biochemistry**, v. 213, n. 1, p. 67–75, abr. 1993.
- BAIOCCO, P. et al. Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2603–2612, 23 abr. 2009.
- BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* Produces a Wide Spectrum of Clinical Disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536–546, 1 maio 1991.
- BATOVSKA, D.; TODOROVA, I. Trends in Utilization of the Pharmacological Potential of Chalcones. **Current Clinical Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 1–29, fev. 2010.
- BATTISTA, T. et al. Targeting Trypanothione Reductase, a Key Enzyme in the Redox Trypanosomatid Metabolism, to Develop New Drugs against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1924, 21 abr. 2020.

- BEIGEL, J. H. et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 19, p. 1813–1826, 5 nov. 2020.
- BENATTI, F. R. et al. Synthesis of Lapachol and 4-Hydroxyquinazoline Derivatives as Candidates for Antimalarial Activity. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 12, n. 4, 31 dez. 2020.
- BENNETT, J. E. et al. **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. 9th ed. ed. [s.l.] Elsevier, 2015.
- BEPARI, A. K.; REZA, H. M. Identification of a novel inhibitor of SARS-CoV-2 3CL-PRO through virtual screening and molecular dynamics simulation. **PeerJ**, v. 9, p. e11261, 13 abr. 2021.
- BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1–3, p. 43–56, set. 1995.
- BERNAL, A. J. et al. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. **The New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 6, p. 509–520, 10 fev. 2022.
- BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. W252–W258, 1 jul. 2014.
- BOECK, P. et al. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 1538–1545, mar. 2006.
- BRITO, T. O. et al. Benzoylthioureas: Design, Synthesis and Antimycobacterial Evaluation. **Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 93–103, 16 jan. 2020.
- BRITTA, E. A. et al. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 26 set. 2014.
- BURGESSON, J. R. et al. SAR analysis of a series of acylthiourea derivatives possessing broad-spectrum antiviral activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 13, p. 4263–4272, jul. 2012.
- BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, p. 014101, 7 jan. 2007.
- CALDWELL, R. B. et al. Arginase: an old enzyme with new tricks. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 6, p. 395–405, jun. 2015.
- CALY, L. et al. The FDA-approved Drug Ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. **Antiviral research**, p. 104787, 2020.
- CAMARGO, P. G. et al. Thiohydantoins as anti-leishmanial agents: in vitro biological evaluation and multi-target investigation by molecular docking studies. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–10, 13 nov. 2020.
- CARTER, N. S. et al. Polyamine Metabolism in *Leishmania* Parasites: A Promising Therapeutic Target. **Medical Sciences**, v. 10, n. 2, p. 24, 22 abr. 2022.
- CHATELAIN, E.; IOSET, J. R. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 5, n. 5, p. 175, 2011.
- CHENG, P. et al. Chalcone hybrids and their antimalarial activity. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 4, p. 1900350, abr. 2020.
- CHRISTIANSON, D. W. Arginase: Structure, Mechanism, and Physiological Role in Male and Female Sexual Arousal. **Accounts of Chemical Research**, v. 38, n. 3, p. 191–201, 1 mar. 2005.
- CHUNG, J. Y.; THONE, M. N.; KWON, Y. J. COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 170, p. 1–25, mar. 2021.

- COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in Leishmania: from arginine to trypanothione. **Amino Acids**, v. 40, n. 2, p. 269–285, 29 fev. 2011.
- CONSIGLIO, E. [Emerging noninfectious diseases]. **Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health**, v. 24, n. 5, nov. 2008.
- CROWLEY, L. C.; CHRISTENSEN, M. E.; WATERHOUSE, N. J. Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 12, p. pdb.prot087361, 1 dez. 2016.
- CUELLAR, J. E. et al. Coumaro-chalcones synthesized under solvent-free conditions as potential agents against malaria, leishmania and trypanosomiasis. **Heliyon**, v. 8, n. 2, p. e08939, fev. 2022.
- DA SILVA, M. F. L. et al. Leishmania amazonensis Arginase Compartmentalization in the Glycosome Is Important for Parasite Infectivity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e34022, 30 mar. 2012.
- DA SILVA, M. F. L.; FLOETER-WINTER, L. M. Arginase in Leishmania. Em: SANTOS, A. L. S. et al. (Eds.). **Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 103–117.
- DA SILVA, T. U. et al. Development of parameters compatible with the CHARMM36 force field for [Fe 4 S 4 ] 2+ clusters and molecular dynamics simulations of adenosine-5'-phosphosulfate reductase in GROMACS 2019. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–11, 13 nov. 2020.
- DA SILVA, T. U. et al. Molecular dynamics simulations of aqueous systems of inhibitor candidates for adenosine-5'-phosphosulfate reductase. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–12, 1 fev. 2022.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. 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, 3 maio 2017.
- DAMALANKA, V. C. et al. Structure-guided design, synthesis and evaluation of oxazolidinone-based inhibitors of norovirus 3CL protease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 881–890, 2018.
- DANEMAN, R.; PRAT, A. The Blood–Brain Barrier. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 1, p. a020412, 5 jan. 2015.
- D'ANTONIO, E. L. et al. Crystal structure of arginase from Leishmania mexicana and implications for the inhibition of polyamine biosynthesis in parasitic infections. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 535, n. 2, p. 163–176, jul. 2013.
- DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 15 jun. 1993.
- DATASUS. **Coronavírus Brasil**. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 11 nov. 2022.
- DE CARVALHO, P. G. C. et al. Synthesis and Antimicrobial Activity of Thiohydantoin Obtained from L-Amino Acids. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 17, n. 1, p. 94–102, 31 dez. 2019.
- DE MELLO, M. V. P. et al. A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 920–929, abr. 2018.
- DE MELLO, T. F. P. et al. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in Leishmania (Viannia) braziliensis. **Experimental Parasitology**, v. 136, p. 27–34, jan. 2014.
- DE SOUZA, A. S. et al. 3-Acyltetramic acids as a novel class of inhibitors for human kallikreins 5 and 7. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 9, p. 1094–1098, maio 2019.
- DELANEY, J. S. ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular

- Structure. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 3, p. 1000–1005, 1 maio 2004.
- DELANO, W. L. Pymol: an open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsletter on protein crystallography**, v. 40, n. 1, p. 82–92, 2002.
- DESTA, Z. et al. Clinical Significance of the Cytochrome P450 2C19 Genetic Polymorphism. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 41, n. 12, p. 913–958, 2002.
- DI COSTANZO, L. et al. Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 37, p. 13058–13063, 13 set. 2005.
- DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC Biology**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 28 out. 2011.
- ELKANZI, N. A. A. et al. Synthesis of Chalcones Derivatives and Their Biological Activities: A Review. **ACS Omega**, v. 7, n. 32, p. 27769–27786, 16 ago. 2022.
- ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 15 nov. 1995.
- EVANS, B. E. et al. Methods for Drug Discovery: Development of Potent, Selective, Orally Effective Cholecystokinin Antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 12, p. 2235–2246, 1 nov. 1988.
- EVANS, D. A. History of the Harvard ChemDraw Project. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 42, p. 11140–11145, 13 out. 2014.
- FAIRLAMB, A. H. et al. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science (New York, N.Y.)**, v. 227, n. 4693, p. 1485–1487, 1985.
- FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. METABOLISM AND FUNCTIONS OF TRYpanOTHIONE IN THE KINETOPLASTIDA. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 695–729, out. 1992.
- FAN, Q. et al. Safety profile of the antiviral drug remdesivir: An update. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110532, 2020.
- FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 820–832, out. 2004.
- FDA. **Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes First Oral Antiviral for Treatment of COVID-19**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-first-oral-antiviral-treatment-covid-19>>. Acesso em: 8 jul. 2022a.
- FDA. **Fact Sheet for Healthcare Providers: Emergency Use Authorization For Paxlovid**. Disponível em: <<https://www.covid19oralrx.com/files/PP-PAX-USA-0007-EUA-Full-Prescribing-Info-HCP-Fact-Sheet-COVID-19-Oral-Antiviral-Combined.pdf>>.
- FEHER, M. Consensus scoring for protein–ligand interactions. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 9–10, p. 421–428, maio 2006.
- FERREIRA, L. G. et al. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 22 jul. 2015.
- FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. **Pharmaceutical Research** 2011 28:11, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, 21 set. 2011.
- FUJITA, T. The ortho effect in quantitative structure—activity correlations. **Analytica Chimica Acta**, v. 133, n. 4, p. 667–676, nov. 1981.
- GARCIA, A. R. et al. Identification of Chalcone Derivatives as Inhibitors of *Leishmania infantum* Arginase and Promising Antileishmanial Agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 14 jan. 2021.
- GARREL, C. et al. Oxidative stress-inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced luteal cell death in vivo. **Free radical research**, v. 41, n. 3, p. 251–259, 2007.

- GAUR, U. et al. An Effect of Parasite-Encoded Arginase on the Outcome of Murine Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8446–8453, 15 dez. 2007.
- GHOSH, A. K. et al. Design and Synthesis of Potent HIV-1 Protease Inhibitors Containing Bicyclic Oxazolidinone Scaffold as the P2 Ligands: Structure-Activity Studies and Biological and X-ray Structural Studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 21, p. 9722–9737, 2018.
- GODINHO, J. L. P. et al. A novel alkyl phosphocholine-dinitroaniline hybrid molecule exhibits biological activity in vitro against *Leishmania amazonensis*. **Experimental parasitology**, v. 135, n. 1, p. 153–165, set. 2013.
- GOLDSTEIN, J. I. et al. **Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis**. New York, NY: Springer New York, 2018.
- GOMES, D. E. B. et al. HbMap2Grace. Software for mapping the hydrogen bond frequency. **Laboratory for Molecular Modeling and Dynamics.**, 2009.
- GOYAL, B.; GOYAL, D. Targeting the Dimerization of the Main Protease of Coronaviruses: A Potential Broad-Spectrum Therapeutic Strategy. **ACS Combinatorial Science**, v. 22, n. 6, p. 297–305, 8 jun. 2020.
- GUEDES, I. A.; PEREIRA, F. S. S.; DARDENNE, L. E. Empirical Scoring Functions for Structure-Based Virtual Screening: Applications, Critical Aspects, and Challenges. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. SEP, 24 set. 2018.
- GUNASEKAR, P. G. et al. NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. **Journal of neurochemistry**, v. 65, n. 5, p. 2016–2021, 1995.
- GUPTA, S. et al. Synthesis and biological evaluation of chalcones as potential antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 81, p. 359–366, jun. 2014.
- GUTTERIDGE, C. et al. Antileishmanial and Antimalarial Chalcones: Synthesis, Efficacy and Cytotoxicity of Pyridinyl and Naphthalenyl Analogs. **Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 115–119, 1 mar. 2007.
- HARIONO, M. et al. Potential SARS-CoV-2 3CLpro inhibitors from chromene, flavonoid and hydroxamic acid compound based on FRET assay, docking and pharmacophore studies. **Results in chemistry**, v. 3, 1 jan. 2021.
- HARISH, V. et al. Xanthohumol for Human Malignancies: Chemistry, Pharmacokinetics and Molecular Targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4478, abr. 2021.
- HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, set. 1997.
- HEVENER, K. E. et al. Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 2, p. 444–460, 23 fev. 2009.
- HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular dynamics simulation for all. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129, 9 set. 2018.
- HOTEZ, P. J. et al. What constitutes a neglected tropical disease? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. e0008001, 2 jan. 2020.
- HOUSTON, D. R.; WALKINSHAW, M. 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, 25 fev. 2013.
- HU, Q. et al. The SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19. **MedComm**, v. 3, n. 3, p. e151, 1 set. 2022.
- HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, fev. 2020.

- HUANG, J.; MACKERELL, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. **Journal of Computational Chemistry**, v. 34, n. 25, p. 2135–2145, 30 set. 2013.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, fev. 1996.
- HWU, J. R. et al. Chikungunya virus inhibition by synthetic coumarin–guanosine conjugates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 166, p. 136–143, 2019.
- ILARI, A. et al. Toward a Drug Against All Kinetoplastids: From LeishBox to Specific and Potent Trypanothione Reductase Inhibitors. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 3069–3078, 6 ago. 2018.
- J. R. YUNTA, M. It Is Important to Compute Intramolecular Hydrogen Bonding in Drug Design? **American Journal of Modeling and Optimization**, v. 5, n. 1, p. 24–57, 26 out. 2017.
- JAIN, N. et al. Association of the Priority Review Voucher With Neglected Tropical Disease Drug and Vaccine Development. **JAMA**, v. 318, n. 4, p. 388, 7 jul. 2017.
- JAIN, S. et al. Metabolic Pathways of Leishmania Parasite: Source of Pertinent Drug Targets and Potent Drug Candidates. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, p. 1590, 30 jul. 2022.
- JAYASOORIYA, R. G. P. T. et al. Molecular chemotherapeutic potential of butein: A concise review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, n. December 2017, p. 1–10, fev. 2018.
- JIN, Z. et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. **Nature**, v. 582, n. 7811, p. 289–293, 9 jun. 2020.
- K. SAHU, N. et al. Exploring Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 209–225, 1 jan. 2012.
- KABINGER, F. et al. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 28, n. 9, p. 740, 1 set. 2021.
- KALYAANAMOORTHY, S.; CHEN, Y. P. P. Structure-based drug design to augment hit discovery. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 17–18, p. 831–839, 1 set. 2011.
- KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature structural biology**, v. 9, n. 9, p. 646–652, 2002.
- KATHURIA, M. et al. Induction of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Leishmania donovani by Orally Active Clerodane Diterpene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 5916, 1 out. 2014.
- KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751–758, 5 nov. 2015.
- KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239, 1972.
- KLEIN, K.; ZANGER, U. M. Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the “Missing Heritability” Problem. **Frontiers in genetics**, v. 4, p. 12, 2013.
- KOHL, H.; REIMER, L. **Transmission Electron Microscopy**. New York, NY: Springer New York, 2008. v. 36
- KOKIC, G. et al. Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 279, 12 dez. 2021.
- KUMARI, R.; KUMAR, R.; LYNN, A. g\_mmpbsa —A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 7, p. 1951–1962, 28 jul. 2014.
- LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction

- Diagrams for Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 24 out. 2011.
- LEE, J. et al. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 12, n. 1, p. 405–413, 12 jan. 2016.
- LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, p. 2694, 12 dez. 2016.
- LI, Q.; KANG, C. B. Progress in Developing Inhibitors of SARS-CoV-2 3C-Like Protease. **Microorganisms 2020, Vol. 8, Page 1250**, v. 8, n. 8, p. 1250, 18 ago. 2020.
- LIMA, C. et al. Aqueous Molecular Dynamics Simulations of the M. tuberculosis Enoyl-ACP Reductase-NADH System and Its Complex with a Substrate Mimic or Diphenyl Ethers Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23695–23722, 7 out. 2015.
- LIN, C.-H. et al. Synthesis of acylguanidine zanamivir derivatives as neuraminidase inhibitors and the evaluation of their bio-activities. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 24, p. 3943, 2013.
- LINDORFF-LARSEN, K. et al. Systematic Validation of Protein Force Fields against Experimental Data. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 32131, 22 fev. 2012.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, jan. 1997a.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, jan. 1997b.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1P11 of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, mar. 2001.
- LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004.
- LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. Apoptosis, autophagy, and more. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 12, p. 2405–2419, 1 dez. 2004.
- LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 22 fev. 2020.
- MA, X. et al. Differences in Clinical and Imaging Features between Asymptomatic and Symptomatic COVID-19 Patients. **International Journal of Clinical Practice**, v. 2022, 2022.
- MACALINO, S. J. Y. et al. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of Pharmacal Research 2015 38:9**, v. 38, n. 9, p. 1686–1701, 25 jul. 2015.
- MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Chalcone Derivatives: Anti-inflammatory Potential and Molecular Targets Perspectives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 28, p. 3146–3169, nov. 2017.
- MAIA, E. H. B. et al. Structure-Based Virtual Screening: From Classical to Artificial Intelligence. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 343, 28 abr. 2020.
- MANDAL, A. et al. Deprivation of L-Arginine Induces Oxidative Stress Mediated Apoptosis in Leishmania donovani Promastigotes: Contribution of the Polyamine Pathway. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, 25 jan. 2016.

