



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PPGFARMA

LUÍZA MATOS DE MACÊDO

**Triagem virtual para identificação de potenciais inibidores da
enzima dihidrofolato redutase – timidilato sintase de *Leishmania*
*chagasi***

Salvador

2022

LUÍZA MATOS DE MACÊDO

**Triagem virtual para identificação de potenciais inibidores da
enzima dihidrofolato redutase – timidilato sintase de *Leishmania
chagasi***

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação *Stricto Sensu* Em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. André Lacerda Braga Teles

Co-Orientadora: Prof. Dra. Erika Maria de Oliveira Ribeiro

Linha de Pesquisa: Linha 1 – Prospecção Química e Biológica de Recursos Naturais

Salvador

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB

M177t

Macêdo, Luíza Matos de

Triagem virtual para identificação de potenciais inibidores da enzima dihidrofolato redutase - timidilato sintase de *Leishmania chagasi* / Luíza Matos de Macêdo. - Salvador, 2022.

140 fls : il.

Orientador(a): André Lacerda Braga Teles.

Coorientador(a): Erika Maria de Oliveira Ribeiro.

Inclui Referências

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGFARMA, Campus I. 2022.

1.Química computacional. 2.Diidrofolato redutase. 3.*Leishmania chagasi*.

CDD: 615

FOLHA DE APROVAÇÃO

“TRIAGEM VIRTUAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA DIHIDROFOLATO REDUTASE – TIMIDILATO SINTASE DE LEISHMANIA CHAGASI”

LUÍZA MATOS DE MACÊDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 23 de fevereiro de 2022, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:



Professor(a) Dr(a). André Lacerda Braga Teles
Universidade do Estado da Bahia – UNEB
Doutorado em Biotecnologia
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS



Professor(a) Dr(a). Erika Maria de Oliveira Ribeiro
Universidade do Estado da Bahia – UNEB
Doutorado em Química
Universidade Federal da Bahia – UFBA)



Professor(a) Dr(a). Hemerson Iury Ferreira Magalhães
Universidade do Estado da Bahia – UNEB
Doutorado em Farmacologia
Universidade Federal do Ceará – UFC)



Professor(a) Dr(a). Franco Henrique Andrade Leite
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS
Doutorado em Biotecnologia
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte de toda sabedoria.

Agradeço a meus pais, Roberto e Vênis, por todo apoio e compreensão.

Agradeço aos Prof. Dr. André Teles e Profa. Erika Ribeiro, pela orientação e conhecimento passado.

Agradeço ao Ms. Moysés Fagundes Neto, por toda a disponibilidade, paciência e auxílio na construção do trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Samuel Pita, pela colaboração e parceria para realização da Dinâmica Molecular.

Agradeço ao Prof. Dr Humberto de Freitas, pela colaboração e parceria para construção do modelo da enzima.

Agradeço ao Prof. Dr. Franco Leite, pelo apoio com a metodologia para construção do modelo farmacofórico.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por ter concedido a oportunidade da realização do mestrado acadêmico.

RESUMO

Introdução: A Leishmaniose é uma doença causada por parasitos do gênero *Leishmania* e de alta incidência nas regiões da América Latina, África e Ásia. Dentre os tipos de leishmaniose, a visceral merece destaque por apresentar os maiores indicadores de letalidade no globo. Contudo, o arsenal terapêutico disponível para o tratamento destas afecções acarretam em severos efeitos tóxicos e de resistência dos parasitos, o que torna evidente a necessidade por novos fármacos antileishmania. Dessa forma, técnicas *in silico* baseadas em ligantes ativos e no receptor podem ser empregadas na identificação de novos potenciais compostos bioativos. **Objetivos:** Identificar potenciais compostos seletivos frente à dihidrofolato redutase - timidilato sintase de *Leishmania chagasi* (LcDHFR-TS). **Materiais e Métodos:** O módulo Galahad™ do programa SYBYL®-X 2.0 foi utilizado para a geração das hipóteses farmacofóricas das DHFR de *L. chagasi* e *H. sapiens*. Foram selecionados os melhores modelos após análise dos valores de Energia, Pareto, curva ROC/AUC e taxa de enriquecimento. Além disso, o programa MODELLER 9.18 foi utilizado para construção de um modelo por homologia da enzima LcDHFR-TS. O programa GOLD 5.3 foi utilizado para o acoplamento molecular. Uma triagem virtual hierárquica foi então conduzida para identificação de potenciais inibidores da LcDHFR-TS utilizando as seguintes etapas de forma sequencial: modelos farmacofóricos, filtro toxicológico, filtro físico-químico, disponibilidade comercial e acoplamento molecular. A triagem ocorreu sobre os bancos de compostos da Sigma-Aldrich® e Medicines for Malaria Venture (MMV). O programa Gromacs foi utilizado para avaliar a estabilidade do complexo entre o melhor composto identificado na triagem e a LcDHFR-TS através de simulações de Dinâmica Molecular (DM). **Resultados e Discussão:** Os modelos farmacofóricos 3 e 10 de HsDHFR (Curva ROC/AUC = 0,76) e LcDHFR (Curva ROC/AUC = 0,90) demonstraram desempenho satisfatório na diferenciação de inibidores verdadeiros de falsos positivos. Após a triagem por modelos farmacofóricos, 254 compostos, com requisitos estéreo-eletrônicos somente frente à LcDHFR, foram submetidos aos filtros físico-químicos, toxicológicos e de disponibilidade comercial. Destes, 24 moléculas foram avaliadas quanto ao modo de ligação no sítio ativo da LcDHFR-TS. As duas melhores pontuadas no acoplamento molecular foram submetidas à DM de 110 ns, em que foi possível observar que as ambas realizam interações de hidrogênio durante períodos superiores à 50% da trajetória da simulação, interagindo com os resíduos LYS-82 e ASP-52, respectivamente. **Conclusão:** Os ligantes SUB10 e SUB22 possuem requisitos estéreo-eletrônicos para se ligar seletivamente à LcDHFR, possivelmente com reduzida toxicidade e biodisponibilidade por via oral. Estes compostos possuem disponibilidade comercial e, portanto, devem ser priorizados para etapas subsequentes do planejamento de novos candidatos a fármacos.

Palavras-chave: Triagem virtual; diidrofolato redutase; *Leishmania chagasi*

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis is a disease caused by parasites of the *Leishmania* genus and has a high incidence in Latin America, Africa and Asia. Among the types of leishmaniasis, visceral leishmaniasis deserves to be highlighted as having the highest lethality indicators in the world. However, the therapeutic arsenal available for the treatment of these conditions leads to severe toxic effects and resistance of the parasites, which makes the search for new drugs candidates with antileishmania activity evident. Thus, the use of *in silico* techniques based on active ligands and on the receptor can be used to identify potential bioactive compounds. **Objectives:** Identify potential selective compounds against *Leishmania chagasi* dihydrofolate reductase - thymidylate synthase (*LcDHFR-TS*). **Materials and Methods:** The Galahad™ module of SYBYL®-X 2.0 program was used to generate the pharmacophoric hypotheses of the DHFR of *L. chagasi* and *H. sapiens*. The best models were selected after analyzing the values of Energy, Pareto, ROC/AUC curve and enrichment rate. Furthermore, the MODELLER 9.18 program was used to build a homology model of the enzyme *LcDHFR-TS*. The GOLD 5.3 program was used for molecular docking. A hierarchical virtual screening was then conducted to identify potential *LcDHFR-TS* inhibitors using the following steps in a sequential manner: pharmacophore models, toxicological filter, physicochemical filter, commercial availability and molecular docking. The screening took place on the compound banks of Sigma-Aldrich® and Medicines for Malaria Venture (MMV). The Gromacs program was used to evaluate the stability of the complex between the best compound identified in the screening and the *LcDHFR-TS* through Molecular Dynamics (MD) simulations. **Results and Discussion:** Pharmacophoric models 3 and 10 of *HsDHFR* (ROC/AUC Curve = 0.76) and *LcDHFR* (ROC/AUC Curve = 0.90), demonstrated satisfactory performance in differentiating true inhibitors from false positives. After screening by pharmacophoric models, 254 compounds, with stereo-electronic requirements only against *LcDHFR*, were submitted to physical-chemical, toxicological and commercially available filters. Of these, 24 molecules were evaluated for their binding mode at the active site of *LcDHFR-TS*. The two best scored in molecular docking were submitted to the DM of 110 ns, in which it was possible to observe that both perform hydrogen interactions for periods longer than 50% of the simulation trajectory, interacting with residues LYS-82 and ASP-52, respectively. **Conclusion:** SUB10 and SUB22 ligands possess stereo-electronic requirements to bind selectively to *LcDHFR*, possibly with reduced toxicity and oral bioavailability. These compounds have commercial availability and should therefore be prioritised for subsequent steps in the planning of new drug candidates.

Keywords: Virtual screening; dihydrofolate reductase; *Leishmania chagasi*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AG – Algoritmo genético

APO – Estrutura da proteína sem ligantes complexados

ASP – Potencial Estatístico Astex (do inglês, *Astex Statistical Potential*)

AUC – Área sob a curva (do inglês, *Area Under the Curve*)

ChemPLP – Do inglês, *Piecewise Linear Potential*

cLOG – Coeficiente de partição octanol-água

Da – Dalton

DHF – Diidrofolato

DHFR – Diidrofolato reductase

DM – Dinâmica Molecular

DN – Doenças negligenciadas

dTMP – Timidilato mofosfato

GALAHAD™ – do inglês, *Genetic Algorithm with Linear Assignment for Hypermolecular Alignment of Datasets*

GC – Gradiente Conjugado

G-TS – Gama-glutaril transferase

H – Hidrogênio

HBA – Aceitadores de ligação de hidrogênio

HBD – Doadores de ligação de hidrogênio

HsDHFR – Diidrofolato reductase de *Homo sapiens*

IS – Índice de seletividade

kDa – Kilodalton

LC – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LcDHFR – Diidrofolato reductase de *Leishmania chagasi*

LcDHFR-TS – Diidrofolato reductase timidilato sintase de *Leishmania chagasi*

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose visceral

MMV – Parceria de Medicamentos para Malária (do inglês, *Medicines for Malaria Venture*)

MSA – Do inglês, *Multiple Sequence Alingment*

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NPT – Ensemble isotérmico-isobárico

ns – Nanosegundo

PABA – Ácido para-amino-benzóico

PDB – Do inglês, *Protein Data Bank*

ps – Picosegundo

QFIT – Do inglês, *Query fit*

QMEAN – Do inglês, *Qualitative Model Energy Analysis*

ROC – Do inglês, *Receiver Operating Caractheris*

SUS – Sistema Único de Saúde

RMSD – Do inglês, *Root Mean Square Deviation*

TbDHFR – Diidrofolato reductase de *Trypanosoma brucei*

TcDHFR-TS – Diidrofolato reductase timidilato sintase de *Trypanosoma cruzi*

TGO – Transaminases oxaloacética

TGP – Transaminases pirúvica

THF – Tetrahidrofolato

TPSA – Área de superfície polar topológica

TS – Timidilato sintase

TV – Triagem virtual (do inglês, *Virtual Screening*)

TVBL – Triagem virtual baseada no ligante

TVBR – Triagem virtual baseada no receptor

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 01. – Países com maior número de casos de LV nas Américas entre 2001-2020.....	22
Figura 02. Média de casos de LV nas Américas entre 2001-2020	22
Figura 03. Número de Mortes e taxa de letalidade por casos de LV nas Américas 2012 – 2020.....	23
Figura 04. Formas promastigota e amastigota de protozoários do gênero <i>Leishmania</i>	24
Figura 05. Ciclo biológico da Leishmaniose	25
Figura 06. Pacientes infectados por LV em sua fase aguda	25
Figura 07. Pacientes infectados por LV em período de estado	26
Figura 08. Pacientes infectados por LV na fase final	26
Figura 09. Pacientes infectados por LV na forma oligossintomática	27
Figura 10. Esqueleto químico de fármacos empregados no tratamento das Leishmanioses	28
Figura 11. Reações de conversão de diidrofolato a tetraidrofolato catalizada pela DHFR	30
Figura 12. Estrutura da enzima DHFR-TS de <i>L. chagasi</i> obtida por modelagem comparativa	30
Figura 13. Estratégia de TV para priorização de ligantes	32

Figura 14. Exemplo de modelo farmacofórico	33
Figura 15. Exemplo de acoplamento molecular	38
Figura 16. Fluxograma da TV por modelo farmacofórico	42
Figura 17. Curva ROC e valores de AUC para os modelos de <i>LcDHFR</i> e <i>HsDHFR</i>	56
Figura 18. Inibidores mais e menos potentes frente ao modelo dez de <i>LcDHFR</i>	58
Figura 19. Modelo de DHFR-TS de <i>L. chagasi</i> (roxa) sobreposta ao molde 3KJS (verde) gerado no programa PyMOL	63
Figura 20. Diagrama de Ramachandran da estrutura <i>LcDHFR-TS</i> gerado através do servidor SAVES. Número de resíduos na região favorecida: 498 (96,1%); Número de resíduos na região permitida: 18 (3,5%); Número de resíduos na região atípica: 2 (0,4%)	64
Figura 21. Modelo de DHFR-TS de <i>L. chagasi</i> (azul) sobreposta aos moldes 3KJS (vermelho) e 3QFX (preto) no programa VERIFY 3D	65
Figura 22. Valores de RMSD das funções de pontuação do programa GOLD 5.3 e seus <i>rescores</i> . As poses de acoplamento e biológica do DHF estão representadas em vermelho e verde, respectivamente.....	67
Figura 23. Curva ROC de discriminação entre inibidores da DHFR e <i>decoys</i> pelas funções de pontuação do programa GOLD 5.3	68
Figura 24. Curva ROC de discriminação entre inibidores da DHFR e <i>decoys</i> pelos <i>rescores</i> das funções de pontuação do programa GOLD 5.3	68

Figura 25. Inibidores de DHFR disponíveis comercialmente.....	72
Figura 26. Mapa de interação da SUB10 junto ao sítio ativo da <i>LcDHFR-TS</i>	74
Figura 27. Mapa de interação da SUB22 junto ao sítio ativo da <i>LcDHFR-TS</i>	74
Figura 28. Mapa de interação do metotrexato junto ao sítio ativo da <i>LcDHFR-TS</i>	75
Figura 29. Mapa de interação a primetamina junto ao sítio ativo da <i>LcDHFR-TS</i>	76
Figura 30. Representação gráfica do RMSD da cadeia principal da <i>LcDHFR-TS</i> na forma APO e complexos durante a DM	79
Figura 31. Interações de hidrogênio entre a SUB10 e o resíduo LYS-82 no sítio ativo da <i>LcDHFR-TS</i> a partir da última pose da dinâmica de produção	80
Figura 32. Interações de hidrogênio entre a SUB22 e o resíduo ASP-52 no sítio ativo da <i>LcDHFR-TS</i> a partir da última pose da dinâmica de produção	81

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 01. Substâncias selecionadas para construção do modelo farmacofórico de <i>LcDHFR</i> e <i>HsDHFR</i>	51
Quadro 02. Dados estatísticos dos modelos farmacofóricos obtidos para <i>LcDHFR</i>	53
Quadro 03. Dados estatísticos dos modelos farmacofóricos obtidos para <i>HsDHFR</i>	53
Quadro 04. Fator de enriquecimento dos modelos farmacofóricos dos 2% compostos melhores ranqueados no conjunto de moléculas utilizado para validação de <i>LcDHFR</i>	56
Quadro 05. Fator de enriquecimento dos modelos farmacofóricos dos 2% compostos melhores ranqueados no conjunto de moléculas utilizado para validação de <i>HsDHFR</i>	57
Quadro 06. Filtros físico-químicos e disponibilidade comercial e valor de aquisição	61
Quadro 07. Recuperação de compostos ativos das funções do programa GOLD 5.3	69
Quadro 08. Pontuação dos compostos junto ao programa GOLD 5.3	70
Quadro 09. Resumo diagnóstico dos resultados encontrados pela TV para as SUB10 e SUB22	83

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 01. Equação matemática da segunda lei de Newton	40
Equação 02. Fórmula para cálculo do fator de enriquecimento	45
Equação 03. Equação matemática da média somada a duas vezes o desvio padrão.....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
3.1 Geral.....	20
3.2 Específicos	20
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1 Epidemiologia das Leishmanioses	21
3.2 Leishmaniose visceral: aspectos clínicos	23
3.3 Alternativas terapêuticas disponíveis e suas limitações	27
3.4 Dihidrofolato redutase como alvo para planejamento de fármacos	29
3.5 Técnicas <i>in silico</i> para o planejamento de novos fármacos	31
3.5.1 Triagem virtual.....	32
3.5.2 Modelo farmacofórico	33
3.5.3 Filtros toxicológicos	34
3.5.4 Filtros físico-químicos	36
3.5.5 Acoplamento molecular	37
3.5.6 Dinâmica molecular	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Modelos farmacofóricos	43
4.1.1 Definição do conjunto treino e teste	43
4.1.2 Construção dos modelos farmacofóricos de DHFR de <i>L. chagasi</i> e <i>H. sapiens</i>	43
4.1.3 Validação dos modelos farmacofóricos	44
4.2 Triagem virtual por modelo farmacofórico	45
4.3 Aplicação dos filtros físico-químicos, toxicológicos e disponibilidade comercial	46
4.4 Acoplamento molecular	46
4.1.1 Construção e avaliação do modelo de <i>LcDHFR-TS</i>	46
4.1.2 Avaliação dos parâmetros de busca	47
4.1.3 Triagem virtual por acoplamento molecular	48
4.5 Dinâmica molecular	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Modelos farmacofóricos	50

5.1.1 Definição do conjunto treino e teste	50
5.1.2 Construção e avaliação dos modelos farmacofóricos de DHFR de <i>L. chagasi</i> e <i>H. sapiens</i>	50
5.1.3 Triagem virtual por modelo farmacofórico	59
5.2 Aplicação dos filtros físico-químicos, toxicológicos e disponibilidade comercial	60
5.3 Acoplamento molecular na LcDHFR-TS	62
5.3.1 Construção e avaliação do modelo de LcDHFR-TS	62
5.3.2 Avaliação dos parâmetros de busca do acoplamento molecular ..	66
5.3.3 Triagem virtual por acoplamento molecular	69
5.3.4 Caracterização das interações dos compostos priorizados na Triagem Virtual junto à LcDHFR-TS	70
5.4 Dinâmica molecular	78
6. CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	87
APÊNDICES	98
Apêndice A. Estruturas químicas dos inibidores de LcDHFR utilizados para o banco teste e estruturas químicas dos inibidores de HsDHFR utilizados para o banco teste obtidos através do servidor DUD-E.....	98
ANEXOS.....	102
Anexo A. Artigo aceito na <i>Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacéuticas</i> (A3) - Atividades biológicas avaliadas <i>in vitro</i> de espécies do gênero <i>Erythroxylum</i> : uma revisão de literatura	102

1. INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são um grupo diversificado de 20 doenças que acometem principalmente regiões tropicais e causam consequências devastadoras nos âmbitos sociais, econômicos e de saúde para mais de um bilhão de pessoas em todo globo. Como exemplos de DN, podemos citar dengue, esquistossomose, hanseníase, leishmaniose, malária, dentre outras. Destaca-se a ocorrência de 500 mil a 1 milhão de óbitos anualmente pelas DN no mundo, distribuídos em regiões da África, Ásia e América Latina. Contudo, há baixo interesse da indústria farmacêutica para a elaboração de novos fármacos, tendo em vista o reduzido potencial de retorno lucrativo (VALVERDE, 2013).

Dentre as DN, a leishmaniose, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, merece destaque por se encontrar entre as seis endemias mais prioritárias do mundo. A doença possui incidência em 102 países do globo, com maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais, sendo responsável no ano de 2020 por 220.315 novos casos reportados. (MARTINS *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2021; WHO, 2021). Estima-se que cerca de 1 bilhão de indivíduos encontram-se em regiões de risco de contágio pela Leishmaniose (BATISTA *et al.*, 2021; WHO, 2021). No Brasil, foram observados um total de 18.365 pacientes diagnosticados pela doença e a ocorrência de 236 óbitos em 2020 (FERREIRA *et al.*, 2022; OPAS, 2021; WHO, 2021).