- MANDAL, S.; MOUDGIL, M.; MANDAL, S. K. Rational drug design. **European journal of pharmacology**, v. 625, n. 1–3, p. 90–100, 25 dez. 2009.
- MANTA, B. et al. Trypanothione: A unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3199–3216, 1 maio 2013.
- MARTINS, T.; FONSECA, B. M.; REBELO, I. Antioxidant Effects of Chalcones during the Inflammatory Response: An Overall Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 37, p. 7658–7713, nov. 2021.
- MASCARENHAS, M. D. M. et al. Ocorrência simultânea de COVID-19 e dengue: o que os dados revelam? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 6, p. e00126520, 17 jun. 2020.
- MÉNDEZ-CUESTA, C. A.; MÉNDEZ-LUCIO, O.; CASTILLO, R. Homology modeling, docking and molecular dynamics of the Leishmania mexicana arginase: A description of the catalytic site useful for drug design. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 38, p. 50–59, set. 2012.
- MENG, X.-Y. et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–57, jun. 2011.
- MINERS, J. O.; BIRKETT, D. J. Cytochrome P450C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, n. 6, p. 525–538, 4 jun. 1998.
- MONGA, V. et al. Synthesis and evaluation of new chalcones, derived pyrazoline and cyclohexenone derivatives as potent antimicrobial, antitubercular and antileishmanial agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 4, p. 2019–2032, 1 abr. 2014.
- MONZOTE, L.; GILLE, L. Mitochondria as a promising antiparasitic target. **Current clinical pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 55–66, 17 jan. 2010.
- MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 15 nov. 1998.
- MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.
- 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, 16 dez. 1983.
- MUHAMMED, M. T.; AKI-YALCIN, E. Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 93, n. 1, p. 12–20, 1 jan. 2019.
- MÜLLER, S. et al. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 7, p. 320–328, jul. 2003.
- MURATOV, E. N. et al. A critical overview of computational approaches employed for COVID-19 drug discovery. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 16, p. 9121–9151, 16 ago. 2021.
- NAQVI, A. A. T. et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. **Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, p. 165878, 10 out. 2020.
- NETO, R. L. M. et al. Morphological and physiological changes in Leishmania promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from Ocotea duckei. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 215–221, 1 jan. 2011.
- O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, n. 1, p. 33, 7 dez. 2011.

- O'DONOVAN, D. H. et al. A structural study of N,N'-bis-aryl-N"-acylguanidines. **New Journal of Chemistry**, v. 37, n. 8, p. 2408, 2013.
- OHASHI, R. et al. Development of Simplified in Vitro P-Glycoprotein Substrate Assay and in Silico Prediction Models To Evaluate Transport Potential of P-Glycoprotein. **Molecular Pharmaceutics**, v. 16, n. 5, p. 1851–1863, 6 maio 2019.
- OLIVEIRA, L. DO N. **Docagem de chalconas na enoil-acp redutase do Mycobacterium tuberculosis, Síntese e Avaliação biológica**. . Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 2020.
- ORTALLI, M. et al. Identification of chalcone-based antileishmanial agents targeting trypanothione reductase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 152, p. 527–541, maio 2018.
- ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 2, p. 932–948, 10 fev. 2010.
- ORTIZ-PRADO, E. et al. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 98, n. 1, p. 115094, set. 2020.
- OSMAN, M. S. et al. Identification of some chalcone analogues as potential antileishmanial agents: An integrated in vitro and in silico evaluation. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 103717, abr. 2022.
- O'SULLIVAN, M. C. et al. Dibenzosuberyl substituted polyamines and analogs of clomipramine as effective inhibitors of trypanothione reductase; molecular docking, and assessment of trypanocidal activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 996–1010, mar. 2015.
- OUYANG, Y. et al. Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 894, jun. 2021.
- OWEN, D. R. et al. An oral SARS-CoV-2 M pro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. **Science**, v. 374, n. 6575, p. 1586–1593, 24 dez. 2021.
- PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, p. S10–S18, nov. 2014.
- PAL, M. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An Update. **Cureus**, 26 mar. 2020.
- PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, v. 52, n. 12, p. 7182–7190, dez. 1981.
- PEDRIQUE, B. et al. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): A systematic assessment. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 6, p. e371–e379, 1 dez. 2013.
- PEREIRA, P. M. L. et al. In vitro evaluation of antitrypanosomal activity and molecular docking of benzoylthioureas. **Parasitology International**, v. 80, p. 102225, fev. 2021.
- PESSENDA, G.; SILVA, J. S. Arginase and its mechanisms in Leishmania persistence. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 7, 21 jul. 2020.
- PETER, R. S. et al. Post-acute sequelae of covid-19 six to 12 months after infection: population based study. **BMJ**, v. 379, p. e071050, 13 out. 2022.
- PILAU, M. R. et al. Antiviral activity of the Lippia graveolens (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1616–1624, 2011.
- POLI, G. et al. Application of MM-PBSA Methods in Virtual Screening. **Molecules** **2020, Vol. 25, Page 1971**, v. 25, n. 8, p. 1971, 23 abr. 2020.
- RAJ, R. Analysis of non-structural proteins, NSPs of SARS-CoV-2 as targets for computational drug designing. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 25, p. 100847, mar. 2021.

- RAJ, S. et al. An overview of biochemically characterized drug targets in metabolic pathways of *Leishmania* parasite. **Parasitology Research**, v. 119, n. 7, p. 2025–2037, 5 jul. 2020.
- RAMOS-GUZMÁN, C. A.; RUIZ-PERNÍA, J. J.; TUÑÓN, I. Unraveling the SARS-CoV-2 Main Protease Mechanism Using Multiscale Methods. **ACS Catalysis**, v. 10, n. 21, p. 12544–12554, 6 nov. 2020.
- RAVEENDRAN, A. V.; JAYADEVAN, R.; SASHIDHARAN, S. Long COVID: An overview. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, v. 15, n. 3, p. 869, 1 maio 2021.
- RECZKOWSKI, R. S.; ASH, D. E. EPR evidence for binuclear manganese(II) centers in rat liver arginase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 27, p. 10992–10994, dez. 1992.
- REGUERA, R. M. et al. *Leishmania* major lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 48–56, maio 2009.
- REIS, S. et al. Nirmatrelvir combined with ritonavir for preventing and treating COVID-19. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2022, n. 9, p. CD015395, 20 set. 2022.
- RUDRAPAL, M. et al. Chalcone Scaffolds, Bioprecursors of Flavonoids: Chemistry, Bioactivities, and Pharmacokinetics. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7177, nov. 2021.
- RUIZ-TAGLE, B. et al. Evaluating the use of local search strategies for a memetic algorithm for the protein-ligand docking problem. **Proceedings - International Conference of the Chilean Computer Science Society, SCCC**, v. 2017- October, p. 1–12, 5 jul. 2018.
- RW, D. et al. Privileged structures: applications in drug discovery. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 7, n. 5, p. 473–493, 10 jul. 2004.
- SALMON-CHEMIN, L. et al. 2- and 3-Substituted 1,4-Naphthoquinone Derivatives as Subversive Substrates of Trypanothione Reductase and Lipoamide Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and Correlation between Redox Cycling Activities and in Vitro Cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 548–565, fev. 2001.
- SANTIAGO-SILVA, K. M. DE et al. Exploring the antileishmanial activity of N<sup>1</sup>, N<sup>2</sup>-disubstituted-benzoylguanidines: synthesis and molecular modeling studies. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–16, 6 ago. 2021.
- SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, 7 maio 2021.
- SAUL, S.; EINAV, S. Old Drugs for a New Virus: Repurposed Approaches for Combating COVID-19. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p. 2304–2318, 11 set. 2020.
- SERAFIM, T. D.; INIGUEZ, E.; OLIVEIRA, F. *Leishmania infantum*. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 80–81, 1 jan. 2020.
- SHAHRABI, O. et al. Molecular dynamics simulation and molecular docking studies of 1,4-Dihydropyridines as P-glycoprotein's allosteric inhibitors. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 36, n. 1, p. 112–125, 2 jan. 2018.
- SHI, J.; SONG, J. The catalysis of the SARS 3C-like protease is under extensive regulation by its extra domain. **The FEBS journal**, v. 273, n. 5, p. 1035–1045, mar. 2006.
- SHIVAHARE, R. et al. Synthesis, Structure–Activity Relationships, and Biological Studies of Chromenochalcones as Potential Antileishmanial Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 8, p. 3342–3357, 24 abr. 2014.
- SINAN. **Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**. Disponível em: <<https://datasus.saude.gov.br/aceso-a->

informacao/doencas-e-agrivos-de-notificacao-de-2007-em-diante-sinan/>. Acesso em: 24 out. 2022.

SINGH, O. P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, n. 1, p. 19, 8 dez. 2016.

SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 758–777, out. 2014.

SMIRLIS, D. et al. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 107, 2010.

SPAHN, V. et al. A nontoxic pain killer designed by modeling of pathological receptor conformations. **Science (New York, N.Y.)**, v. 355, n. 6328, p. 966–969, 3 mar. 2017.

STENGER, S. et al. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 3, p. 783–793, 1 set. 1994.

STEWART, J. J. **MOPAC2016. Stewart Computational Chemistry** Colorado Springs, CO, USA, 2016.

STODDARD, S. V. et al. Optimization Rules for SARS-CoV-2 Mpro Antivirals: Ensemble Docking and Exploration of the Coronavirus Protease Active Site. **Viruses**, v. 12, n. 9, p. 942, 26 ago. 2020.

STRUYF, T. et al. Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2022, n. 5, 20 maio 2022.

THAPA, P. et al. Chalcone and its analogs: Therapeutic and diagnostic applications in Alzheimer's disease. **Bioorganic Chemistry**, v. 108, n. September 2020, p. 104681, mar. 2021.

TIJSMA, A. et al. Hydantoin: The mechanism of its in vitro anti-enterovirus activity revisited. **Antiviral Research**, v. 133, p. 106–109, 2016.

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**, p. NA-NA, 2009.

TROUILLER, P. et al. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**, v. 359, n. 9324, p. 2188–2194, 22 jun. 2002.

TULI, H. S. et al. Xanthohumol: A Metabolite with Promising Anti-Neoplastic Potential. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 418–432, fev. 2022.

TURNER, P. J. **XMGRACE, Version 5.1.19. Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology**, Beaverton, OR2005, , 2005.

UELISSON DA SILVA, T. et al. Molecular modeling of indazole-3-carboxylic acid and its metal complexes (Zn, Ni, Co, Fe and Mn) as NO synthase inhibitors: DFT calculations, docking studies and molecular dynamics simulations. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 135, p. 109120, jan. 2022.

UGAN, R. A.; UN, H. The Protective Roles of Butein on Indomethacin Induced Gastric Ulcer in Mice. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 52, n. 3, p. 265–270, out. 2020.

ÜNVER, Y. et al. New Chalcone Derivatives with Schiff Base-Thiophene: Synthesis, Biological Activity, and Molecular Docking Studies. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 794–799, 27 abr. 2019.

VANOMMESLAEGHE, K. et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. **Journal of Computational Chemistry**, p. NA-NA, 2009.

- VÁZQUEZ, J. et al. Merging Ligand-Based and Structure-Based Methods in Drug Discovery: An Overview of Combined Virtual Screening Approaches. **Molecules** **2020**, Vol. **25**, Page **4723**, v. 25, n. 20, p. 4723, 15 out. 2020.
- VÁZQUEZ, K. et al. Trypanothione Reductase: A Target for the Development of Anti-Trypanosoma cruzi Drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, 15 jun. 2017.
- VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–23, 6 jun. 2002.
- WANG, J. et al. Computational anti-COVID-19 drug design: progress and challenges. **Briefings in Bioinformatics**, v. 23, n. 1, 1 jan. 2022.
- WANG, M. Y. et al. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 25 nov. 2020a.
- WANG, Z.-F. et al. A Review: The Anti-inflammatory, Anticancer and Antibacterial Properties of Four Kinds of Licorice Flavonoids Isolated from Licorice. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 1997–2011, abr. 2020b.
- WASUKAN, N.; KUNO, M.; MANIRATANACHOTE, R. Molecular Docking as a Promising Predictive Model for Silver Nanoparticle-Mediated Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 12, p. 5126–5134, 23 dez. 2019.
- WAZIR, H. et al. Synthesis, Crystal Structure, Cytotoxic, Antileishmanial and Docking Evaluation of 3-(4-Chloro-3-nitrophenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one. **Chinese Journal of Structural Chemistry**, v. 37, p. 1250–1258, 15 ago. 2018.
- WENG, Y. L. et al. Molecular dynamics and in silico mutagenesis on the reversible inhibitor-bound SARS-CoV-2 main protease complexes reveal the role of lateral pocket in enhancing the ligand affinity. **Scientific Reports** **2021** **11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 1 abr. 2021.
- WHO. **Coronavirus disease (COVID-19)**. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>>. Acesso em: 10 fev. 2023a.
- WHO. **Therapeutics and COVID-19: living guideline**. Disponível em: <<https://app.magicapp.org/#/guideline/nBkO1E>>. Acesso em: 7 fev. 2023b.
- WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 26 fev. 2023c.
- XIONG, G. et al. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W5–W14, 2 jul. 2021.
- XU, C. et al. Discovery, synthesis, and optimization of an N-alkoxy indolylacetamide against HIV-1 carrying NNRTI-resistant mutations from the Isatis indigotica root. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 189, p. 112071, 2020.
- XU, M. et al. Chalcone derivatives and their antibacterial activities: Current development. **Bioorganic Chemistry**, v. 91, n. July, p. 103133, out. 2019.
- YADAV, R. et al. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 821, 1 abr. 2021.
- YADAVA, U. Search algorithms and scoring methods in protein-ligand docking. **Endocrinology&Metabolism International Journal**, v. 6, n. 6, 13 nov. 2018.
- YANG, C. J. et al. Remdesivir use in the coronavirus disease 2019 pandemic: A mini-review. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, v. 54, n. 1, p. 27, 1 fev. 2021.
- YARLAGADDA, H. et al. COVID-19 Vaccine Challenges in Developing and Developed Countries. **Cureus**, v. 14, n. 4, 8 abr. 2022.

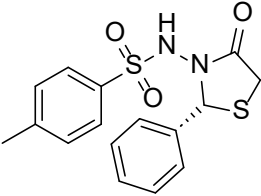
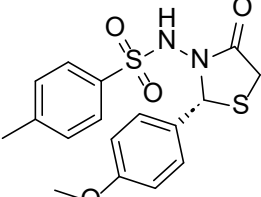
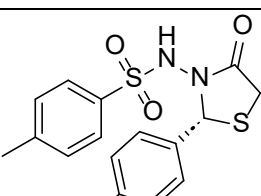
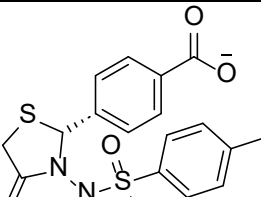
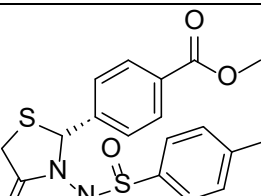
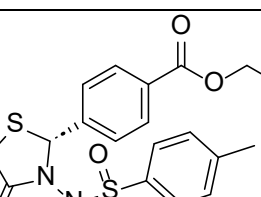
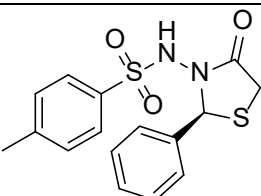
ZHANG, D.; LAZIM, R. Application of conventional molecular dynamics simulation in evaluating the stability of apomyoglobin in urea solution. **Scientific Reports** 2017 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–12, 16 mar. 2017.

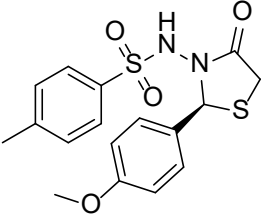
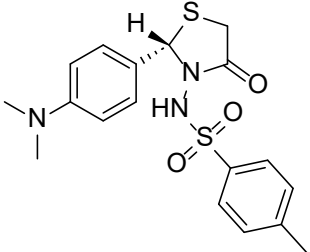
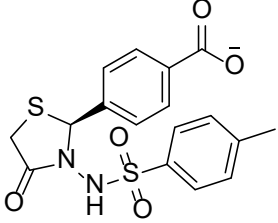
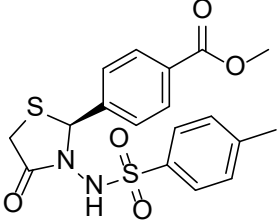
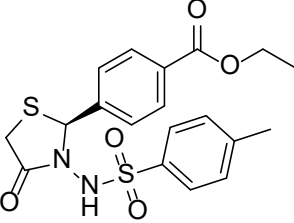
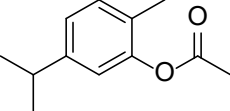
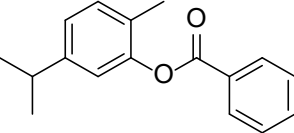
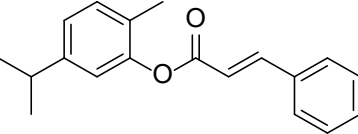
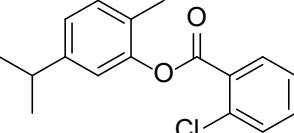
ZHANG, L. et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved  $\alpha$ -ketoamide inhibitors. **Science**, v. 368, n. 6489, p. 409–412, 24 abr. 2020.

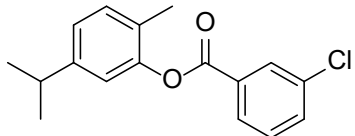
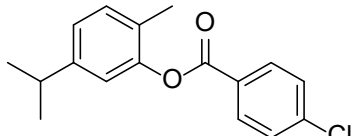
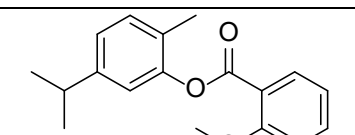
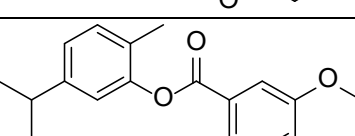
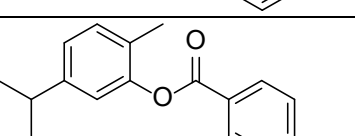
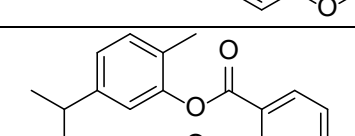
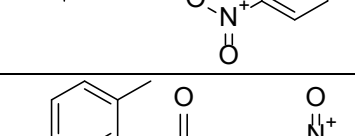
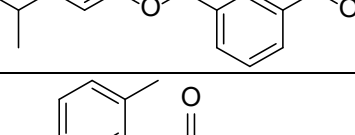
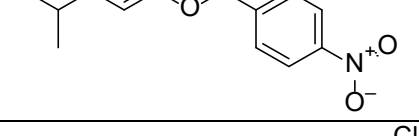
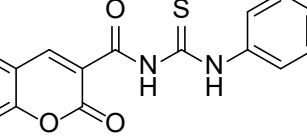
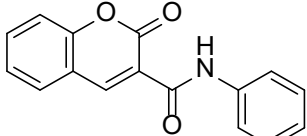
ZHOU, S.-F. Drugs Behave as Substrates, Inhibitors and Inducers of Human Cytochrome P450 3A4. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 4, p. 310–322, 1 maio 2008.

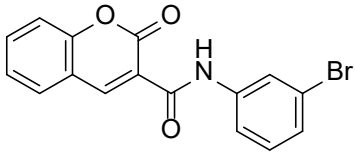
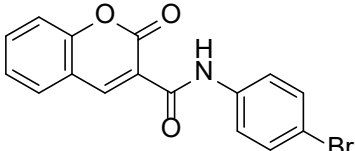
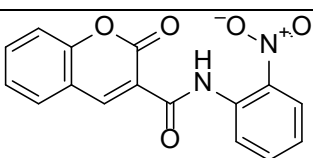
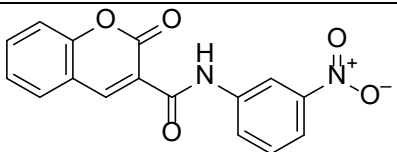
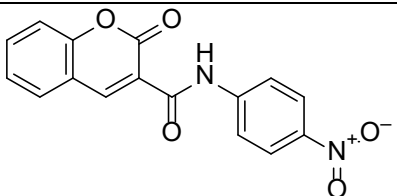
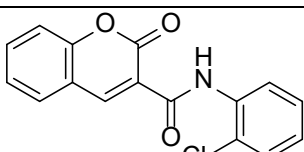
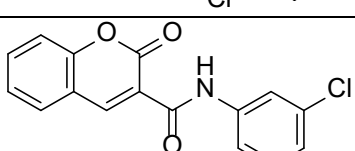
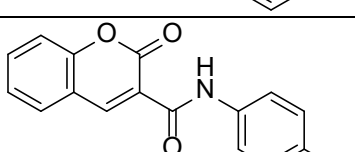
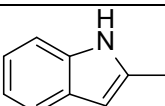
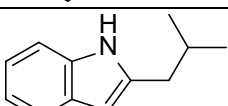
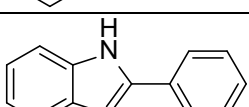
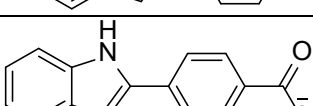
## APÊNDICES

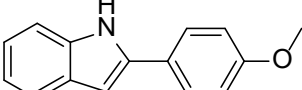
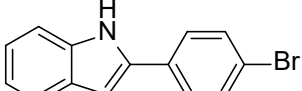
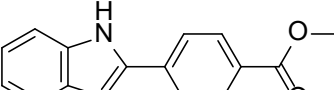
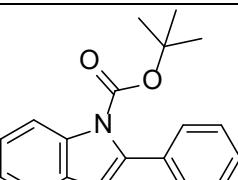
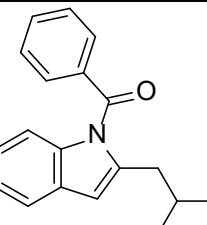
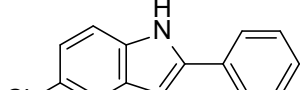
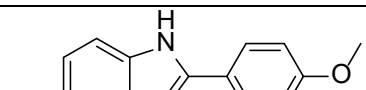
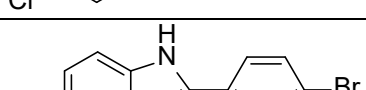
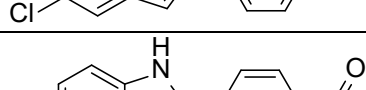
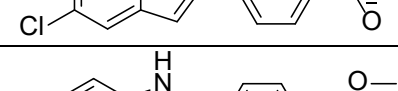
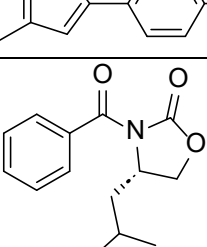
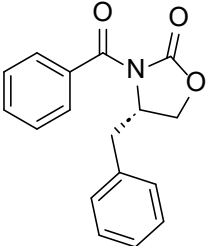
**APÊNDICE A:** Estruturas e energia de ligação média prevista para as 313 estruturas triadas.

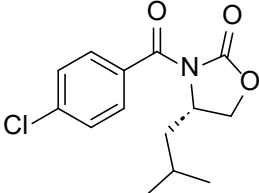
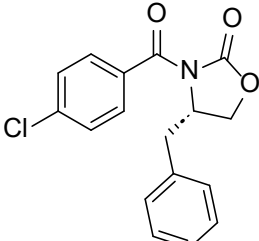
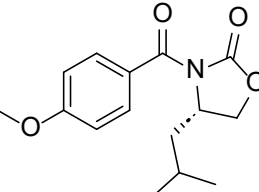
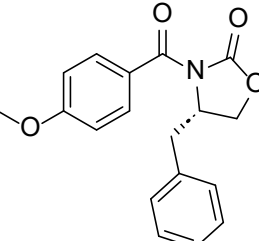
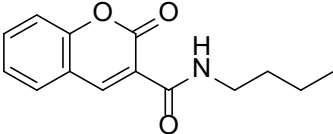
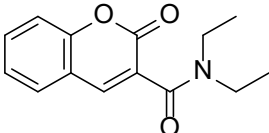
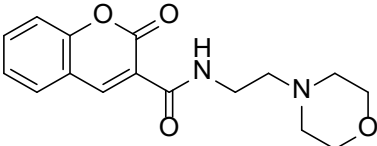
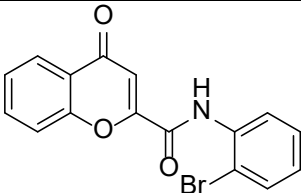
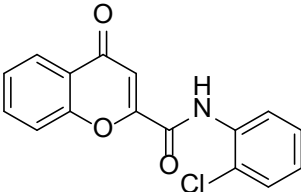
Código	Estrutura	6LU7	6Y2F	Média
LMed-44 (R)		-7.0	-6.3	-6.65
LMed-45 (R)		-7.1	-6.3	-6.7
LMed-46 (R)		-7.3	-6.6	-6.95
LMed-47 (R)		-7.3	-6.6	-6.95
LMed-48 (R)		-7.2	-6.6	-6.9
LMed-49 (R)		-7.2	-6.7	-6.95
LMed-44 (S)		-7.5	-6.1	-6.8

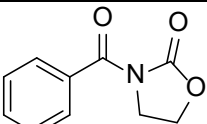
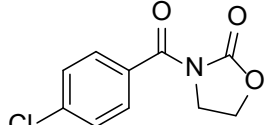
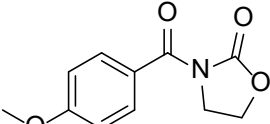
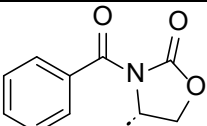
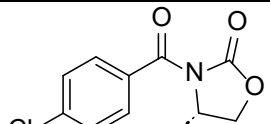
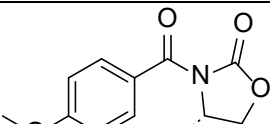
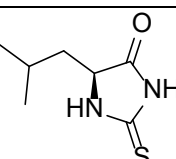
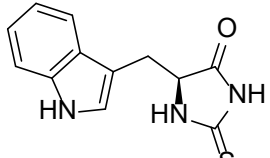
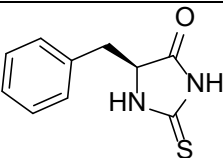
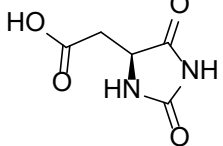
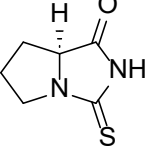
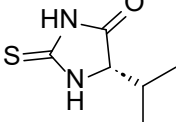
LMed-45 (S)		-7.4	-5.9	-6.65
LMed-46 (S)		-6.7	-7.1	-6.9
LMed-47 (S)		-7.8	-7.1	-7.45
LMed-48 (S)		-6.8	-5.9	-6.35
LMed-49 (S)		-7.7	-6.2	-6.95
LMed-1		-5.8	-5.4	-5.6
LMed-2		-6.4	-6.0	-6.2
LMed-3		-7.0	-6.6	-6.8
LMed-4		-6.6	-6.2	-6.4

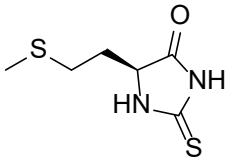
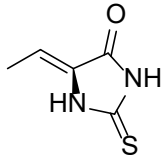
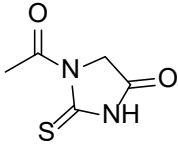
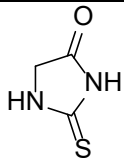
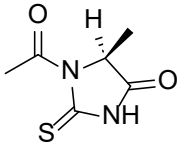
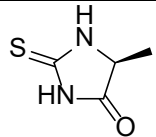
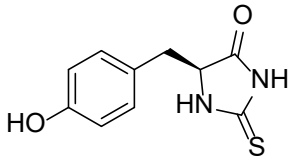
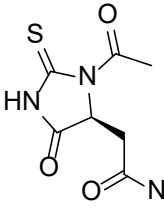
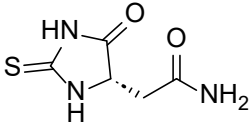
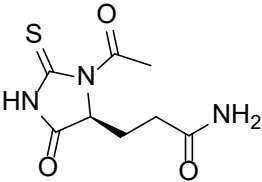
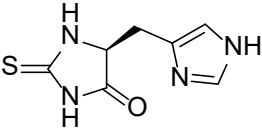
LMed-5		-6.7	-6.5	-6.6
LMed-6		-6.6	-6.3	-6.45
LMed-7		-6.8	-6.2	-6.5
LMed-8		-6.9	-6.7	-6.8
LMed-9		-6.8	-6.1	-6.45
LMed-10		-7.4	-6.7	-7.05
LMed-11		-7.6	-7.2	-7.4
LMed-12		-7.4	-7.0	-7.2
LMed-13		-7.3	-7.2	-7.25
LMed-14		-7.3	-6.9	-7.1
LMed-15		-7.5	-6.9	-7.2

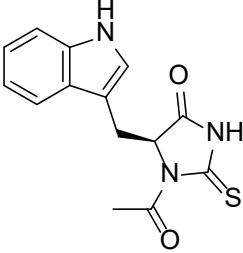
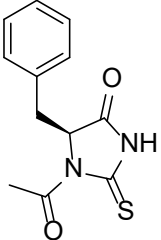
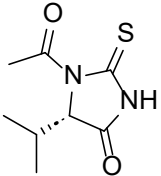
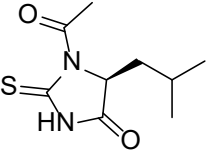
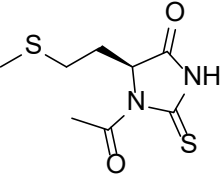
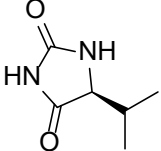
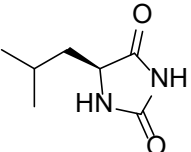
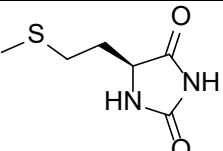
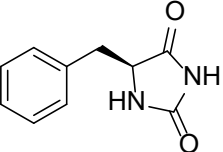
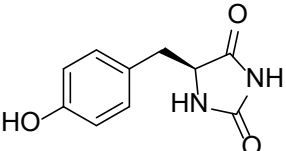
LMed-16		-7.5	-7.1	-7.3
LMed-17		-7.3	-6.9	-7.1
LMed-18		-8.7	-7.1	-7.9
LMed-19		-7.3	-7.2	-7.25
LMed-20		-7.2	-7.2	-7.2
LMed-21		-7.3	-6.9	-7.1
LMed-22		-7.5	-7.1	-7.3
LMed-23		-7.3	-7.0	-7.15
LMed-24		-4.7	-4.6	-4.65
LMed-25		-5.4	-5.5	-5.45
LMed-26		-6.5	-6.3	-6.4
LMed-27		-7.0	-6.4	-6.7