A Leishmaniose pode se manifestar de quatro formas clínicas diferentes: Leishmaniose cutânea (LC), Leishmaniose mucocutânea (LMC), Leishmaniose cutânea difusa (LCD) e Leishmaniose visceral (LV). Dentre estas formas, a leishmaniose visceral (LV) é a manifestação mais grave e letal da doença, a qual pode ser fatal em até 90% dos casos, quando não tratada corretamente. A LV apresenta como agentes etiológicos a *L. chagasi*, *L. donovani* e *L. major*, que são transmitidos através do repasto sanguíneo pelo flebótomo do gênero *Lutzomyia* (BRASIL, 2017; DHORM PIMENTEL DE MORAES *et al.*, 2018).

No mundo, a LV é responsável por 12.838 dos casos reportados em 2020 e 3.813 mortes em entre os anos de 2014 e 2020 (OPAS, 2021; WHO, 2021). Destaca-se que 95% dos óbitos nos últimos anos se concentraram em 10 países, sendo estes: Brasil, Etiópia, Índia, Kenya, Paraguai, Bangladesh, Nepal, Somália, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2021). No Brasil, foram notificados 1.933 casos de LV no ano de 2020, com um total de 162 mortes pela doença. É importante ressaltar que, no Brasil, o

agente etiológico responsável pela LV corresponde à *L. chagasi* (OPAS, 2021). Para mais, no estado da Bahia, entre os anos de 2007 a 2018 foram notificados mais de 4.000 casos de LV e, em 2020, este estado se manteve entre àqueles com maior incidência de novos casos (FONSECA, 2020).

O quadro clínico da LV é caracterizado por febres prolongadas, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia, perda de peso, palidez cutâneo-mucosa, diarreia e pancitopenia (BRASIL, 2017; BRUM *et al.*, 2022). O tratamento é realizado com a utilização de antimoniais pentavalentes, pentamidinas e anfotericina B. Contudo, o tratamento farmacológico da LV possui severas limitações de biodisponibilidade e de tolerância, além de reações adversas de cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e a administração por via parenteral da maioria dos fármacos (BEZERRA-SOUZA *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2022). Estas limitações resultam numa baixa adesão ao tratamento da LV e, portanto, torna evidente a necessidade de novas alternativas terapêuticas.

Uma das formas de alcançar tal objetivo consiste na busca por compostos capazes de inibir de forma seletiva alvos terapêuticos essenciais para o ciclo biológico do parasito. Assim, os alvos farmacológicos envolvidos na via metabólica dos folatos em *L. chagasi* merecem destaque pois sua inibição impede a formação de metabólitos essenciais para a síntese de DNA e RNA, e consequente morte do parasito. Dentro dessa via, a Diidrofolato redutase (DHFR; E.C. 1.5.1.3) tem sido um alvo promissor para o planejamento de novos fármacos, visto que ela participa de uma reação essencial de conversão Diidrofolato (DHF) em Tetrahydrofolato (THF). Tal metabólito é essencial para síntese de timidina, um nucleotídeo empregado para a síntese de DNA (FONSECA, 2020; MATOS, 2016; TELES, 2016).

Para mais, Vickers e Beverley demonstraram que o silenciamento do gene que codifica a DHFR levou a redução da viabilidade do parasito no interior de células infectadas por protozoários do gênero *Leishmania*, e consequentemente, dificultando a manutenção da infecção. Adicionalmente, destaca-se que há diferença evolutiva na sequência gênica de DHFR de diferentes organismos vivos, possibilitando o planejamento de fármacos com inibição de forma seletiva para a DHFR de *L. chagasi* (LcDHFR). No que tange à leishmania e a demais protozoários, é importante destacar que a DHFR está fusionada à timidilato sintase (TS) (TELES, 2016).

Dessa forma, a DHFR de *L. chagasi* se mostra um alvo promissor para o planejamento de novos fármacos contra a LV. Vale ressaltar a importância do planejamento de inibidores seletivos à DHFR do parasito, visando evitar reações adversas ao paciente sob tratamento. Nesse sentido, estratégias *in silico* vem sendo empregadas com sucesso no planejamento de compostos bioativos e podem ser empregadas para a identificação de potenciais inibidores seletivos frente a DHFR-TS de *L. chagasi* (CASTILHO, 2017; TELES, 2016; TEXEIRA *et al*, 2019).

Assim, no presente trabalho, técnicas de química computacional, tais como modelagem por homologia, modelagem farmacofórica, acoplamento molecular e dinâmica molecular foram avaliadas e aplicadas para a identificação de potenciais inibidores seletivos da LcDHFR-TS, contribuindo para o planejamento de uma alternativa terapêutica para o combate da LV.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar potenciais compostos seletivos frente à DHFR-TS de *L. chagasi*.

2.2 ESPECÍFICOS

- 1- Construir modelos farmacofóricos de DHFR de *L. chagasi* e *H. sapiens*;
- 2- Priorizar potenciais inibidores seletivos da DHFR de *L. chagasi* através da triagem virtual por modelos farmacofóricos;
- 3- Selecionar as estruturas mais promissoras com base em filtros físico-químicos, toxicológicos e viabilidade comercial;
- 4- Construir e validar uma estrutura tridimensional LcDHFR-TS;
- 5- Caracterizar as principais interações intermoleculares das estruturas mais promissoras;

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Epidemiologia das Leishmanioses

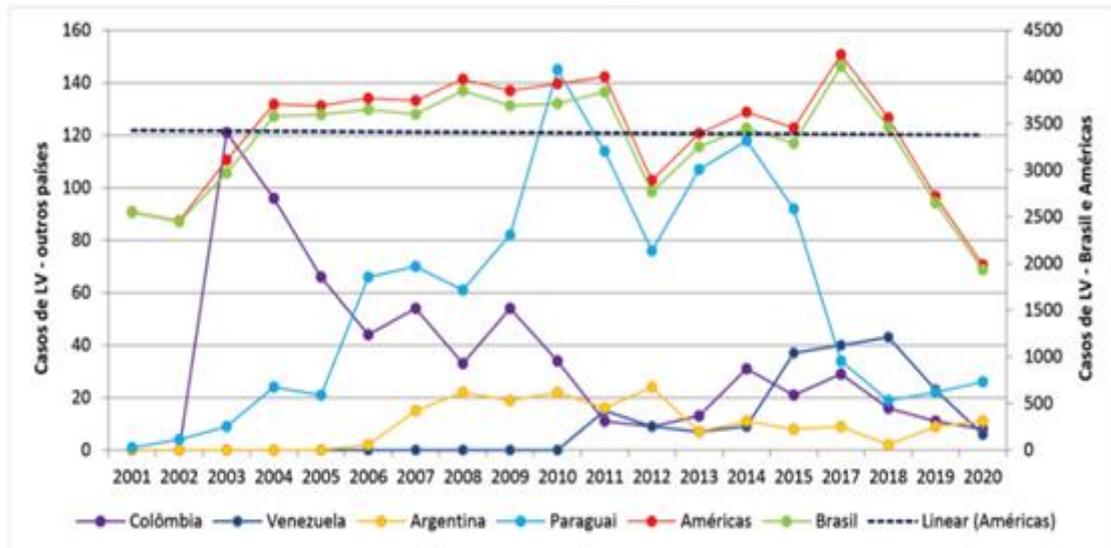
A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, transmitidos ao hospedeiro através da picada de mosquitos do gênero *Lutzomia*. A leishmaniose apresenta quatro tipos de manifestações clínicas, sendo estas LV, LMC, LC e LCD (BRASIL, 2017; DHORM PIMENTEL DE MORAES *et al.*, 2018).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é caracterizada como uma doença negligenciada que apresenta alta incidência nas Américas e atinge em especial populações vulneráveis com difícil acesso aos serviços de saúde (OPAS, 2019). O complexo LTA apresenta como principais agentes etiológicos *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, e *L. guyanensis*, responsáveis por causar as manifestações clínicas de LMC, LCD e LC, sendo a cutânea a mais prevalente. Apesar do complexo constituir uma endemia de alta relevância na saúde pública, a infecção por LTA apresenta baixa letalidade (OPAS, 2019; OPAS, 2021).

Já a LV é considerada a forma mais grave das leishmanioses, visto que possui uma taxa de mortalidade em até 90% dos casos (OPAS 2019; OPAS, 2021). Destaca-se que esse maior índice está relacionado à capacidade de infecção parasitária em órgãos essenciais como medula óssea, baço e fígado (FERREIRA *et al.*, 2022; OPAS 2021). Os agentes etiológicos causadores da LV são a *L. chagasi*, *L. infantum* e *L. donovani*, apesar de haver divergências sobre o uso do nome específico entre as espécies (BRASIL, 2017).

A LV é endêmica em 13 países das Américas, onde foram registrados 67.922 novos casos de 2001 a 2020, com uma média de 3.400 casos por ano (Figura 1). Em 2020, do total de casos, 97% (1.933) foram notificados pelo Brasil, e os demais casos pela Argentina, Bolívia, Colômbia, Paraguai, Venezuela e Uruguai. No ano de 2020 foi observado um menor número de registro de casos de LV no Brasil em comparação com os anos anteriores, contudo, não se sabe se essa redução ocorreu devido ao impacto da pandemia decorrente do SARS-CoV-2 (COVID-19) nas ações de vigilância em saúde, decorrendo em subnotificação, e conseqüentemente em um menor número do número dos casos (OPAS, 2021).

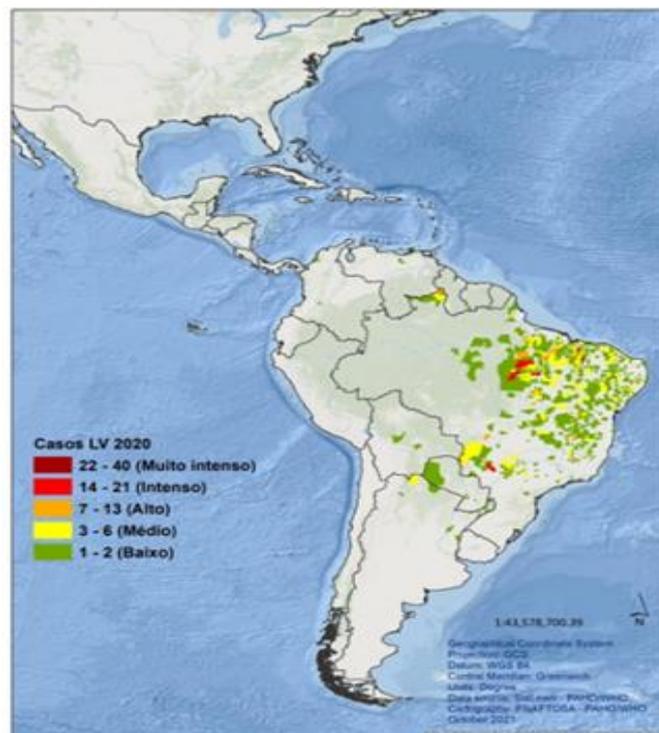
Figura 1 – Países com maior número de casos de LV nas Américas entre 2001-2020



Fonte: Adaptado de OPAS, 2021

Dentre as formas clínicas, a LV causada por *L. chagasi* merece destaque, pois é o principal agente etiológico desta manifestação no Brasil (BRASIL, 2017). As maiores taxas de incidência em 2020 foram situadas em cidades dos estados do Pará, São Paulo, Bahia, Roraima, Tocantins e Goiás (Figura 2) (OPAS, 2021).