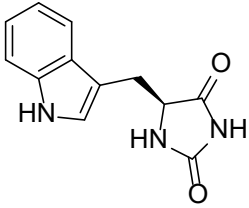
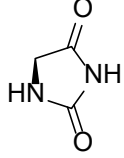
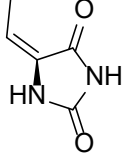
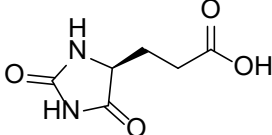
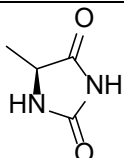
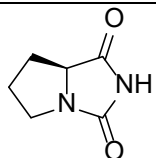
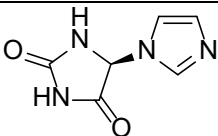
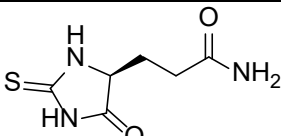
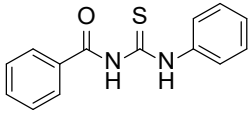
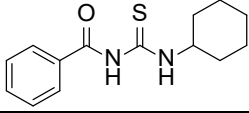
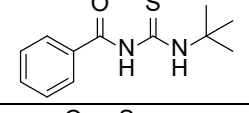
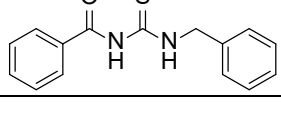
<b>LMed-28</b>		-6.5	-6.4	-6.45
<b>LMed-29</b>		-6.6	-6.4	-6.5
<b>LMed-30</b>		-6.5	-6.4	-6.45
<b>LMed-31</b>		-6.8	-6.4	-6.6
<b>LMed-32</b>		-7.1	-6.7	-6.9
<b>LMed-33</b>		-6.8	-6.3	-6.55
<b>LMed-34</b>		-6.7	-6.3	-6.5
<b>LMed-35</b>		-6.8	-6.2	-6.5
<b>LMed-36</b>		-7.1	-6.5	-6.8
<b>LMed-37</b>		-6.7	-6.5	-6.6
<b>LMed-38</b>		-6.2	-5.8	-6
<b>LMed-39</b>		-6.2	-6.1	-6.15

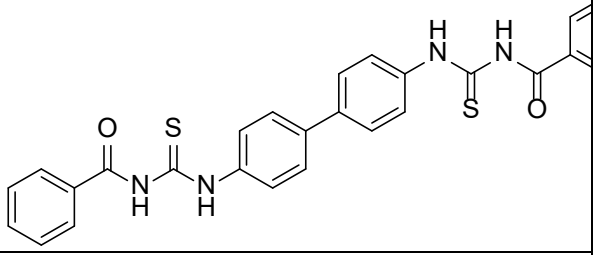
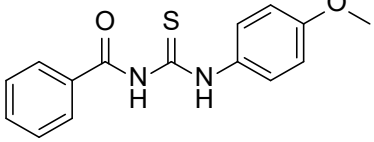
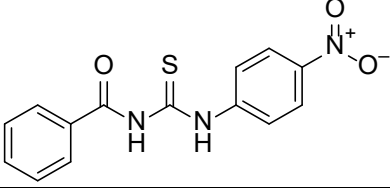
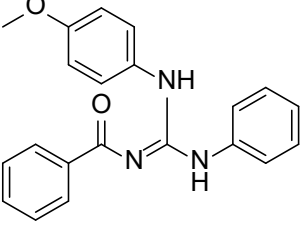
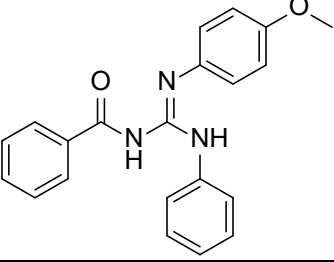
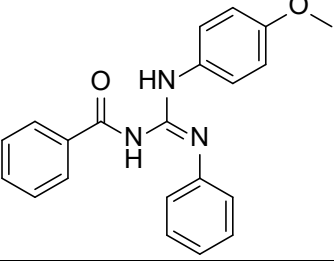
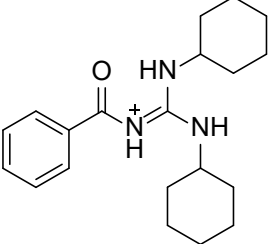
LMed-40		-6.3	-6.0	-6.15
LMed-41		-6.7	-6.3	-6.5
LMed-42		-6.3	-6.0	-6.15
LMed-43		-6.8	-6.2	-6.5
LMed-50		-6.5	-6.0	-6.25
LMed-51		-6.0	-6.2	-6.1
LMed-52		-6.7	-6.9	-6.8
LMed-53		-7.2	-7.4	-7.3
LMed-54		-7.5	-7.2	-7.35

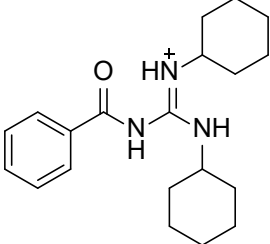
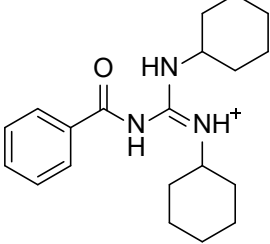
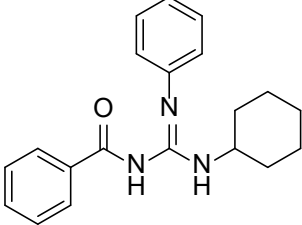
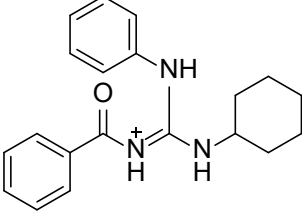
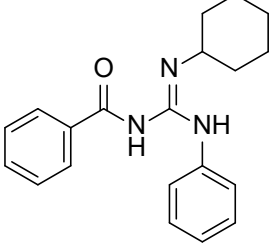
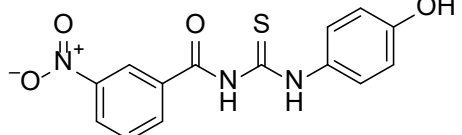
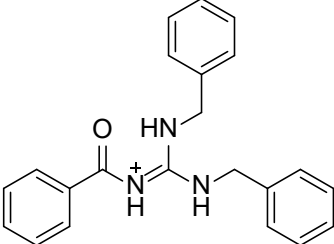
LMed-55		-5.8	-5.4	-5.6
LMed-56		-6.0	-5.7	-5.85
LMed-57		-6.0	-5.8	-5.9
LMed-58		-6.0	-5.7	-5.85
LMed-59		-6.3	-5.9	-6.1
LMed-60		-6.2	-5.7	-5.95
LMed-61		-4.5	-4.6	-4.55
LMed-62		-6.4	-6.2	-6.3
LMed-63		-5.6	-5.5	-5.55
LMed-95		-4.9	-4.8	-4.85
LMed-64		-4.6	-4.4	-4.5
LMed-65		-4.4	-4.4	-4.4

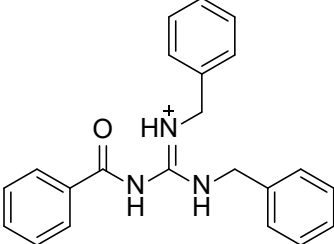
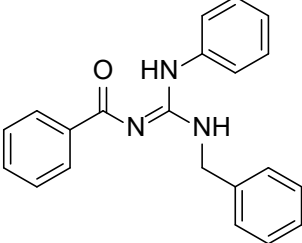
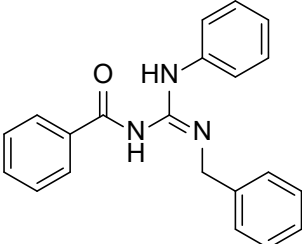
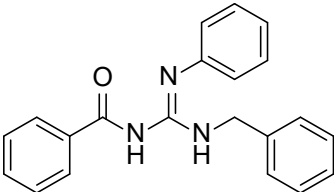
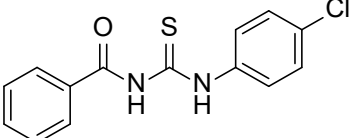
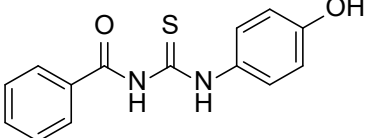
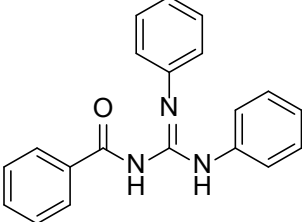
LMed-66		-4.4	-4.4	-4.4
LMed-67		-4.6	-4.8	-4.7
LMed-68		-4.7	-4.5	-4.6
LMed-69		-3.9	-3.9	-3.9
LMed-70		-5.0	-4.7	-4.85
LMed-71		-4.3	-4.3	-4.3
LMed-72		-5.8	-5.6	-5.7
LMed-73		-5.7	-5.0	-5.35
LMed-74		-4.8	-4.9	-4.85
LMed-75		-5.7	-5.4	-5.55
LMed-76		-5.4	-5.3	-5.35

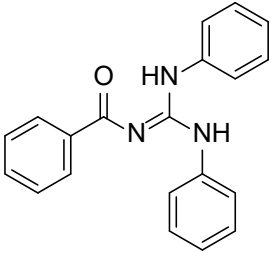
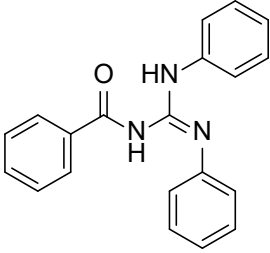
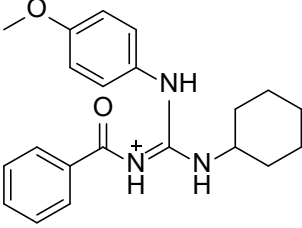
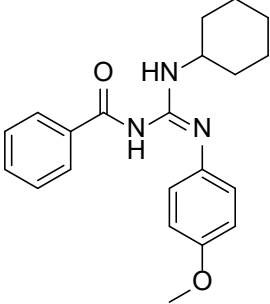
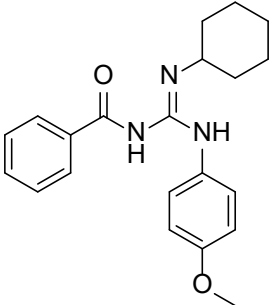
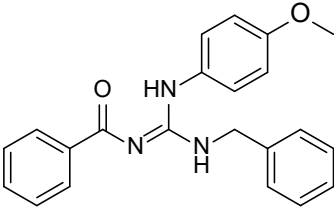
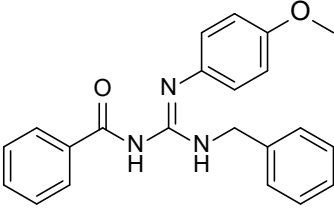
LMed-77		-7.0	-6.7	-6.85
LMed-78		-6.4	-5.9	-6.15
LMed-79		-4.7	-4.8	-4.75
LMed-80		-5.5	-4.9	-5.2
LMed-81		-5.0	-4.7	-4.85
LMed-82		-5.0	-4.8	-4.9
LMed-83		-5.0	-4.9	-4.95
LMed-84		-4.8	-4.5	-4.65
LMed-85		-6.4	-5.6	-6
LMed-86		-6.2	-5.7	-5.95

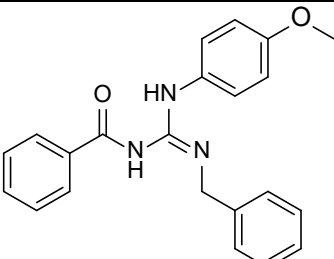
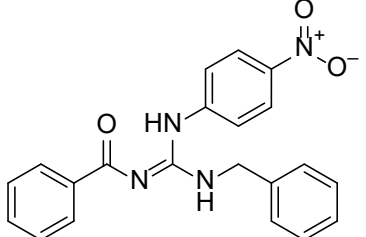
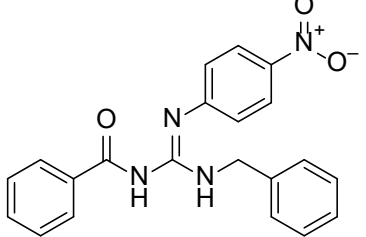
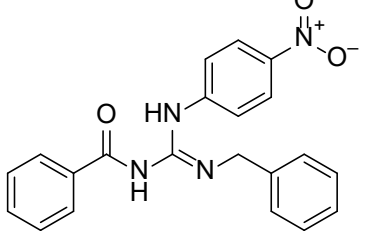
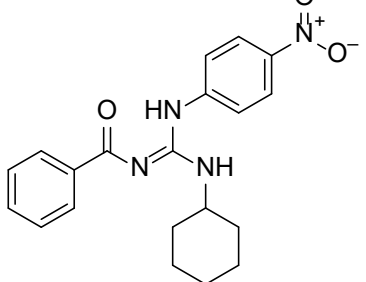
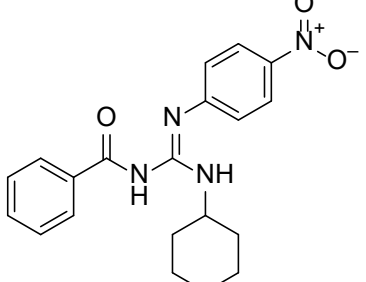
LMed-87		-7.1	-6.3	-6.7
LMed-88		-4.3	-4.1	-4.2
LMed-89		-5.0	-4.8	-4.9
LMed-90		-5.5	-5.2	-5.35
LMed-91		-4.6	-4.5	-4.55
LMed-92		-5.2	-5.1	-5.15
LMed-93		-5.7	-5.4	-5.55
LMed-94		-5.1	-5.1	-5.1
LMed-96		-6.7	-5.9	-6.3
LMed-97		-6.7	-5.8	-6.25
LMed-98		-5.6	-5.5	-5.55
LMed-99		-6.6	-6.0	-6.3

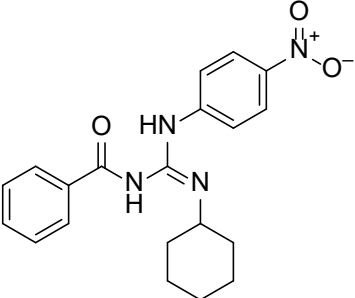
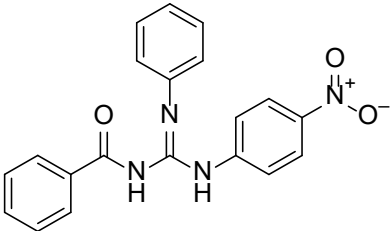
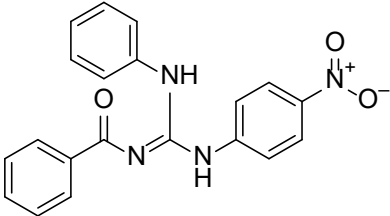
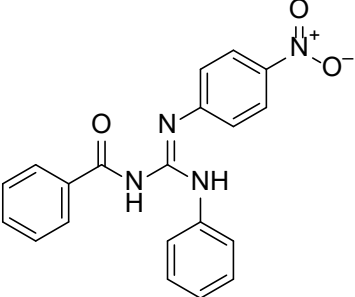
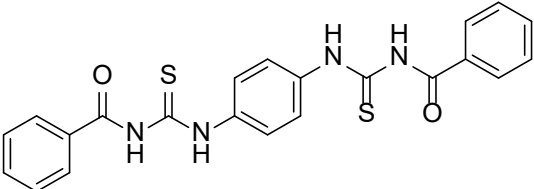
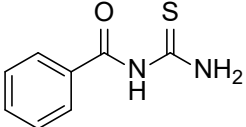
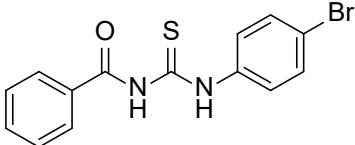
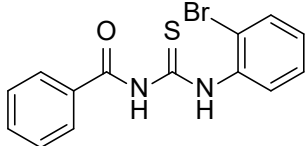
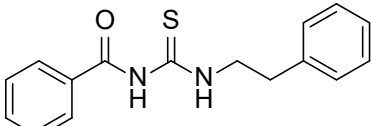
<b>LMed-100</b>		-8.1	-7.17	-7.655
<b>LMed-101</b>		-6.6	-5.8	-6.2
<b>LMed-102</b>		-6.8	-6.3	-6.55
<b>LMed-103</b>		-7.3	-7.1	-7.2
<b>LMed-104</b>		-8.0	-6.8	-7.4
<b>LMed-105</b>		-7.7	-7.1	-7.4
<b>LMed-106</b>		-7.6	-7.0	-7.3

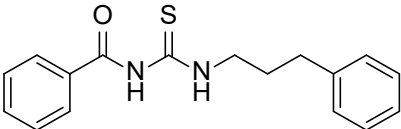
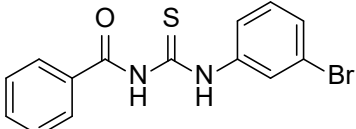
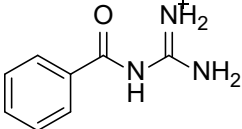
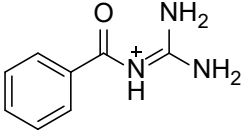
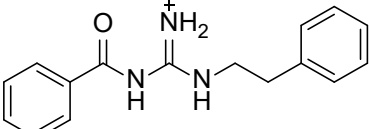
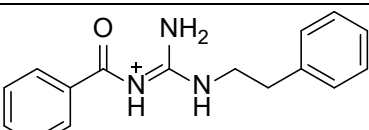
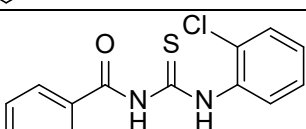
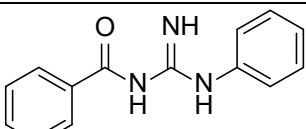
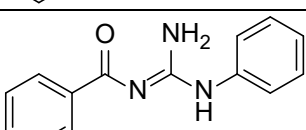
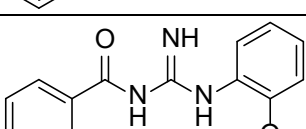
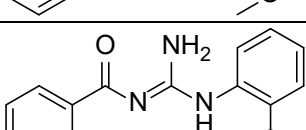
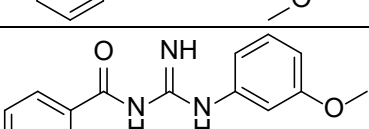
LMed-107		-7.8	-7.1	-7.45
LMed-108		-7.6	-7.0	-7.3
LMed-109		-7.8	-6.9	-7.35
LMed-110		-8.4	-7.7	-8.05
LMed-111		-7.5	-6.9	-7.2
LMed-112		-7.2	-7.1	-7.15
LMed-113		-7.7	-6.1	-6.9

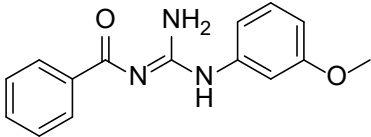
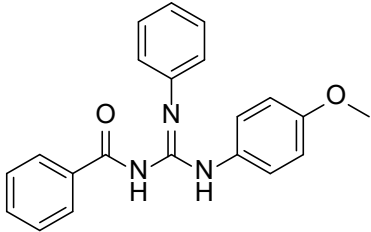
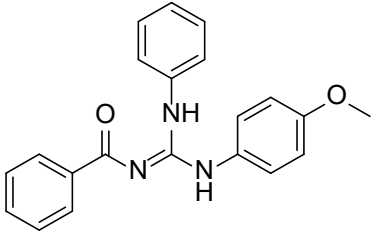
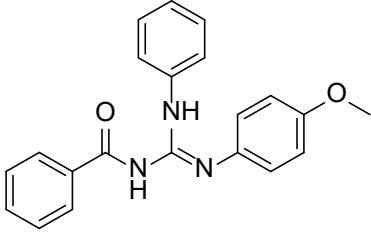
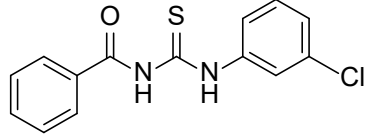
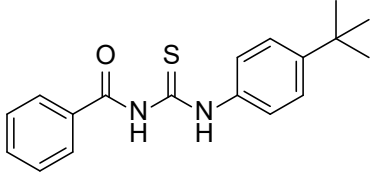
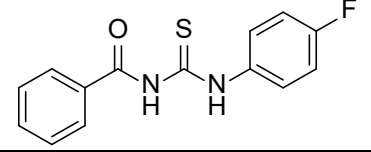
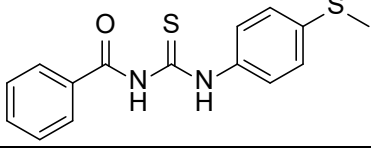
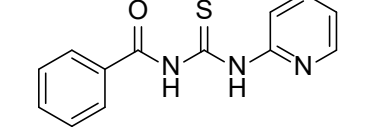
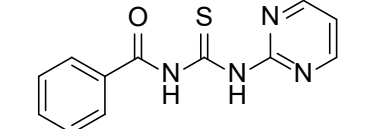
LMed-114		-8.1	-6.7	-7.4
LMed-115		-7.6	-6.4	-7
LMed-116		-7.9	-7.1	-7.5
LMed-117		-8.9	-7.12	-8.01
LMed-118		-8.1	-6.9	-7.5
LMed-119		-6.3	-5.8	-6.05
LMed-120		-7.0	-6.4	-6.7
LMed-121		-7.6	-6.8	-7.2

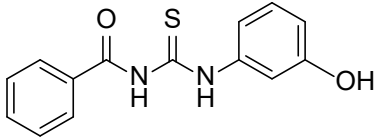
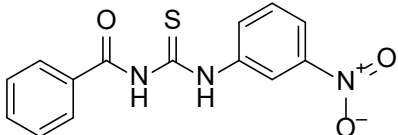
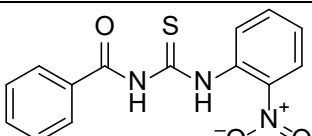
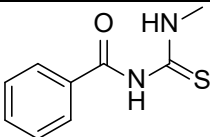
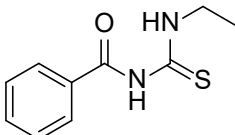
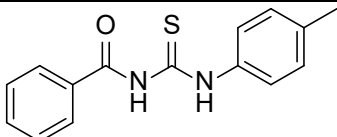
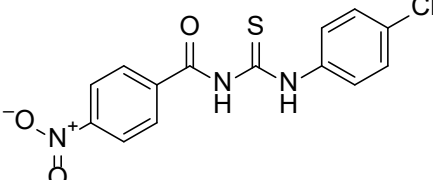
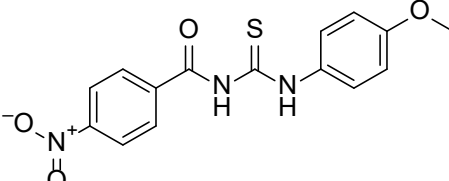
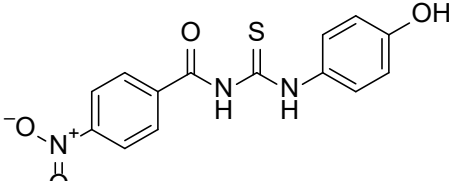
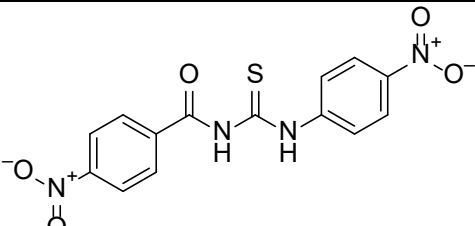
<b>LMed-122</b>		-7.7	-7.2	-7.45
<b>LMed-123</b>		-7.8	-6.9	-7.35
<b>LMed-124</b>		-8.3	-7.6	-7.95
<b>LMed-125</b>		-7.6	-6.7	-7.15
<b>LMed-126</b>		-7.6	-7.1	-7.35
<b>LMed-127</b>		-7.7	-7.3	-7.5
<b>LMed-128</b>		-7.6	-6.4	-7

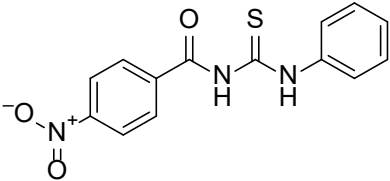
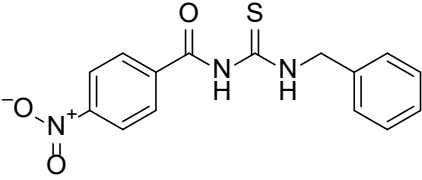
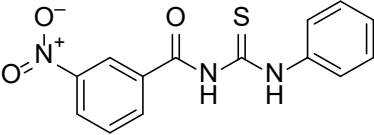
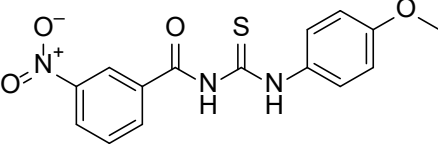
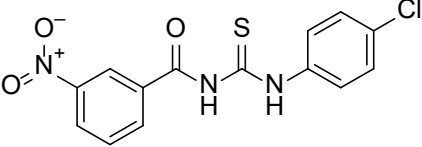
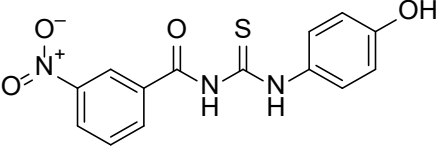
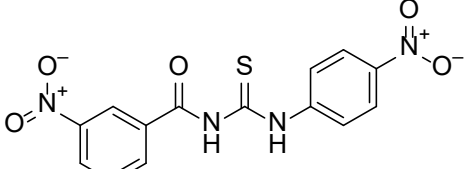
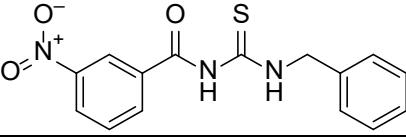
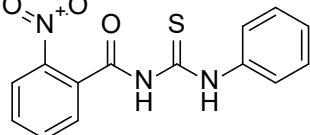
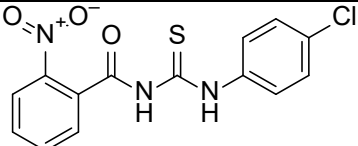
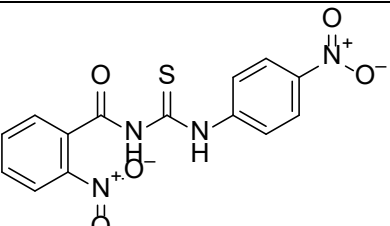
<b>LMed-129</b>		-8.1	-7.4	-7.75
<b>LMed-130</b>		-7.5	-6.5	-7
<b>LMed-131</b>		-7.6	-7.3	-7.45
<b>LMed-132</b>		-7.6	-7.5	-7.55
<b>LMed-133</b>		-8.1	-7.14	-7.625
<b>LMed-134</b>		-8.0	-7.0	-7.5

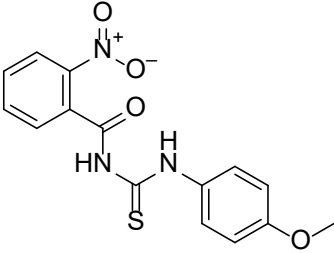
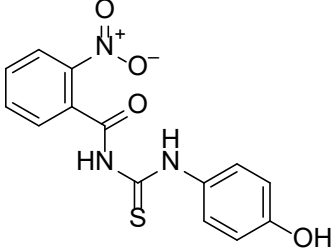
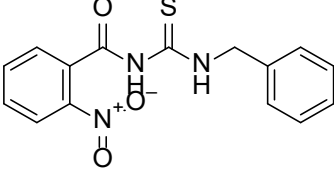
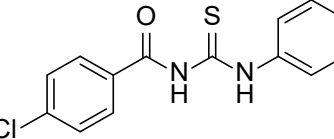
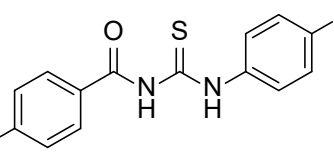
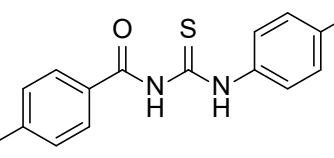
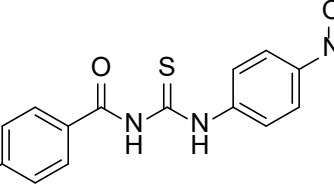
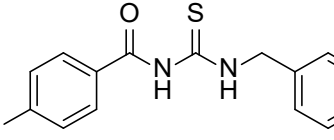
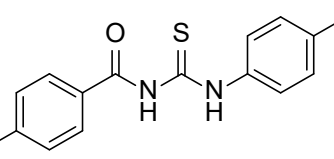
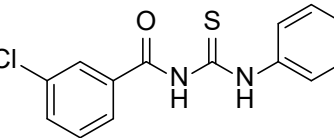
LMed-135		-7.6	-7.3	-7.45
LMed-136		-8.6	-7.9	-8.25
LMed-137		-8.5	-7.8	-8.15
LMed-138		-7.7	-7.6	-7.65
LMed-139		-7.3	-6.5	-6.9
LMed-140		-5.1	-4.8	-4.95
LMed-141		-6.3	-5.8	-6.05
LMed-142		-6.5	-6.1	-6.3
LMed-143		-6.3	-5.2	-5.75

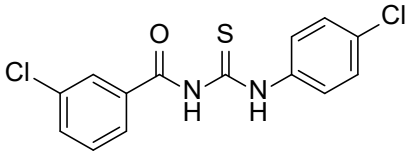
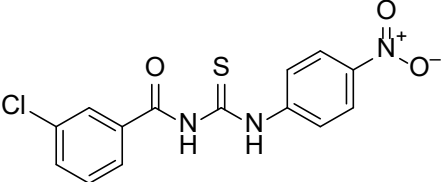
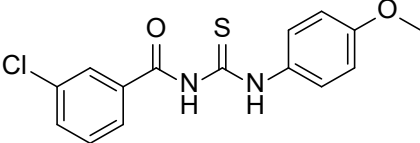
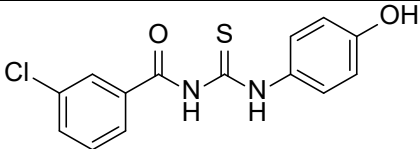
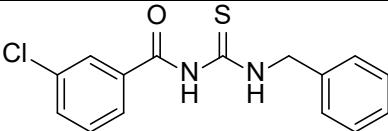
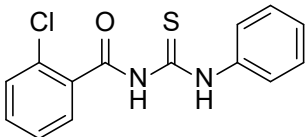
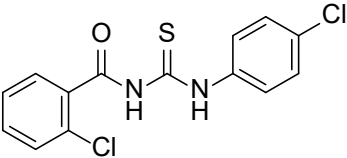
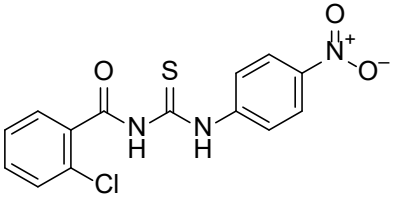
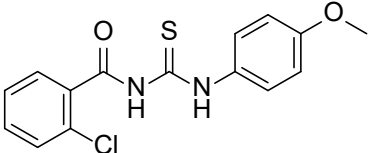
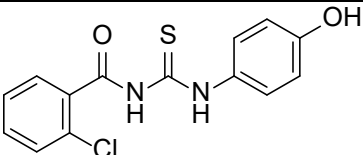
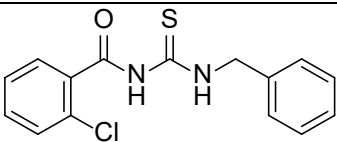
LMed-144		-6.1	-6.4	-6.25
LMed-145		-6.5	-6.0	-6.25
LMed-146		-5.4	-5.0	-5.2
LMed-147		-5.3	-5.2	-5.25
LMed-148		-6.5	-5.5	-6
LMed-149		-6.6	-6.0	-6.3
LMed-150		-6.5	-6.1	-6.3
LMed-151		-6.9	-6.5	-6.7
LMed-152		-6.4	-5.7	-6.05
LMed-153		-6.5	-6.3	-6.4
LMed-154		-6.7	-5.9	-6.3
LMed-155		-6.7	-6.4	-6.55