Figura 2 – Média de casos de LV nas Américas entre 2001-2020

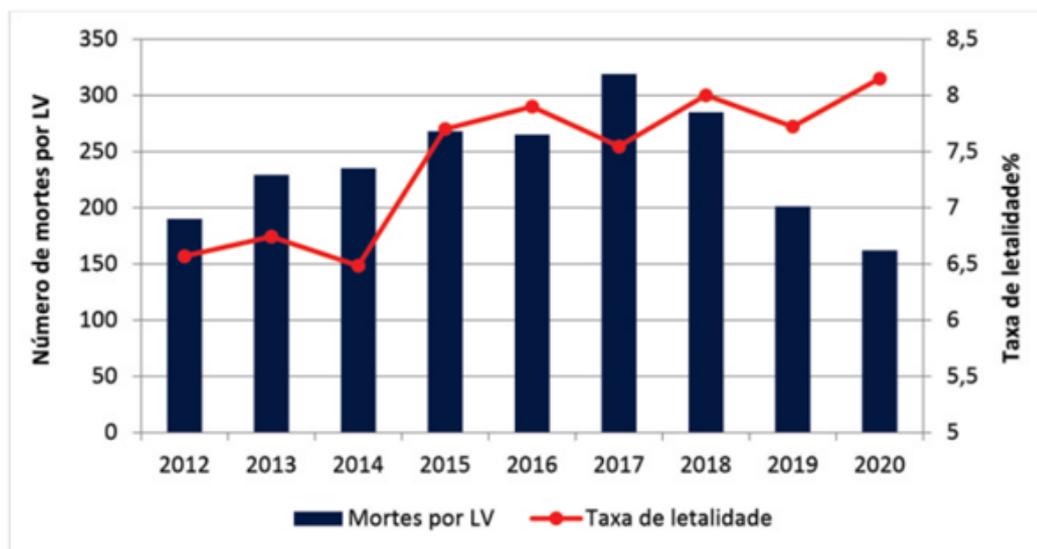


Fonte: Adaptado de OPAS, 2021

Quanto à evolução clínica dos pacientes, destaca-se que 64,3% se recuperaram da doença, 8,15% faleceram pela LV e 3,5% por outras causas. A OPAS (2021) pôde inferir que 2020 apresentou a maior taxa de letalidade por LV desde o ano de 2012 (Figura 3). Para mais, a letalidade nas Américas é mais alta quando comparada a outros continentes, em especial no Brasil, em que este indicador se demonstrou crescente (OPAS, 2021).

Portanto, demonstra-se a necessidade no melhor entendimento da patologia, dos agravantes de risco de contaminação e dos mecanismos de infecção pelo seu agente etiológico, a fim da elaboração de estratégias que visem a melhora dos indicadores da doença.

Figura 3 – Número de Mortes e taxa de letalidade por casos de LV nas Américas 2012 – 2020



Fonte: Adaptado de OPAS, 2021

3.2 Leishmaniose visceral: aspectos clínicos

A LV, também conhecida como calazar, é uma doença infectoparasitária que apresenta como agentes etiológicos protozoários *L. chagasi*, *L. donovani* e *L. infantum*. Aproximadamente 90% da distribuição dos diagnósticos de LV se encontram no Brasil, Índia, Sudão do Sul, Etiópia e Quênia, e a depender da localidade em questão, poderá haver diferentes tipos de espécies causadoras da afecção. No subcontinente indiano e leste da África há uma maior prevalência de *L. donovani*, já *L. infantum* está distribuída na Ásia Central, no Oriente Médio e no

Mediterrâneo. Já no Brasil e América do Sul, observa-se uma maior incidência de infecções pela espécie *L. chagasi* (BATISTA *et al.*, 2021; WHO, 2021; SILVA *et al.*, 2021).

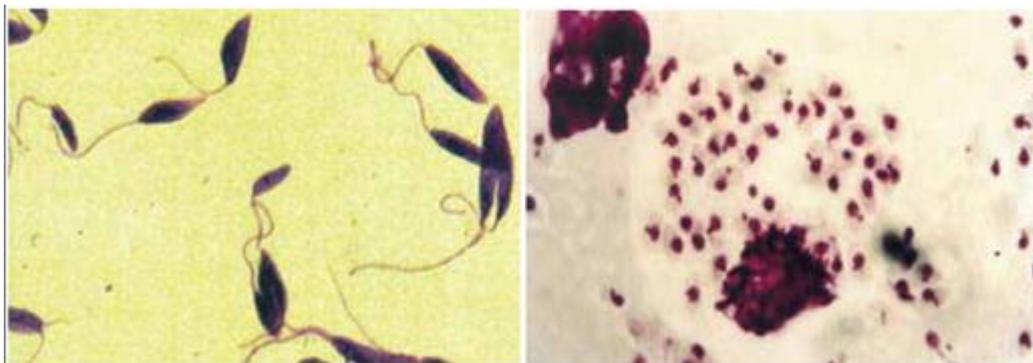
A LV é mais prevalente em populações vulneráveis, como crianças menores de 5 anos, idosos, pacientes com comorbidades e imunossuprimidos (Ex: infecção pelo HIV/AIDS e desnutrição). No Brasil, pode ser relatada uma maior incidência em crianças e adultos acima de 50 anos, em especial do sexo masculino (MARTINS *et al.*, 2021; OPAS, 2021).

Estudos correlacionam os cães (*Canis familiaris*) como principal fonte de disseminação da LV em área urbana, enquanto as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventri*) estão relacionadas ao ambiente silvestre (BRASIL, 2017).

O início da infecção ocorrerá quando o flebotômio do gênero *Lutzomyia*, ao realizar o repasto sanguíneo em indivíduos contaminados, é infectado com o agente etiológico da LV, o qual migrará para o tubo digestivo do inseto (FERREIRA, *et al.*, 2022).

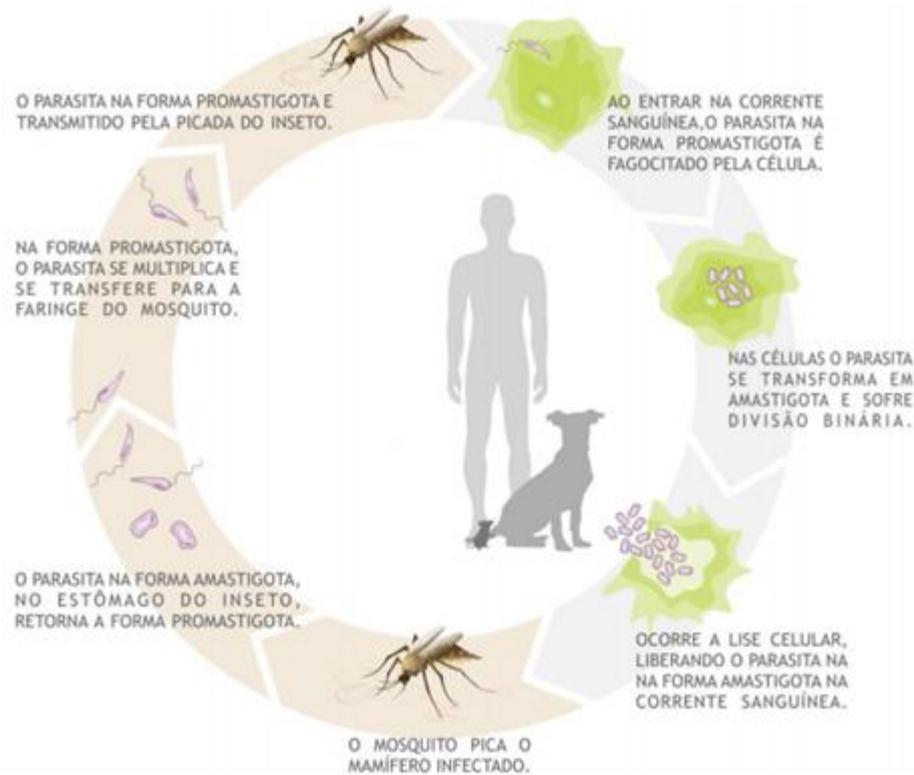
No intestino, os parasitos irão se reproduzir e se diferenciar para a forma infectante de promastigotas metacíclicas, que por sua vez irão migrar para a cavidade oral e serem novamente transmitidas ao hospedeiro através do repasto sanguíneo (Figuras 4 e 5). Após a infecção do hospedeiro saudável, haverá a diferenciação para a forma amastigota, que se multiplicará no interior dos macrófagos. Após a lise celular, as formas amastigotas serão fagocitados por outras células do sistema imune, podendo migrar pra outros tecidos (BLANCO, NASNCIMENTO-JÚNIOR, 2017; BRASIL, 2017;).

Figura 4 – Formas promastigota e amastigota de protozoários do gênero *Leishmania*



Fonte: Adaptado de BRASIL, 2017

Figura 5 – Ciclo biológico da Leishmaniose



Fonte: BLANCO, NASNCIMENTO-JÚNIOR (2017).

As manifestações clínicas da LV em sua fase aguda são caracterizadas por febres prolongadas, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia, perda de peso, palidez cutâneo-mucosa, diarreia e pancitopenia (Figura 6) (FERREIRA *et al.*, 2022; MARTINS *et al.*, 2021). Em alguns casos, os pacientes podem entrar em período de estado, com instalação de um quadro de febre irregular, emagrecimento e aumento da hepatoesplenomegalia, com duração prolongada (Figura 7) (BRASIL, 2014).