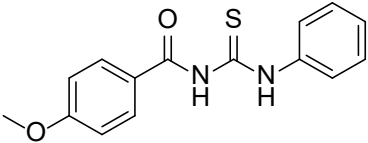
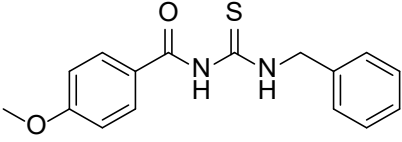
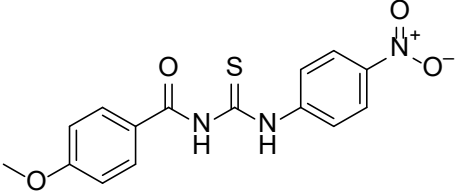
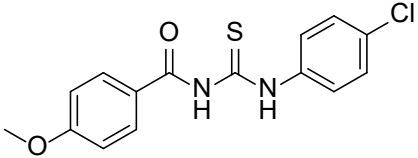
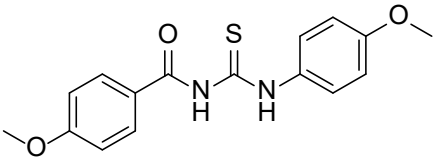
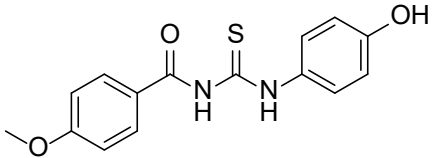
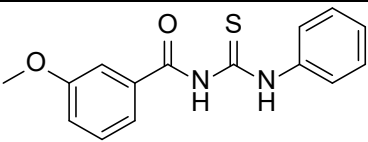
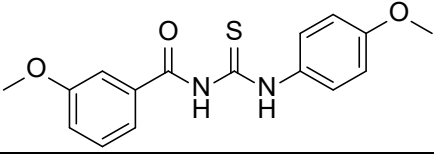
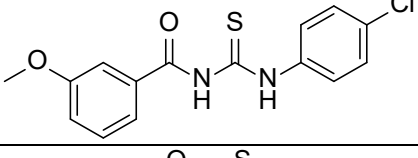
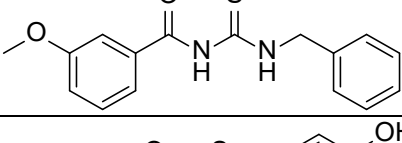
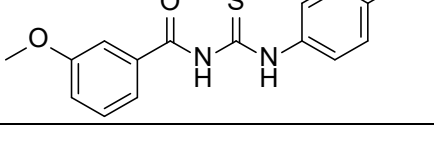
<b>LMed-156</b>		-6.6	-6.0	-6.3
<b>LMed-157</b>		-7.4	-7.3	-7.35
<b>LMed-158</b>		-7.7	-6.9	-7.3
<b>LMed-159</b>		-7.5	-7.0	-7.25
<b>LMed-160</b>		-6.6	-6.1	-6.35
<b>LMed-161</b>		-6.8	-6.6	-6.7
<b>LMed-162</b>		-6.7	-5.9	-6.3
<b>LMed-163</b>		-6.2	-5.9	-6.05
<b>LMed-164</b>		-6.6	-6.0	-6.3
<b>LMed-165</b>		-6.4	-5.9	-6.15

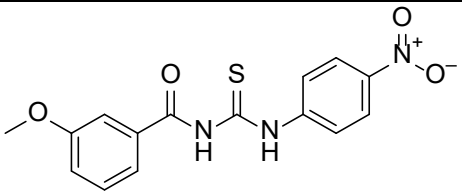
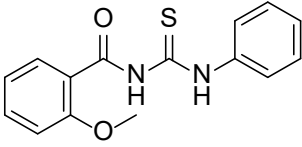
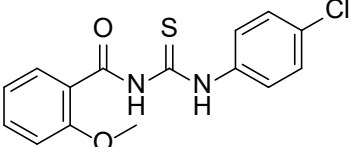
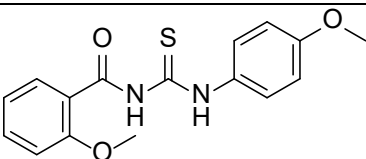
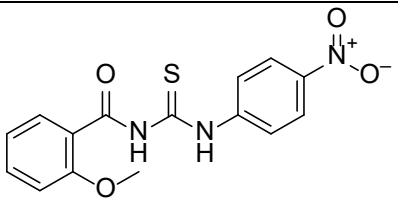
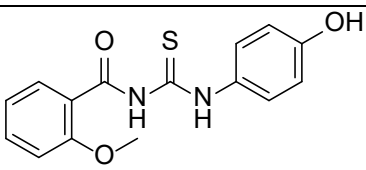
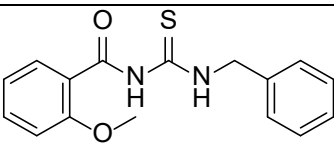
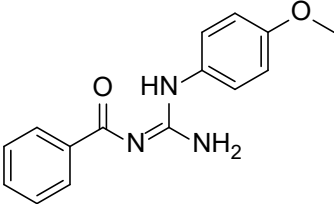
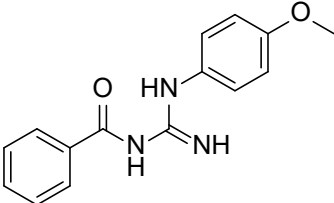
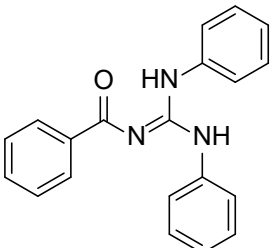
LMed-166		-7.0	-6.5	-6.75
LMed-167		-6.7	-6.4	-6.55
LMed-168		-7.1	-6.5	-6.8
LMed-169		-5.3	-4.9	-5.1
LMed-170		-5.2	-4.9	-5.05
LMed-171		-6.5	-6.0	-6.25
LMed-172		-6.7	-6.5	-6.6
LMed-173		-6.7	-6.5	-6.6
LMed-174		-7.4	-6.6	-7
LMed-175		-7.5	-7.1	-7.3

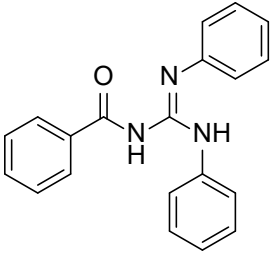
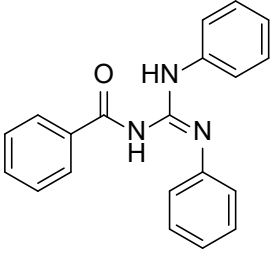
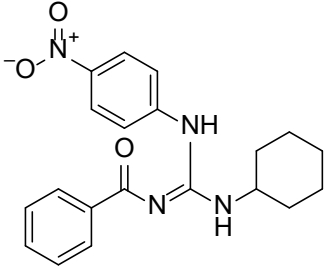
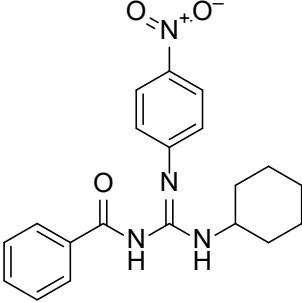
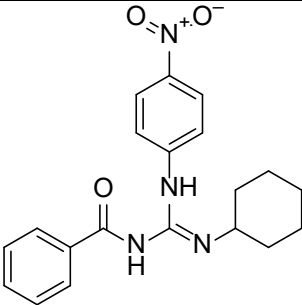
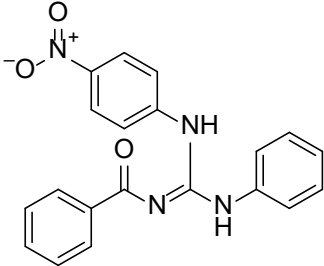
LMed-176		-6.9	-6.3	-6.6
LMed-177		-6.7	-6.7	-6.7
LMed-178		-6.9	-6.6	-6.75
LMed-179		-7.0	-6.7	-6.85
LMed-180		-6.8	-6.8	-6.8
LMed-181		-7.2	-7.0	-7.1
LMed-182		-7.4	-7.4	-7.4
LMed-183		-6.9	-7.1	-7
LMed-184		-7.3	-6.3	-6.8
LMed-185		-7.0	-6.4	-6.7
LMed-186		-6.8	-6.7	-6.75

LMed-187		-7.2	-6.6	-6.9
LMed-188		-7.1	-6.8	-6.95
LMed-189		-6.5	-6.4	-6.45
LMed-190		-6.9	-5.7	-6.3
LMed-191		-6.6	-6.0	-6.3
LMed-192		-7.0	-6.0	-6.5
LMed-193		-7.0	-6.4	-6.7
LMed-194		-6.7	-6.1	-6.4
LMed-195		-7.2	-6.3	-6.75
LMed-196		-7.0	-6.2	-6.6

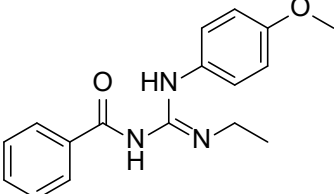
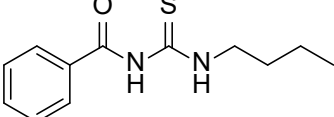
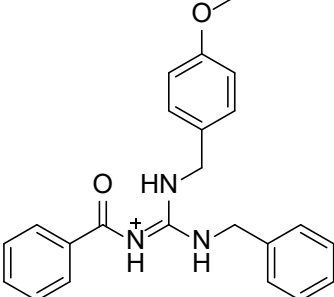
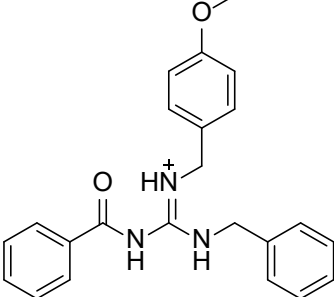
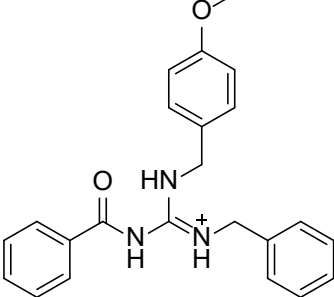
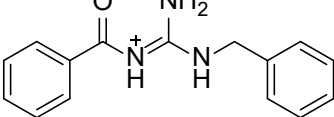
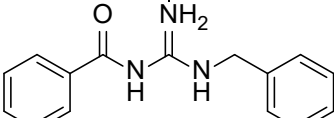
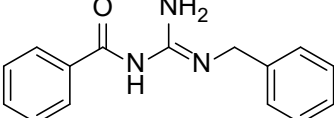
LMed-197		-6.7	-6.2	-6.45
LMed-198		-6.7	-6.5	-6.6
LMed-199		-6.6	-6.4	-6.5
LMed-200		-7.2	-6.3	-6.75
LMed-201		-6.8	-6.3	-6.55
LMed-202		-6.9	-6.1	-6.5
LMed-203		-6.9	-6.0	-6.45
LMed-204		-6.8	-6.4	-6.6
LMed-205		-6.4	-5.8	-6.1
LMed-206		-7.3	-6.5	-6.9
LMed-207		-6.8	-6.1	-6.45

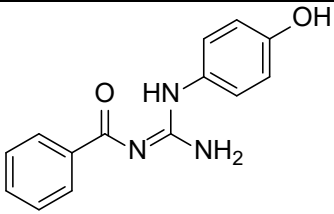
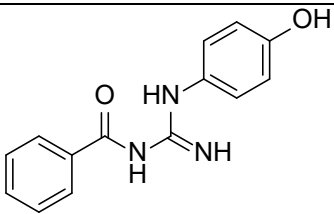
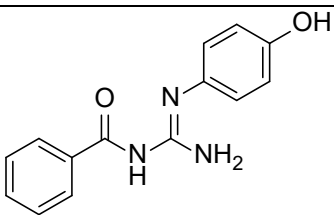
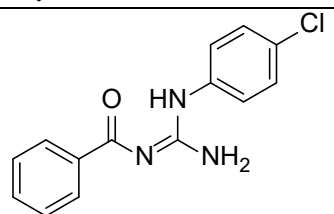
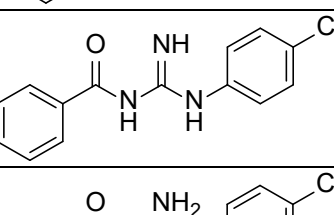
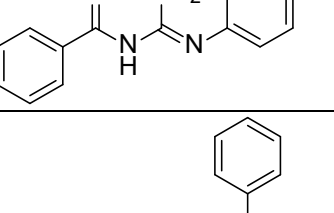
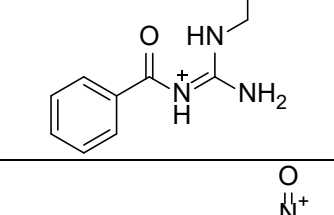
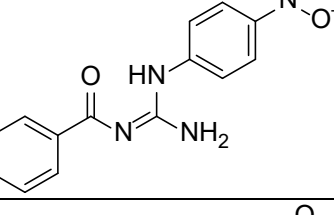
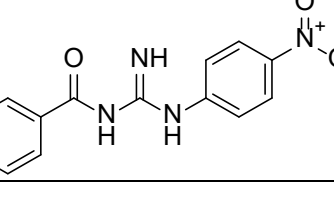
LMed-208		-6.9	-6.0	-6.45
LMed-209		-6.6	-5.7	-6.15
LMed-210		-6.8	-6.3	-6.55
LMed-211		-6.7	-6.0	-6.35
LMed-212		-6.2	-6.1	-6.15
LMed-213		-7.2	-6.2	-6.7
LMed-214		-7.2	-6.3	-6.75
LMed-215		-6.7	-6.5	-6.6
LMed-216		-6.8	-6.3	-6.55
LMed-217		-7.0	-6.7	-6.85
LMed-218		-7.5	-6.6	-7.05

LMed-219		-7.0	-6.9	-6.95
LMed-220		-6.8	-6.0	-6.4
LMed-221		-6.8	-6.0	-6.4
LMed-222		-6.3	-5.8	-6.05
LMed-223		-6.6	-6.4	-6.5
LMed-224		-6.7	-6.5	-6.6
LMed-225		-6.6	-6.0	-6.3
LMed-226		-6.5	-6.0	-6.25
LMed-227		-6.7	-6.4	-6.55
LMed-228		-7.6	-7.2	-7.4