Figura 6 – Pacientes infectados por LV em sua fase aguda



Fonte: Adaptado de BRASIL, 2014

Figura 7 – Pacientes infectados por LV em período de estado



Fonte: Adaptado de BRASIL, 2014

Caso não seja realizado um diagnóstico e tratamento célere, a doença poderá evoluir para a fase final, apresentando um comprometimento mais intenso, em que se pode instalar um quadro de desnutrição, edema, com apresentação de hemorragias (ex: epistaxe, gengivorragia e petéquias), bem como icterícia e ascite. Em pacientes com quadros mais graves (Figura 8), a LV poderá levar o indivíduo à óbito por causas secundárias, principalmente devido ao comportamento deficiente da medula óssea e órgãos linfóides (BRASIL 2014; FERREIRA *et al.*, 2022).

Figura 8 – Pacientes infectados por LV na fase final



Fonte: Adaptado de BRASIL, 2014

Alguns pacientes de LV podem apresentar a forma oligossintomática, caracterizada por quadro clínico discreto, com sintomas como febre baixa, palidez cutâneo-mucosa leve, diarreia e/ou tosse não produtiva e pequena hepatoesplenomegalia (Figura 9). Indivíduos portadores desta manifestação podem evoluir para cura espontânea em aproximadamente 15 dias (BRASIL, 2014).

Figura 9 – Pacientes infectados por LV na forma oligossintomática

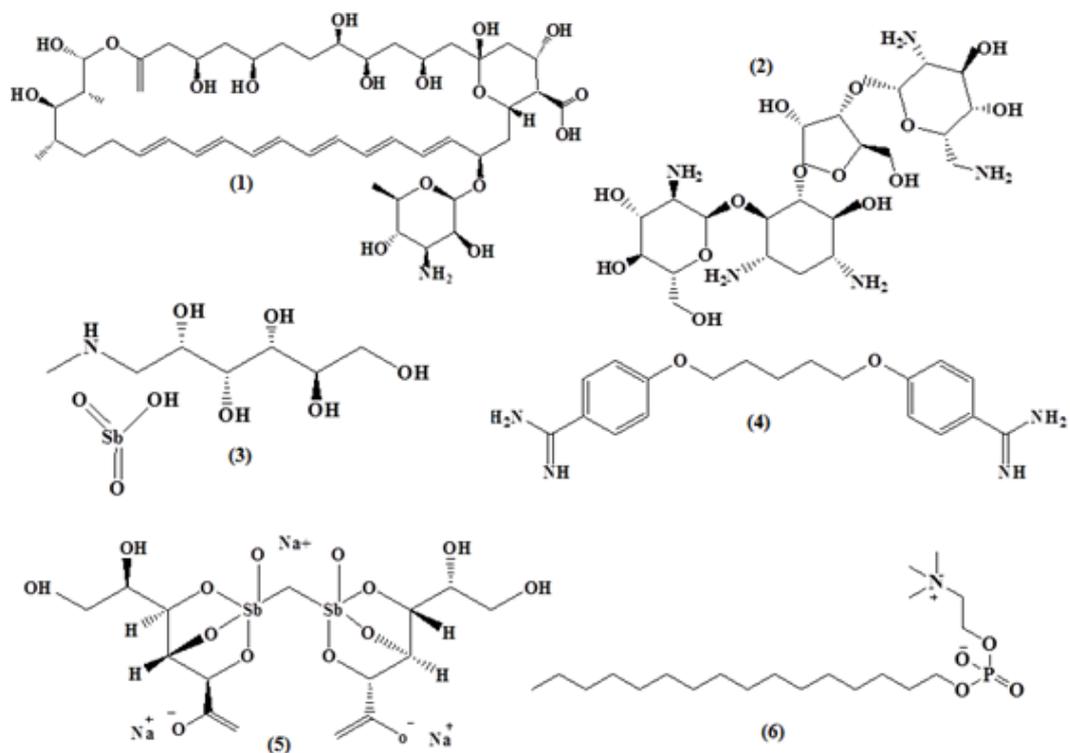


Fonte: Adaptado de BRASIL, 2014

3.3 Alternativas terapêuticas disponíveis e suas limitações

Atualmente, o tratamento de primeira linha para as leishmanioses é realizado com os antimoniais pentavalentes, representados pelo aniomoniato de meglumina, estibogluconato de sódio, etil-esbamina e ureia-estibamina. Em casos de intolerância ou resistências a tais drogas, podem-se empregar as pentaminidas, drogas atreladas a um menor potencial curativo e menor remissão de pacientes com leishmania, cujos fármacos são: isotianato de pentamidina, hidroxiestilbamidina e estilbamidina. Como segunda linha de tratamento é preferível a utilização da anfotericina B, que vem a ser um antifúngico poliênico de uso consolidado na clínica frente estes parasitos (Figura 10) (BEZERRA-SOUZA *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2018).

Figura 10 – Esqueleto químico de fármacos empregados no tratamento das Leishmanioses



(1): Anfotericina B; (2): Paromomicina; (3): Antimoniato de meglumina; (4): Pentamidina; (5): Pentosan; (6): Miltefosina.

Fonte: Autor

Apesar de serem diversos os medicamentos que podem ser empregados para o tratamento da leishmaniose, tais terapias apresentam um severo perfil de efeitos colaterais, com manifestação de reações de leves a graves. Boa parte dos pacientes acabam por apresentar efeitos colaterais como artralgia, mialgia, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, tontura, palpitação, e até insuficiência renal, choque pirogênico, alterações cardíacas, anemia, leucopenia e trombocitopenia (BEZERRA-SOUZA *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2018).

Além dos efeitos colaterais prevalentes, o tratamento atual da leishmaniose apresenta desvantagens como ocorrência de resistência pelos parasitos, utilização de doses elevadas, via de administração ser parenteral e o alto custo dos medicamentos. Portanto, é urgente a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da leishmaniose, de forma a minimizar tais efeitos colaterais, possuir via de administração conveniente e ser mais potente em relação aos medicamentos disponíveis (BEZERRA-SOUZA *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2018).

A metilfosina (hexadecilfosfocolina), que foi utilizada inicialmente em pacientes com câncer, atualmente tem sido empregada como uma droga oral efetiva para o tratamento de pacientes com leishmaniose visceral, na Índia. A miltefosina foi incorporada no Sistema Único de Saúde (SUS) em 2018 através do relatório de recomendação nº 365 da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS, contudo, seu fornecimento somente acontece para indivíduos que necessitam do tratamento para LTA (BRASIL, 2018).

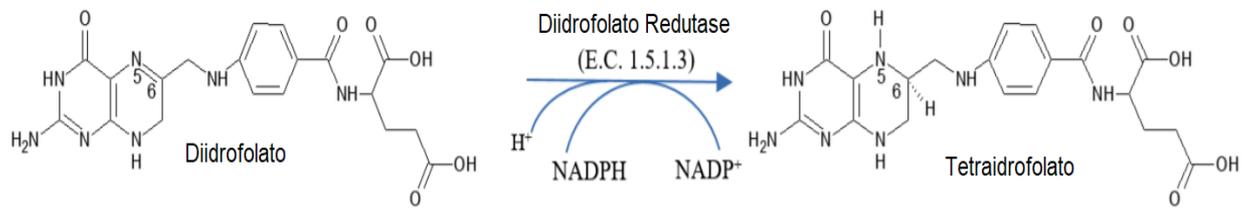
3.4 Dihidrofolato redutase como alvo para planejamento de fármacos

Dentre os eventos bioquímicos essenciais para a manutenção biológica dos protozoários, o metabolismo dos folatos se mostra interessante para o planejamento de novos fármacos, pois a inibição desta via impede a síntese de bases nitrogenadas e, portanto, leva a inibição da síntese de DNA, RNA, proteínas e causa a morte do parasito (MATOS, 2016; RAIMONDI *et al.*, 2019). Neste sentido, a inibição da DHFR se mostra promissora na priorização de novos fármacos com atividade antileishmania, tendo em vista que silenciamento do gene que codifica essa enzima resulta no decréscimo da viabilidade desses tripanosomatídeos em células contaminadas, dificultando a manutenção de infecções causadas por parasitos do gênero *Leishmânia* (VICKERS, BEVERLEY, 2011)

A reação catalizada pela DHFR é uma etapa crítica na via dos folatos, pois esta é responsável em converter DHF a THF, o qual age como cofator para a biossíntese de timidilato mofosfato (dTMP) (TELES, 2016). Dessa forma, a redução dos níveis de dTMP causada pela inibição da DHFR resulta no impedimento do crescimento celular do parasito. Destaca-se que a porção TS é cofator para produção de dTMP e responsável pela regeneração do DHF (SCHANELL; DYSON; WRIGHT, 2004).

A conversão do DHF para THF consiste na transferência de um hidreto a partir do carbono 4 do cofator nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para o carbono 6 do anel pterínico do DHF, com a concomitante protonação do nitrogênio 5 do mesmo anel pterínico, resultando na formação do THF e do cofator oxidado, NADP⁺ (Figura 11) (SCHANELL; DYSON; WRIGHT, 2004; TELES, 2016).

Figura 11 - Reação de conversão de diidrofolato a tetraidrofolato catalizada pela DHFR



Fonte: Adaptado de TELES *et al.*, 2018

Por outro lado, em tripanossomatídeos se observa uma estrutura bifuncional contendo os domínios DHFR (Nterminal) e timidilato sintase (C-terminal) (EC 2.1.1.45), (DHFR-TS) (Figura 12). A DHFR-TS apresenta-se como homodímero de peso molecular variando entre 110 a 140 kDa, a depender da espécie (GRUMONT; SIRAWARAPORN; SANTI, 1988; TELES, 2016).

Figura 12 – Estrutura da enzima DHFR-TS de *L. chagasi* obtida por modelagem comparativa



Fonte: Autor

A DHFR-TS de *L. chagasi* é um homodímero bifuncional com mais de 20 aminoácidos em sua estrutura e peso molecular entre 110 e 140 kDa, cujo o domínio DHFR se apresenta na porção N-terminal e TS na C terminal (GRUMONT;

SIRAWARAPORN; SANTI, 1988). Apesar da organização bifuncional, espécies da família *Tripanossomatidae* também podem apresentar enovelamento formado por 6 folhas beta ladeadas por alfa-hélices característico das DHFR monofuncionais (KNIGHTON *et al*, 1994).