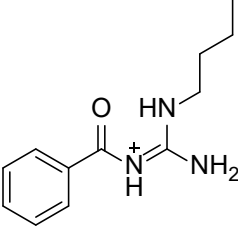
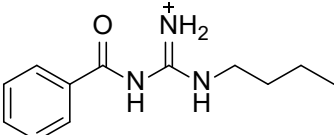
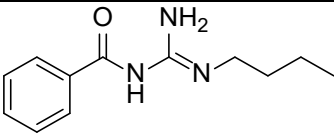
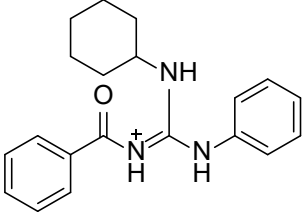
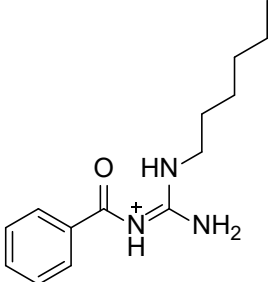
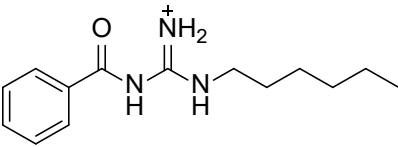
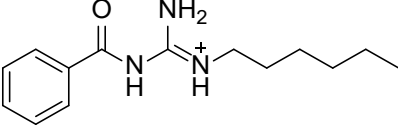
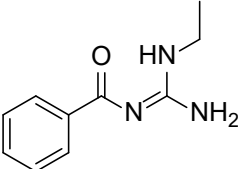
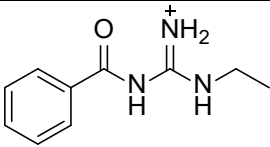
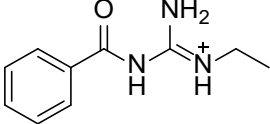
LMed-229		-7.5	-6.8	-7.15
LMed-230		-7.8	-6.9	-7.35
LMed-231		-8.1	-7.13	-7.615
LMed-232		-7.6	-7.1	-7.35
LMed-233		-8.2	-7.5	-7.85
LMed-234		-7.5	-7.2	-7.35

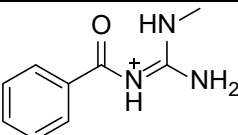
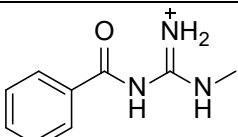
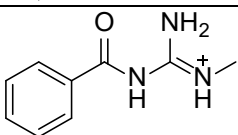
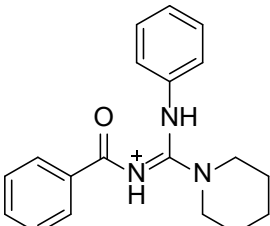
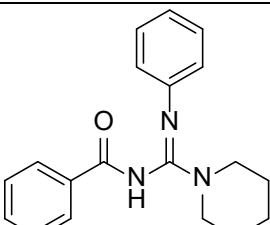
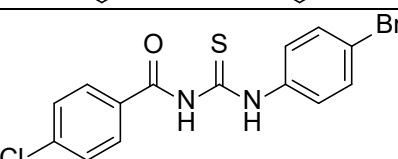
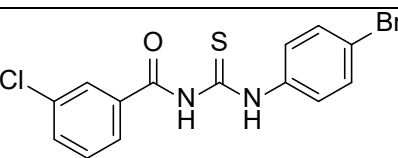
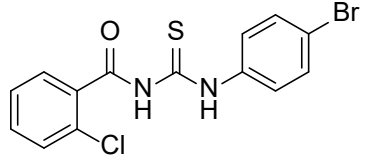
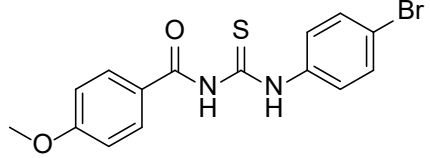
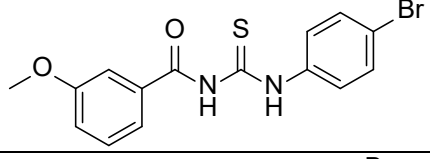
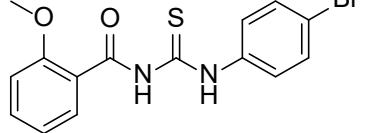
LMed-235		-7.7	-7.1	-7.4
LMed-236		-8.1	-7.15	-7.635
LMed-237		-7.9	-7.0	-7.45
LMed-238		-8	-7.3	-7.65
LMed-239		-7.6	-7.3	-7.45
LMed-240		-6.7	-6.2	-6.45
LMed-241		-6.7	-6.0	-6.35

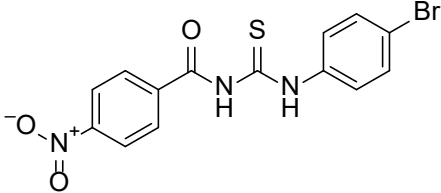
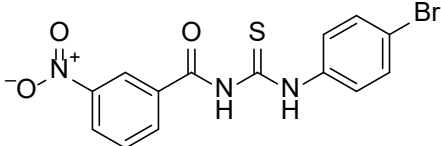
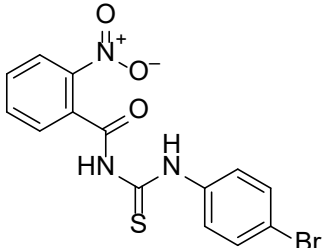
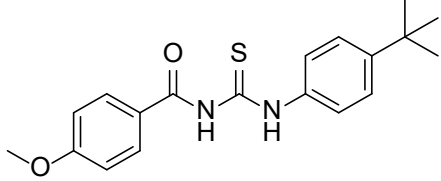
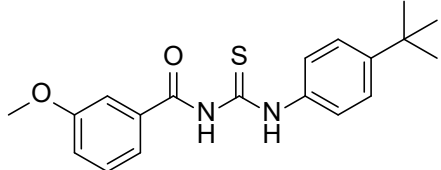
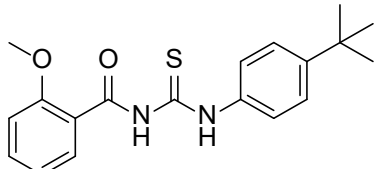
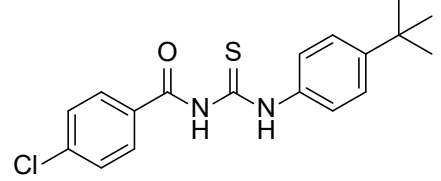
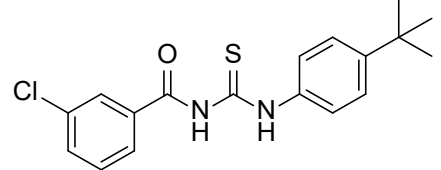
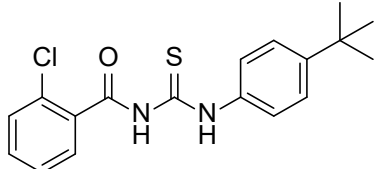
LMed-242		-6.7	-6.0	-6.35
LMed-243		-5.8	-5.2	-5.5
LMed-244		-7.8	-6.9	-7.35
LMed-245		-7.9	-7.1	-7.5
LMed-246		-7.8	-7.2	-7.5
LMed-247		-6.6	-6.2	-6.4
LMed-248		-6.5	-6.2	-6.35
LMed-249		-6.6	-5.9	-6.25

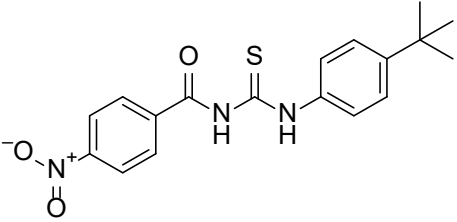
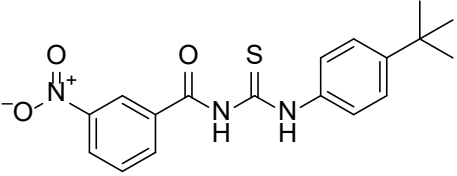
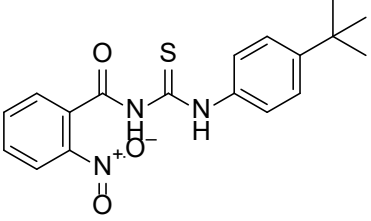
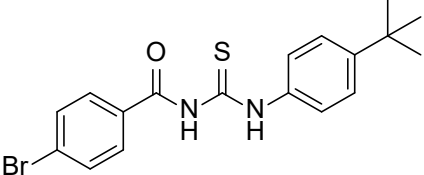
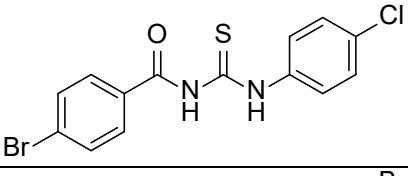
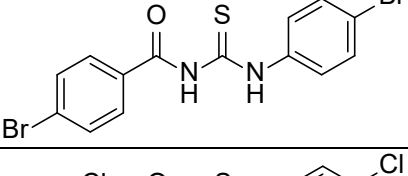
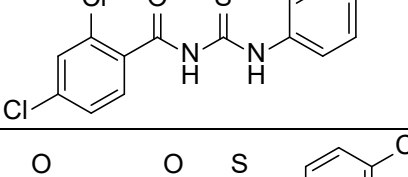
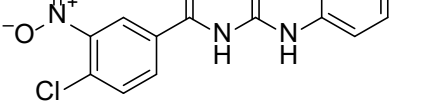
<b>LMed-250</b>		-6.5	-5.9	-6.2
<b>LMed-251</b>		-7.2	-6.6	-6.9
<b>LMed-252</b>		-7.2	-6.7	-6.95
<b>LMed-253</b>		-6.3	-6.0	-6.15
<b>LMed-254</b>		-6.8	-6.4	-6.6
<b>LMed-255</b>		-6.6	-5.9	-6.25
<b>LMed-256</b>		-6.4	-6.1	-6.25
<b>LMed-257</b>		-6.8	-6.1	-6.45
<b>LMed-258</b>		-6.8	-6.8	-6.8

LMed-259		-6.6	-6.1	-6.35
LMed-260		-6.7	-6.4	-6.55
LMed-261		-6.5	-5.8	-6.15
LMed-262		-6.8	-6.5	-6.65
LMed-263		-6.7	-6.1	-6.4
LMed-264		-7.3	-7.0	-7.15
LMed-265		-6.9	-6.3	-6.6
LMed-266		-6.2	-5.8	-6
LMed-267		-8.1	-7.16	-7.645
LMed-268		-7.3	-7.2	-7.25
LMed-269		-5.7	-5.4	-5.55

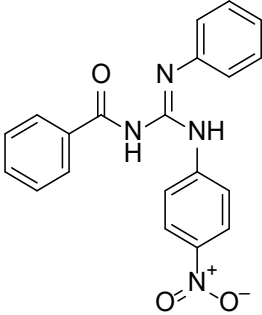
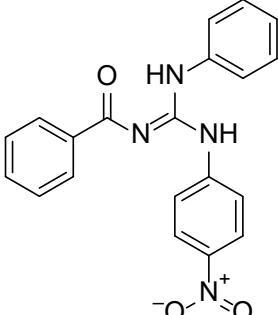
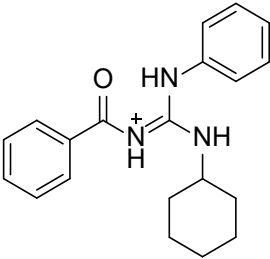
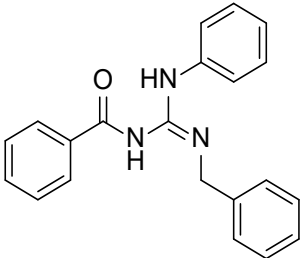
LMed-270		-5.6	-5.2	-5.4
LMed-271		-5.7	-5.3	-5.5
LMed-272		-5.9	-5.4	-5.65
LMed-273		-8.8	-7.11	-7.955
LMed-274		-5.6	-5.6	-5.6
LMed-275		-5.8	-5.4	-5.6
LMed-276		-5.7	-5.6	-5.65
LMed-277		-5.5	-5.3	-5.4
LMed-278		-5.6	-5.1	-5.35
LMed-279		-5.8	-5.3	-5.55

LMed-280		-5.5	-5.2	-5.35
LMed-281		-5.5	-5.2	-5.35
LMed-282		-5.7	-5.2	-5.45
LMed-283		-7.4	-7.1	-7.25
LMed-284		-7.6	-6.9	-7.25
LMed-285		-6.3	-6.0	-6.15
LMed-286		-6.4	-6.0	-6.2
LMed-287		-6.3	-5.8	-6.05
LMed-288		-6.2	-6.1	-6.15
LMed-289		-6.3	-6.6	-6.45
LMed-290		-6.3	-5.9	-6.1

<b>LMed-291</b>		-6.7	-6.6	-6.65
<b>LMed-292</b>		-6.7	-6.9	-6.8
<b>LMed-293</b>		-6.5	-6.4	-6.45
<b>LMed-294</b>		-6.5	-6.5	-6.5
<b>LMed-295</b>		-6.5	-6.8	-6.65
<b>LMed-296</b>		-6.4	-6.4	-6.4
<b>LMed-297</b>		-6.5	-6.5	-6.5
<b>LMed-298</b>		-6.6	-6.7	-6.65
<b>LMed-299</b>		-6.4	-6.4	-6.4

<b>LMed-300</b>		-6.9	-6.9	-6.9
<b>LMed-301</b>		-7.0	-7.3	-7.15
<b>LMed-302</b>		-6.6	-6.7	-6.65
<b>LMed-303</b>		-6.8	-6.5	-6.65
<b>LMed-304</b>		-6.5	-6.1	-6.3
<b>LMed-305</b>		-6.2	-6.1	-6.15
<b>LMed-306</b>		-6.8	-6.1	-6.45
<b>LMed-307</b>		-6.7	-6.8	-6.75

**APÊNDICE B:** Interações hidrofóbicas entre as quatro benzoilguanidinas selecionadas e a enzima M<sup>pro</sup>.

Structure	2D structures	Hydrophobic Interactions	
		6LU7	6Y2F
LMed-136		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Met49</li> <li>- Leu141</li> <li>- His163</li> <li>- Met165</li> <li>- Asp187</li> <li>- Arg189</li> <li>- Cys145</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Met49</li> <li>- Leu141</li> <li>- His163</li> <li>- Met165</li> <li>- Glu166</li> <li>- Asp187</li> <li>- Cys145</li> </ul>
LMed-137		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Met165</li> <li>- Leu167</li> <li>- Pro168</li> <li>- Asp187</li> <li>- Gln192</li> <li>- His41</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- His163</li> <li>- Met165</li> <li>- Asp187</li> <li>- Gln192</li> <li>- His41</li> <li>- Cys145</li> </ul>
LMed-110		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Met49</li> <li>- Asp142</li> <li>- Met165</li> <li>- Asp187</li> <li>- Arg188</li> <li>- His41</li> <li>- Cys145</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Met49</li> <li>- Phe140</li> <li>- Leu141</li> <li>- Met165</li> <li>- Asp187</li> <li>- Gln189</li> <li>- His41</li> <li>- Cys145</li> </ul>
LMed-117		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Met49</li> <li>- Phe140</li> <li>- Leu141</li> <li>- Cys145</li> <li>- His163</li> <li>- His164</li> <li>- Asp187</li> <li>- Arg188</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Met49</li> <li>- Phe140</li> <li>- Leu141</li> <li>- His163</li> <li>- Met165</li> <li>- Asp187</li> <li>- Arg188</li> <li>- Gln189</li> <li>- His41</li> <li>- Cys145</li> </ul>

**ANEXOS**

## ANEXO A

Artigo publicado : ***In silico* approach identified benzoylguanidines as SARS CoV 2 main protease M<sup>pro</sup> potential inhibitors**

JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE AND DYNAMICS  
<https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2123396>



Check for updates

***In silico* approach identified benzoylguanidines as SARS-CoV-2 main protease (M<sup>pro</sup>) potential inhibitors**

Kaio Maciel de Santiago-Silva<sup>a</sup>, Priscila Camargo<sup>a</sup>, Gabriel Felix da Silva Gomes<sup>a</sup>, Ana Paula Sotero<sup>b</sup>, Alexandre Orsato<sup>a</sup>, Carla Cristina Perez<sup>a</sup>, Gerson Nakazato<sup>c</sup>, Camilo Henrique da Silva Lima<sup>b</sup> and Marcelle Bispo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Síntese de Moléculas Medicinais (LaSMMed), Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil; <sup>b</sup>Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>c</sup>Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