Estudos de identidade sequencial demonstram que a identidade global de *L. chagasi* frente a DHFR de *H. sapiens* é de 30%, enquanto a identidade sequencial do sítio catalítico é de 60%. As interações mais relevantes entre os sítios de ligação da DHFT-TS e seu substrato envolve ligações de hidrogênio com resíduo ácido (aspártico/glutamina), e conseqüentemente estabilização do anel pterínico do substrato e interação do resíduo fenilalanina junto ao anel para-amino-benzóico (PABA). Tal interação com o cofator (NADPH) é estabelecida com o próprio substrato, juntamente à rede de ligações de hidrogênio com diversos resíduos conservados, a exemplo da alanina e glicina (TELES, 2016).

Quanto às identidades sequenciais entre a DHFR-TS de *L. chagasi* em comparação a outros parasitos do gênero *Leishmania*, podemos identificar que a identidade sequencial global de *LcDHFR-TS* frente às espécies *L. mexicana*, *L. panamensis* e *L. braziliensis* é de aproximadamente 95%, 83% e 82%, respectivamente, enquanto a identidade sequencial do sítio catalítico é de 100%, 92% e 92%. Já para as espécies *L. major* e *L. donovani*, causadoras das manifestações de LV, as identidades sequenciais globais são de 95,96% e 99,53%% e do sítio de ligação 96% e 100%, respectivamente. Destaca-se também a comparação entre as seqüências primárias entre a *LcDHFR-TS* frente *T. cruzi* e *T. brucei*, cujas identidades sequenciais correspondem à 67,3 % e 48,0 %, respectivamente, fatores estes importantes para o planejamentos de novas ferramentas farmacológicas.

3.5 Técnicas *in silico* para o planejamento de novos fármacos

Uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos se dá através de estudos *in silico*, com a utilização da quimioinformática. Esta ferramenta combina múltiplas fontes de informação e transformam o conhecimento gerado de forma a ajudar a prever as propriedades farmacológicas desses compostos, e direcionar os estudos subsequentes a realização de ensaios *in vitro* (ANDRADE, 2018; SILVA, 2019).

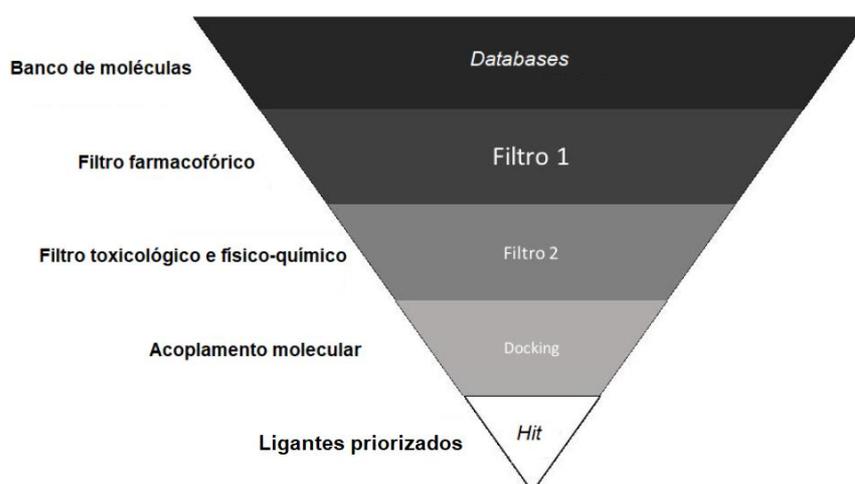
A utilização da quimioinformática viabiliza uma eficiente seleção de moléculas com maior potencial atividade biológica, além de permitir a predição das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de ligantes (RODRIGUES *et al.*, 2012). Para mais, bancos de dados de ligantes e proteínas associados aos programas computacionais podem ser empregados principalmente quando se têm poucos recursos disponíveis (CARREGAL *et al.*, 2011; ANDRADE, 2018).

3.5.1 Triagem virtual

Diversas estratégias *in silico* podem ser adotadas para o planejamento de novos fármacos, dentre elas, a Triagem Virtual (TV) se apresenta como uma técnica promissora para filtrar de forma sucessiva grandes bancos de moléculas com um baixo custo computacional e, portanto, identificar compostos *hit* (Figura 13) (HIKMAWATI *et al.*, 2022; RODRIGES *et al.*, 2012).

A TV pode ser realizada com base em informações de ligantes ativos (triagem virtual baseada em ligantes, TVBL) ou da estrutura 3D do alvo (triagem virtual baseada no receptor, TVBR). A primeira estratégia utiliza moléculas com atividade biológica conhecida e que possuem o mesmo mecanismo de ação, as quais servem como moldes para a busca de novas moléculas com padrão similar, como a busca por requisitos estereo-eletrônicos semelhantes (Ex: modelos farmacofóricos) que, portanto, podem ser empregados para a identificação de novas moléculas bioativas (ANDRADE, 2018; SILVA, 2019).

Figura 13 – Estratégia de TV para priorização de ligantes



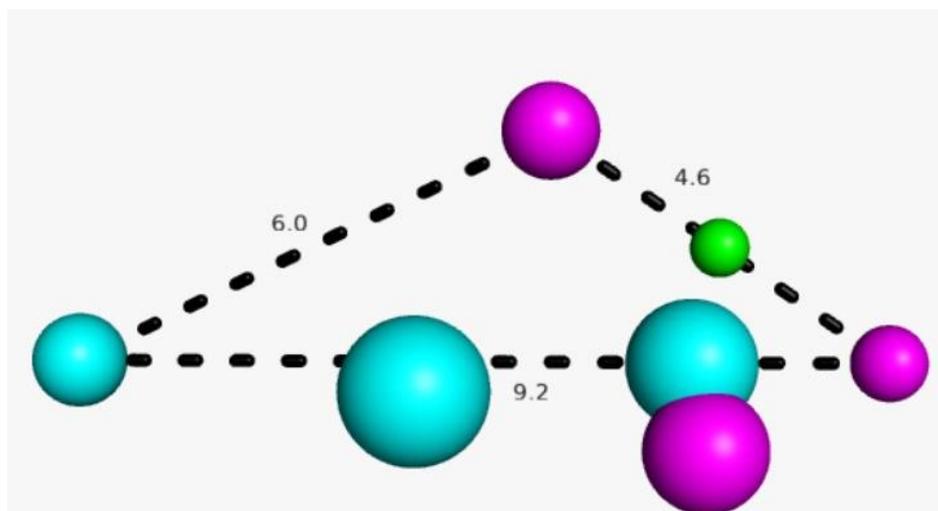
Fonte: Adaptado de MARTINS, 2017

Já a TVBR é uma abordagem baseada no conhecimento da estrutura tridimensional dos alvos moleculares. Nessa estratégia, o objetivo é explorar o modo de ligação entre o ligante e o alvo, e suas interações intermoleculares, para priorizar moléculas com maior probabilidade de terem afinidade pelo sítio de ligação (Ex: acoplamento molecular) (LAVECCHIA, DI GIOVANNI, 2013; BOMFIM, 2021).

3.5.2 Modelo farmacofórico

O modelo do farmacóforo é uma ferramenta computacional útil para o reconhecimento de moléculas com requisitos essenciais para inibição de determinado alvo biológico. Neste sentido, utiliza-se um conjunto de ligantes ativos já conhecidos para mapear as características necessárias para modulação do receptor (ex: grupos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, centros hidrofóbicos, grupos aromáticos, grupos carregados positivamente ou negativamente) (NETO *et al.*, 2020; XIANG, HOU, ZHANG, 2012). Os moldes são gerados a partir do alinhamento de estruturas com atividade biológica conhecida. A partir do molde elaborado, o modelo farmacofórico pode ser empregado para a busca de substâncias em bancos de moléculas com os requisitos previamente identificados (Figura 14) (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Figura 14 – Exemplo de modelo farmacofórico



Fonte: Autor

O programa GALAHAD™ (*Genetic Algorithm with Linear Assignment for Hypermolecular Alignment of Datasets*), por exemplo, utiliza algoritmo genético (AG)

para alinhar de modo flexível moléculas de diferentes quimiotipos que possuem o mesmo modo de ligação (LIU, WU, HU, 2011) e permite identificar confôrmeros que possuam uma combinação de baixa energia e características farmacofóricas semelhantes. Esta capacidade de alinhamento de compostos com diversidade de entidades químicas confere ao AG superioridade frente a outros programas (LEITE, 2015).

A construção de modelos farmacofóricos para a identificação de novas moléculas ativas frente a alvos biológicos apresenta diversas vantagens, como a capacidade de filtrar grande quantidade de moléculas em um curto período de tempo, conferindo maior celeridade na priorização de tais compostos (ANDRADE, 2019; LIONTA, *et al.*, 2014; NETO *et al.*, 2020). Contudo, algumas limitações podem ser encontradas na utilização da técnica isoladamente, visto que uma grande quantidade de ligantes são reprovados em estudos de fase clínica devido à falta de segurança em seu uso, como ocorrência de toxicidade *in vivo*, além de ter biodisponibilidade não satisfatória. Portanto, outras técnicas computacionais podem ser empregadas para estreitamento de estudos *in silico* a fim da identificação de compostos *hit*, a exemplo da utilização de filtros físico-químicos, toxicológicos e acoplamento molecular.

3.5.3 Filtros toxicológicos

Outra propriedade interessante a ser avaliada na busca de compostos *hit* é a ausência de potenciais efeitos toxicológicos indesejáveis frente a funções fisiológicas dos diversos sistemas orgânicos, bem como uma menor capacidade em interagir com receptores de forma não seletiva, possibilitando uma menor ocorrência de efeitos adversos. Para tal, a plataforma PkcsM (PIRES, BLUNDELL, ASCHER, 2015; <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsM/>) pode ser utilizada para prever características indesejáveis para os compostos, como a potencial predisposição em causar cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade. Já o Aggregator Advisor (IRWIN *et al.*, 2015; <http://advisor.bkslab.org/>) pode ser utilizado para discriminar substâncias potencialmente promíscuas, que se caracterizam por agregar de forma inespecífica a diversas outras moléculas, e conseqüentemente ocasionar efeitos colaterais (CASTILHO, 2017; IRWIN *et al.*, 2015).