Communicated by Ramaswamy H. Sarma

**ABSTRACT**

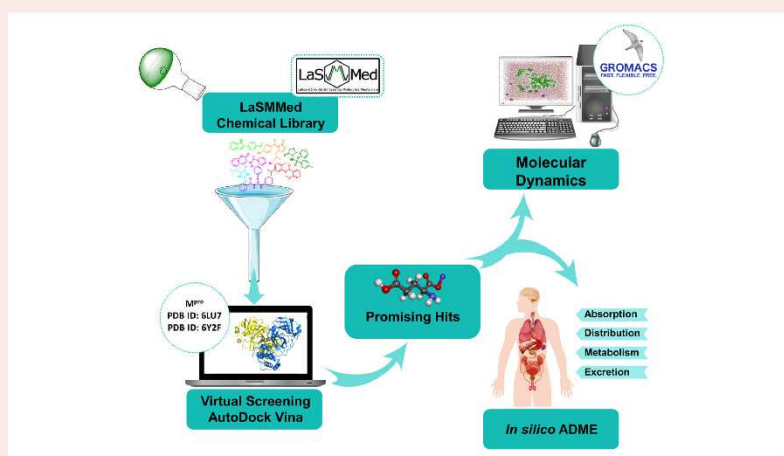
The coronavirus disease-2019 (COVID-19) pandemic, caused by the novel coronavirus severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2), became the highest public health crisis nowadays. Although the use of approved vaccines for emergency immunization and the reuse of FDA-approved drugs remains at the forefront, the search for new, more selective, and potent drug candidates from synthetic compounds is also a viable alternative to combat this viral disease. In this context, the present study employed a computational virtual screening approach based on molecular docking and molecular dynamics (MD) simulation to identify possible inhibitors for SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> (main protease), an important molecular target required for the maturation of the various polyproteins involved in viral replication. The virtual screening approach selected four potential inhibitors against SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>. In addition, MD simulation studies revealed changes in the positions of the ligands during the simulations compared to the complex obtained in the molecular docking studies, showing the benzoylguanidines **LMed-110** and **LMed-136** have a higher affinity for the active site compared to the other structures that tended to leave the active site. Besides, there was a better understanding of the formation and stability of the existing H-bonds in the formed complexes and the energetic contributions to the stability of the target-ligand molecular complexes. Finally, the *in silico* prediction of the ADME profile suggested that **LMed-136** has drug-like characteristics and good pharmacokinetic properties. Therefore, from the present study, it can be suggested that these structures can inhibit SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>. Nevertheless, further studies are needed *in vitro* assays to investigate the antiviral properties of these structures against SARS-CoV-2.

**ARTICLE HISTORY**

Received 1 March 2022  
 Accepted 6 September 2022

**KEYWORDS**

3CL<sup>pro</sup>; ADME; Coronavirus; COVID-19; molecular docking; molecular dynamics



**CONTACT** M. L. F. Bispo [mlfbispo@uel.br](mailto:mlfbispo@uel.br)

Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2123396>

© 2022 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

## ANEXO B

Artigo publicado: **Antileishmanial activity of 4,8-dimethoxynaphthalenyl chalcones on *Leishmania amazonensis***

Article

## Antileishmanial Activity of 4,8-Dimethoxynaphthalenyl Chalcones on *Leishmania amazonensis*

Kaio Maciel de Santiago-Silva <sup>1</sup>, Bruna Taciane da Silva Bortoleti <sup>2,3</sup>, Laudicéa do Nascimento Oliveira <sup>4</sup>, Fernanda Lima de Azevedo Maia <sup>4</sup>, Joyce Cristina Castro <sup>4</sup>, Ivete Conchon Costa <sup>2</sup>, Danielle Bidóia Lázarin <sup>2</sup>, James L. Wardell <sup>5</sup>, Solange M. S. V. Wardell <sup>6</sup>, Magaly Girão Albuquerque <sup>4</sup>, Camilo Henrique da Silva Lima <sup>4</sup>, Wander Rogério Pavanelli <sup>2</sup>, Marcelle de Lima Ferreira Bispo <sup>1,\*</sup> and Raoni Schroeder B. Gonçalves <sup>4,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratório de Síntese de Moléculas Medicinais (LaSMed), Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina 86057-970, PR, Brazil
- <sup>2</sup> Laboratório de Imunoparasitologia das Doenças Negligenciadas e Câncer (LIDNC), Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina 86057-970, PR, Brazil
- <sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Instituto Carlos Chagas (ICC), Fiocruz, Curitiba 81350-010, PR, Brazil
- <sup>4</sup> Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-909, RJ, Brazil
- <sup>5</sup> Department of Chemistry, University of Aberdeen, Meston Walk, Old Aberdeen, Aberdeen AB24 3UE, Scotland, UK
- <sup>6</sup> CHEMSOL, 1 Harcourt Road, Aberdeen AB15 5NY, Scotland, UK
- \* Correspondence: mlfbispo@ucl.br (M.d.L.F.B.); raoni.schroeder@iq.ufrj.br (R.S.B.C.); Tel.: +55-43-33714810 (M.d.L.F.B.)



Citation: de Santiago-Silva, K.M.; Bortoleti, B.T.d.S.; Oliveira, L.d.N.; Maia, F.L.d.A.; Castro, J.C.; Costa, J.C.; Lázarin, D.B.; Wardell, J.L.; Wardell, S.M.S.V.; Albuquerque, M.G.; et al. Antileishmanial Activity of 4,8-Dimethoxynaphthalenyl Chalcones on *Leishmania amazonensis*. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1402. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101402>

Academic Editors: Željko Petrovski and Luis Cobra Branco

Received: 1 September 2022  
Accepted: 3 October 2022  
Published: 13 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by *Leishmania* species. Available therapeutic options have several limitations. The drive to develop new, more potent, and selective antileishmanial agents is thus a major goal. Herein we report the synthesis and the biological activity evaluation against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis* of nine 4,8-dimethoxynaphthalenyl chalcones. Compound ((E)-1-(4,8-dimethoxynaphthalen-1-yl)-3-(4-nitrophenyl)prop-2-en-1-one), **4f**, was the most promising with an  $IC_{50} = 3.3 \pm 0.34 \mu M$  (promastigotes), a low cytotoxicity profile ( $CC_{50} = 372.9 \pm 0.04 \mu M$ ), and a high selectivity index ( $SI = 112.6$ ). Furthermore, **4f** induced several morphological and ultrastructural changes in the free promastigote forms, loss of plasma membrane integrity, and increased reactive oxygen species (ROS). An in silico analysis of drug-likeness and ADME parameters suggested high oral bioavailability and intestinal absorption. Compound **4f** reduced the number of infected macrophages and the number of amastigotes per macrophage, with an  $IC_{30}$  value of  $18.5 \pm 1.19 \mu M$ . Molecular docking studies with targets, ARG and TR, showed that compound **4f** had more hydrogen bond interactions with the ARG enzyme, indicating a more stable protein-ligand binding. These results suggest that 4,8-dimethoxynaphthalenyl chalcones are worthy of further study as potential antileishmanial drugs.

**Keywords:** 4,8-dimethoxynaphthalenyl; arginase; leishmaniasis; neglected diseases; trypanosomatids; trypanothione reductase

### 1. Introduction

The leishmaniasis are a group of neglected diseases widely distributed among tropical and subtropical countries. Leishmaniasis are caused by the protozoan parasite of the genus *Leishmania* and transmitted to humans by the bite of infected female phlebotomine sandflies. This parasitic disease presents mainly four clinical manifestations: visceral leishmaniasis (VL, also known as kala-azar), cutaneous leishmaniasis (CL), diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), and mucocutaneous leishmaniasis (MCL). According to the World Health Organization (WHO), 700,000 to 1 million new cases and 26,000 to 65,000 deaths occur yearly, constituting a major global public health problem [1,2].

## ANEXO C

Artigo publicado: **Promising molecular targets related to polyamine biosynthesis in drug discovery against leishmaniasis**

2

Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)

Medicinal Chemistry, 2023, 19, 2-9



PERSPECTIVE

**Promising Molecular Targets Related to Polyamine Biosynthesis in Drug Discovery against Leishmaniasis**

Kaio M. Santiago-Silva<sup>1</sup>, Priscila G. Camargo<sup>1</sup> and Marcell L.F. Bispo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais (LaSMMed), Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

## ARTICLE HISTORY

Received: January 31, 2022  
Revised: March 30, 2022  
Accepted: April 06, 2022

DOI:  
10.2174/1573406418666220713145446



CrossMark

**Abstract:** Leishmaniasis is a neglected tropical disease widely distributed worldwide, caused by parasitic protozoa of the genus *Leishmania*. Despite representing a significant public health problem, the therapeutic options are old, with several reported adverse effects, have high costs, with administration mainly by parenteral route, which makes treatment difficult, increasing dropout and, consequently, the emergence of resistant strains. Thus, the research and development of new antileishmanial therapies become necessary. In this field, inhibiting essential targets that affect the parasite's growth, survival, and infectivity represents an attractive therapeutic strategy. With this in mind, this review addresses the main structural, functional characteristics and recent reports of the discovery of promising inhibitors of the enzymes Arginase (ARG) and trypanothione synthase (TryS), which are involved in the biosynthesis of polyamines and trypanothione and Trypanothione Reductase (TR), responsible for the reduction of trypanothione thiol.

**Keywords:** Arginase, leishmaniasis, polyamines, trypanothione synthase, trypanothione reductase, tropical disease.

## 1. INTRODUCTION

The leishmaniasis are a group of neglected tropical diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* and transmitted to humans by the bite of infected female sandfly insects. The three main types of leishmaniasis are cutaneous, mucocutaneous, and visceral. They are endemic in more than 98 countries, so it is estimated that more than 1 billion people live in tropical and subtropical areas considered endemic and at risk of infection [1].

Despite representing a major public health problem, leishmaniasis treatment is scarce, being mainly based on pentavalent antimonials, liposomal amphotericin B, pentamidine, and paromomycin, which have several adverse effects due to high toxicity, high cost, parenteral administration, and parasitic resistance to treatment. On the other hand, miltefosine has the advantage of oral administration and a short treatment period. However, it has limitations due to its teratogenic effects [2].

Faced with the need for new drugs, the Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi), in collaboration with pharmaceutical companies, seeks to develop a new generation of short-term, safe, effective, and affordable oral treatments. In light of recent efforts, DNDi has some promising candidates in Phase I clinical trials, such as the CRK12 inhibitor (GSK3186899/DDD85365), the protease inhibitor

(GSK3494245/DDD01305143), and candidates from the oxaborole classes (DNDI-6148) and a nitroimidazole (DNDI-0690) [3].

One way to speed up the drug development process is to use computational strategies. For example, Structure-Based Drug Design (SBDD) methods use three-dimensional structure data from biological targets, such as molecular docking, Structure-Based Virtual Screening (SBVS), and Molecular Dynamics (MD). Alternatively, a distinct approach named Ligand-Based Drug design (LBDD) comprises the analysis of bioactive small-molecule libraries. The most useful LBDD strategies are Ligand-Based Virtual Screening (LBVS), similarity search, QSAR modeling, and pharmacophore generation [4].

In the search for new antileishmanial agents, an important aspect is the identification of unique and essential metabolic pathways for the survival of the parasite, enabling selective inhibition. In this context, different metabolic pathways can be considered promising. However, the polyamine biosynthesis pathway stands out as it is strongly associated with the growth, cell proliferation, survival, and virulence of parasites and plays a crucial role in the formation of trypanothione and reduction of oxidative stress [5].

Polyamines are essential metabolites synthesized by an initial process involving the Arginase (ARG) to produce putrescine, the first polyamine in the pathway. Spermidine Synthetase (SpdS) uses putrescine as a substrate to produce spermidine (Spd). Then, Spd and glutathione (GSH) are substrates of trypanothione synthetase (TryS), yielding trypanothione (T(SH)<sub>2</sub>). This thiol is kept reduced by another en-

\*Address correspondence to this author at the Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais (LaSMMed), Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil; E-mail: [mfbispo@uel.br](mailto:mfbispo@uel.br)

## ANEXO D

Artigo publicado: **Molecular targets for chalcones in antileishmanial drug discovery**Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)

Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, xxx, xx, 000-000

1

## MINI-REVIEW ARTICLE

**Molecular Targets for Chalcones in Antileishmanial Drug Discovery**Kaio Maciel de Santiago-Silva<sup>1</sup>, Gabriel Felix da Silva Gomes<sup>1</sup>, Carla Cristina Perez<sup>1</sup>, Camilo Henrique da Silva Lima<sup>2</sup> and Marcelle de Lima Ferreira Bispo<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais (LaSMMed), Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil; <sup>2</sup>Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

**Abstract:** Leishmaniasis are infectious diseases caused by flagellated protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania* that infect cells of the mononuclear phagocytic system. These parasites are transmitted to humans by biting an infected female sandfly belonging to the genera *Phlebotomus* in the Old World and *Lutzomyia* in the New World. Despite representing a major public health problem, the therapeutic options are old and have several disadvantages. Given this scenario, developing vaccines or drugs for oral administration is necessary. Therefore, integrating computational and experimental strategies into the studies on molecular targets essential for the survival and virulence of the parasite is fundamental in researching and developing new treatments for leishmaniasis. In the effort to develop new vaccines and drugs, molecular docking methods are widely used as they explore the adopted conformations of small molecules within the binding sites of macromolecular targets and estimate the free energy of target-ligand binding. Privileged structures have been widely used as an effective model in medicinal chemistry for drug discovery. Chalcones are a common simple scaffold found in many compounds of natural and synthetic origin, where studies demonstrate the great pharmacological potential in treating leishmaniasis. This review is based on scientific articles published in the last ten years on molecular docking of chalcone derivatives for essential molecular targets of *Leishmania*. Thus, this review emphasizes how versatile chalcone derivatives can be used in developing new inhibitors of important molecular targets involved in the survival, growth, cell differentiation, and infectivity of the parasites that cause leishmaniasis.

## ARTICLE HISTORY

Received: September 28, 2022  
Revised: November 10, 2022  
Accepted: November 30, 2022DOI:  
10.2174/1389557523660230127125058**Keywords:** 1,3-diaryl-2-propen-1-ones, molecular docking, structure-based drug design, neglected tropical disease, *Leishmania*, Trypanosomatidae.

## 1. INTRODUCTION

Leishmaniasis are a group of neglected tropical diseases with limited investment in diagnosis, treatment, and control. They are caused by more than 20 parasitic protozoa species belonging to the genus *Leishmania* (Trypanosomatida: *Trypanosomatidae*) transmitted to the vertebrate host by biting infected female sandflies [1]. It has two main clinical forms in humans: visceral leishmaniasis (VL) and cutaneous leishmaniasis (CL). In addition, there are reports of rarer forms of CL, such as mucocutaneous leishmaniasis (MCL), diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), disseminated cutaneous leishmaniasis (DsCL), leishmaniasis recidivans (LR), and post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) [2].

Globally, leishmaniasis is endemic in 98 countries and three territories on five continents [3], where approximately

1 billion people live at risk of infection [4]. Based on estimations, around 50,000 to 90,000 new cases of VL occur annually worldwide, with only 25 to 45% reported to the WHO, which can cause 20,000 to 40,000 deaths annually. Furthermore, an estimated 600,000 to 1 million new CL cases occur annually [4].

Despite representing a major public health problem, to date, there is no effective vaccine. Traditional treatments using pentavalent antimonials, such as meglumine antimoniate and sodium stibogluconate, amphotericin B deoxycholate (AmB-D), amBisome (liposomal amphotericin B), miltefosine, pentamidine, and paromomycin are limited and face several disadvantages, such as price, efficacy, treatment regimen, long duration of administration, adverse side effects due to high toxicity, and resistance [5, 6]. In this context, developing and discovering new antileishmanial therapies that are more effective, safe, accessible, and orally available is necessary.

One way to speed up the drug development process and reduce research cost and time is the use of structure-based

\*Address correspondence to this author at the Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais (LaSMMed), Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil; E-mail: mlfbispo@uel.br