Destaca-se que o emprego de filtros toxicológicos pode reduzir o gasto computacional para a priorização de potenciais compostos a serem utilizados em

etapas subsequentes, minimizando a falha em ensaios clínicos devido à falta de segurança em seu uso. A predição da toxicidade ocorre a partir da análise da influência das substâncias em funções vitais do organismo, a exemplo em sistemas como o nervoso central, cardiovascular, endócrino, digestório, imune e respiratório.

Nesse contexto, a cardiotoxicidade se caracteriza pela ocorrência de dano muscular nas células cardíacas ou disfunção da eletrofisiologia do coração, levando à acometimentos como: insuficiência cardíaca com disfunção ventricular sistólica, hipertensão arterial, doença tromboembólica, doenças pericárdicas, arritmias e isquemia miocárdica. A insegurança na no emprego do composto dependerá do grau de severidade da molécula no organismo, do potencial de reversibilidade ou irreversibilidade do efeito, assim como a relação dose resposta (ADÃO *et al.*, 2013). Contudo, apesar da dificuldade da indústria farmacêutica no descobrimento de novos tratamentos frente às terapias atualmente disponíveis, a predição de cardiotoxicidade poderá trazer uma melhor segurança para o tratamento dos indivíduos portadores de afecções de saúde, assegurando uma melhor adesão ao tratamento, com menor potencialidade de causar efeitos negativos (ADÃO *et al.*, 2013; CASTILHO, 2017).

Outro efeito que deve ser avaliado antes da realização de estudos pré-clínicos é a potencial aptidão da substância em causar hepatotoxicidade, que pode ser caracterizada como uma lesão hepática causada por ingestão, inalação ou administração parenteral de agentes químicos ou farmacológicos (BRINQUINHO *et al.*, 2017; JOVELEVITHS, 2011). Em boa parte dos casos, o dano hepático pode ocorrer a nível hepatocelular, que irá causar aumento de aminotransferase de aspartato (AST ou TGO) e a aminotransferase de alanina (ALT ou TGP), ou colestáticos, ocasionando o aumento de bilirrubinas, da fosfatase alcalina e da gama-glutaril transferase (G-GT) (BERTOLAMI, 2005). Destaca-se que a causa mais frequente da retirada de medicamentos do mercado ocorre pela detecção de hepatotoxicidade atrelada a seu uso, como exemplo de lumiracoxibe, tolcapone e troglitazona (JOVELEVITHS, 2011). Portanto, a predição da potencialidade de dano hepático constitui fator importante no que tange a priorização da elaboração de novas drogas.

Não somente a capacidade de gerar toxicidade em sistemas biológicos podem ser avaliadas para predizer a segurança de compostos, mas também quanto às propriedades de genotoxicidade e mutagenicidade (MAIA FILHO, 2017; SANTANA *et al.*, 2020; ZANONI, 2014).

O termo mutagenicidade indica a capacidade de determinado composto em induzir danos genéticos transmissíveis, ocasionando mutações, aberrações cromossômicas, bem como alteração no número de cromossomas, que podem evoluir e suceder na formação de câncer. Tais mutações podem ser derivadas de interações diretamente com o DNA, ou com outros alvos celulares, a exemplo de proteínas. Diferentemente, genotoxicidade apresenta um conceito mais amplo, representada pela capacidade em interagir com o DNA e produzir alterações em sua estrutura ou função (MAIA FILHO, 2017; ZANONI, 2014).

Ambas as propriedades poderão acarretar em carcinogênese, acaso os processos persistam e desencadeiem as fases de iniciação, promoção e progressão do tumor. Portanto, destaca-se que tanto a mutagenicidade, quanto a genotoxicidade são características indesejáveis no processo de desenvolvimento de medicamentos, no que tange à segurança do produto, logo, são consideradas como critério eliminatório no processo de priorização de ligantes em fases pré-clínicas (MAIA FILHO, 2017; ZANONI, 2014).

Testes podem ser empregados para avaliar a potencial mutagenicidade/carcinogenicidade de uma substância, este procedimento pode ser realizado através do ensaio *in vitro* de AMES, que tem uma permissividade positiva elevada para compostos carcinogênicos que reagem com o DNA, ou podem ser empregadas técnicas *in silico* para tal predição, empregando servidores virtuais (SANTANA *et al.*, 2020).

3.5.4 Filtros físico-químicos

Após a seleção de um conjunto de moléculas potencialmente ativos frente a um alvo biológico e sem predisposição em causar danos significantes a sistemas biológicos humanos, os filtros físico-químicos podem ser empregados para discriminar os candidatos com propriedades inadequadas quanto a biodisponibilidade por via oral (VEBER *et al.*, 2002).

Neste sentido, o cálculo de descritores físico-químicos pode ser utilizado para prever a capacidade de absorção de fármacos administrados por via oral, sendo estes: número de aceptores de ligação de hidrogênio ($HBA \leq 10$) e grupos doadores de ligação de hidrogênio ($HBD \leq 5$), massa molecular (≤ 500 Daltons) e coeficiente de partição octanol-água ($cLogP \leq 5$) e análise da área de superfície polar topológica

(TPSA \leq 140 Å). Portanto, no intuito de prever a biodisponibilidade por esta via, o servidor Swissadme (DAINA, MICHIELIN, ZOETE, 2017; <http://www.swissadme.ch/>) pode ser utilizado para prever tal característica (LIPINSKI *et al.*, 2001; VEBER, *et al.*, 2002; WERTERMAIER, BARRIL, SCAPOZZA, 2015).

Quanto à massa molecular ideal para a priorização de ligantes a serem utilizados por via oral, o ideal é que eles possuam até 500 Da, para que as moléculas consigam atravessar membranas biológicas através de difusão passiva, sem que haja gasto de energia. No que diz respeito ao cLogP, infere-se que valores acima de 5 demonstram uma maior potencialidade da substância em apresentar toxicidade, em decorrência da alta lipofilicidade, uma vez que esta poderá atravessar membranas de forma exacerbada, ocasionando em prejuízo ao organismo (SANTOS *et al.*, 2018; TAVARES, ALVES, BORGES, 2020).

Outro fator analisado é a presença de doadores e aceptores de hidrogênio na molécula. Um ligante que possuir mais que 5 doadores de hidrogênio e/ou mais que 10 aceptores de hidrogênio apresentará maior capacidade em interagir com moléculas de água no organismo, e conseqüentemente, em caso da formação de muitas interações, dificuldade no processo de absorção (SANTOS *et al.*, 2018; TAVARES, ALVES, BORGES, 2020).

No que tange à TPSA, Veber e colaboradores (2002) identificaram que a distribuição de grupamentos polares se caracteriza como um bom indicador para prever a biodisponibilidade oral de compostos, que o tamanho da superfície polar influencia na absorção intestinal, e para tal, uma substância deve possuir, idealmente, valores de TPSA menor ou igual a 140 Å.

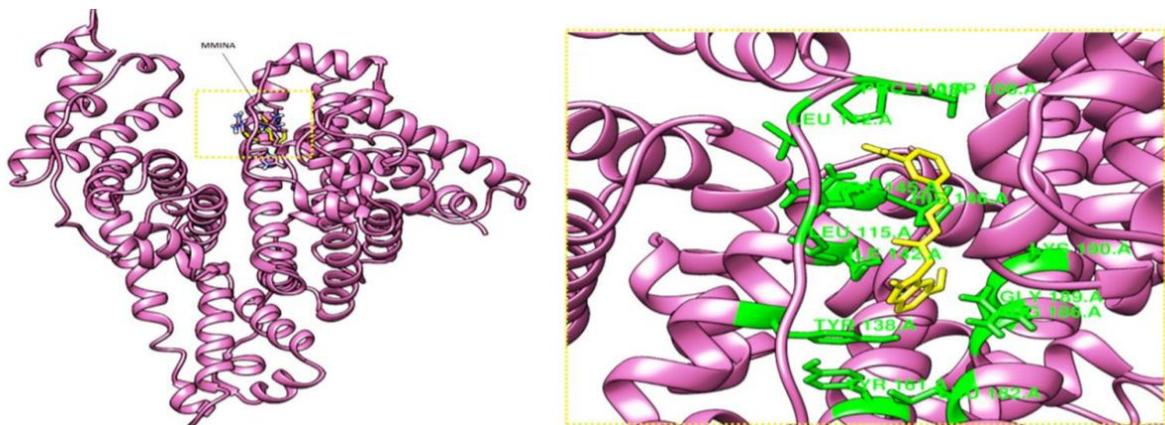
3.5.5 Acoplamento molecular

O acoplamento molecular (do inglês, molecular *docking*) é uma das ferramentas computacionais mais utilizadas para fornecer informações de interações intermoleculares do ligante frente a enzima de interesse (Figura 15). A técnica permite avaliar diferentes formas de ligação de uma molécula no sítio ativo, assim como estimar a afinidade dos confôrmeros. É importante destacar que o acoplamento molecular pode ser utilizado em diferentes estágios no processo de busca por novos compostos, e portanto, a técnica pode ser empregada para identificar moléculas promissoras para etapas subsequentes. Logo, e sem características toxicológicas e

físico-químicas indesejadas, o acoplamento molecular pode ser utilizado para avaliar a interação das substâncias priorizadas frente ao alvo biológico a ser modulado (LIONTA *et al.*, 2014; TELES, 2016).

O acoplamento molecular irá predizer qual conformação do ligante apresentou melhor afinidade com a proteína alvo, além de possibilitar a análise das ligações intermoleculares. Dessa forma, é possível identificar qual dos compostos apresenta maior capacidade de modular a proteína e desencadear uma resposta biológica (CARREGAL *et al.*, 2012).

Figura 15 – Exemplo de acoplamento molecular



Fonte: Adaptado de RAZAK *et al.*, 2021

Para tanto, inicialmente deve-se ter acesso a estrutura tridimensional da proteína. Devido ao avanço dos estudos de biologia estrutural, as técnicas de cristalografia de raios X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear permitiram a posse de estruturas cristalográficas de proteínas (SILVA, 2019). A base de dados que apresenta a maior quantidade de proteínas e ácidos nucleicos depositados em sua conformação tridimensional é o Protein Data Bank (PDB), que disponibiliza tais estruturas gratuitamente para estudos *in silico* (BERMAN *et al.*, 2000). Quando a estrutura tridimensional a ser modulada não foi elucidada, poderá ser empregada a técnica de modelagem comparativa, que viabiliza a construção da proteína a partir do conhecimento de estruturas já conhecidas e que evolutivamente compartilham ancestrais em comum (SANTANA, 2016).

O programa GOLD 5.3 (GOLD, 2008) se mostra promissor para a geração e avaliação do acoplamento molecular entre o ligante e receptor. O procedimento de acoplamento molecular se inicia com a busca conformacional dos ligantes, em que o

programa irá, por meio de mudanças aleatórias nos diédricos nas ligações rotacionáveis da estrutura, possibilitar a geração de conformações diversas (Ex: métodos estocásticos) (LIU, WU, HU, 2011; LEITE, 2015).

O programa GOLD 5.3 apresenta quatro funções de pontuação para avaliação das poses de acoplamento: ChemPLP (do inglês, *Piecewise Linear Potential*), Goldscore, Chemscore e ASP (do inglês, *Astex Statistical Potential*). A função GoldScore é a função de pontuação original fornecida pelo programa GOLD 5.3, ela quantifica a energia do ligante além de calcular a ligação resultante das interações entre o ligante e receptor através da mecânica molecular, tendo como parâmetro fatores como energia de ligação de hidrogênio, energia van der Waals, interação com metais e tensão de torção do ligante. A função Chemscore realiza os cálculos de acoplamento visando a variação de energia livre total que ocorre no sistema com a interação ligante-proteína, já a função ChemPLP possui termos que priorizam a complementaridade estéricas entre o ligante e a proteína, além de adicionar termos de ligações metálicas e de hidrogênio dependentes de distância e ângulo. Por fim, a função ASP utiliza informações sobre frequência das interações entre o ligante e o receptor derivadas de um banco de dados de complexos ligante-proteína, onde o cálculo é baseado em um estado de referência onde o ligante se encontra livre de interações (FONSECA, 2020; GOLD, 2008).

Ou seja, após a definição dos confôrmeros, estes serão avaliados através de uma função de pontuação para predição de sua afinidade junto ao receptor. A pontuação pode ser realizada a partir da soma das forças de interações intermoleculares através do conjunto dos potenciais de interação entre as partículas pelo comportamento molecular entre átomos ligados (Ex: Campo de força), por meio do somatório dos potenciais de interação ajustados para reproduzir dados experimentais (Ex: Empirismo), assim como a partir de dados estatísticos pela de frequência de contatos entre átomos presentes nos complexos para criar potenciais estatísticos e ranquear as poses (Ex: Conhecimento). Através das pontuações descritas é possível estimar de forma aproximada estas forças, e conseqüentemente pontuar a melhor forma de ligação dos confôrmeros, indicando quais ligantes apresentam maior probabilidade de interação frente a seu alvo biológico e modulação de propriedade bioativa (CASTILHO, 2017; LIONTA *et al.*, 2014; NETO, 2020).

3.5.6 Dinâmica molecular

Estudos de dinâmica molecular (DM) também podem ser conduzidos para trazer um maior detalhamento do comportamento do complexo ligante-alvo. A DM permite incorporar liberdade conformacional às estruturas do composto e receptor, além de considerar efeitos de solvatação e dessolvatação do meio, melhor simulando as condições do meio biológico para entendimento da interação entre ligante-proteína (BONFIM, 2014; NANBA, SILVA, SILVA, 2008).

Tal estratégia emprega a segunda lei de movimento de Newton (Equação 3), a qual define que todo sistema parte de uma posição inicial, que após receber a aplicação de forças, poderá apresentar outras posições em diferentes intervalos de tempo. Neste sentido, cada átomo está sujeito a forças interatômicas e intermoleculares presentes em um determinado campo de força. A qual constitui um conjunto de parâmetros e funções descritas pela mecânica molecular que possibilita a obtenção de informações energéticas e conformacionais de cada partícula ao longo de uma trajetória (BONFIM, 2014).

Equação 1 – Equação matemática da segunda lei de Newton

$$F_i(t) = m_i \cdot a_i$$

F_i = Força aplicada sob cada átomo do sistema em função do tempo;

(t) = Tempo

m_i = Massa de cada átomo;

a_i = Aceleração aplicada.

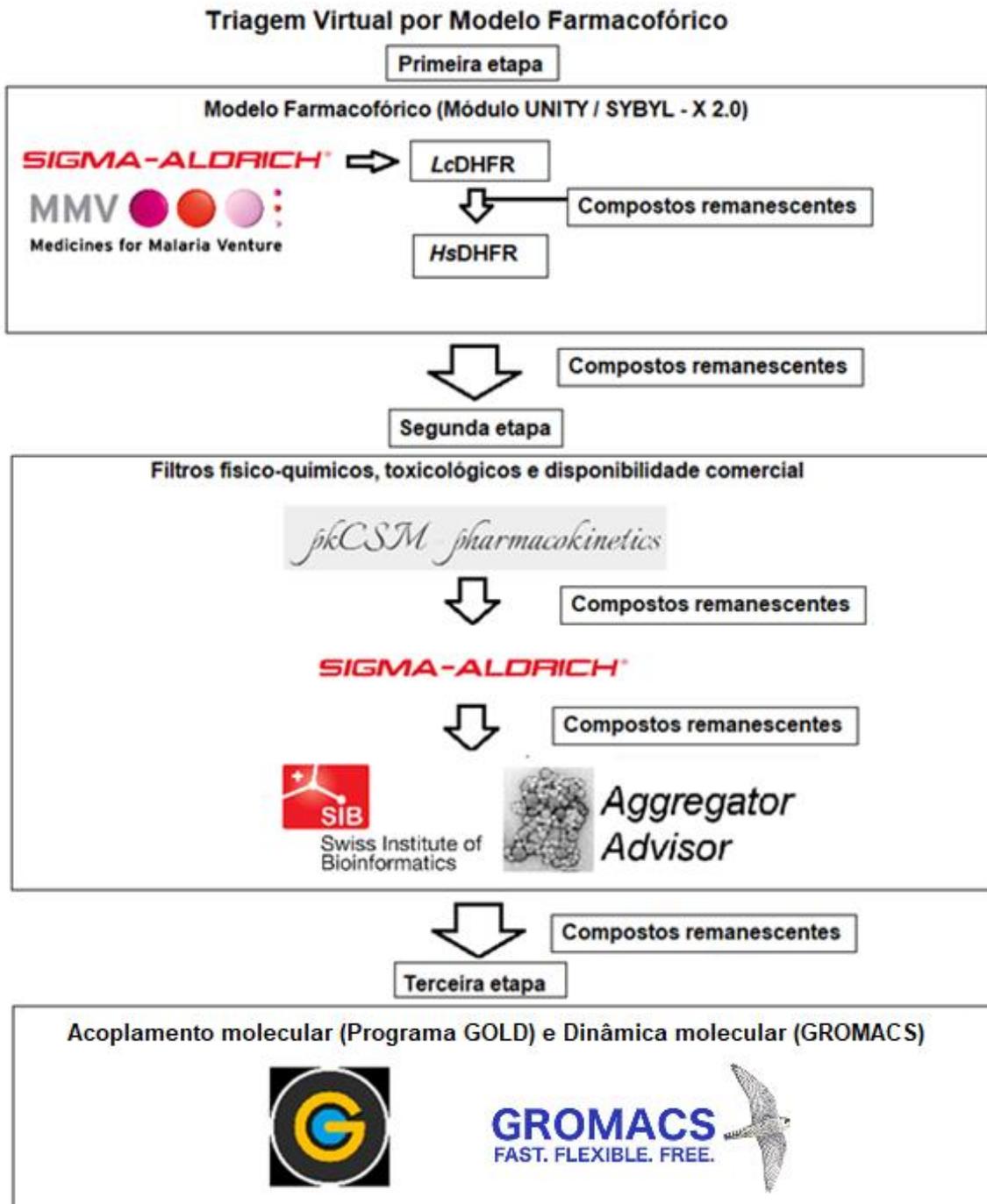
O programa GROMACS (VAN DER SPOEL *et al.*, 2005) permite a realização de simulações de DM com desempenho adequado e com um menor custo computacional ao ser comparado com outros programas de simulação. Dentre os campos de força implementado no GROMACS (VAN DER SPOEL *et al.*, 2005), o mesmo possibilita a utilização do campo de força GROMOS, que contabiliza apenas átomos de hidrogênio ligados a carbono aromáticos e heteroátomos, simplificando o tempo do cálculo computacional e garantindo resultados com maior celeridade (NETO, 2020).

Portanto, a DM possibilita o estudo do comportamento do ligante frente à proteína de forma dinâmica, permitindo verificar as interações intermoleculares mais incidentes durante a simulação e identificar os compostos a serem priorizados em estudos *in vitro* subsequentes (LEITE, 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização da TV, foram realizados os procedimentos conforme o fluxo a seguir (Figura 16):

Figura 16 – Fluxograma da TV por modelo farmacofórico



Fonte: Autor

4.1 Modelos farmacofóricos

4.1.1 Definição dos conjuntos treino e teste

Um conjunto de 14 moléculas que compartilham o mesmo mecanismo de ação frente a DHFR (competitivo com o substrato) de espécies causadoras de LV (*L. donovani* e *L. chagasi*) descritas na literatura com dados de atividade biológica foi catalogado para a delimitação dos conjuntos treino e teste utilizados respectivamente para construção e validação dos modelos farmacofóricos da referida enzima (HARDY *et al.*, 1997; GILBERT, 2002; PEZ *et al.*, 2003; KHABNADIDEH *et al.*, 2005; GANGJEE, NAMJOSHI, 2007; TEXEIRA *et al.*, 2019; SHARMA, BHARATAM, 2020).

A seleção do conjunto treino para o modelo farmacofórico da DHFR de *L. chagasi* (composto por moléculas que serviram de base para a construção do modelo) foi realizada priorizando compostos que apresentassem seletividade em detrimento à enzima humana. Através da literatura disponível, foi possível selecionar moléculas com índice de seletividade (IS) de pelo menos 3 vezes para enzima do parasito (TEXEIRA *et al.*, 2019). As demais moléculas selecionadas foram utilizadas para compor o conjunto teste, utilizados para avaliar a eficácia do modelo (CASTILHO, 2017).

De forma análoga, 10 moléculas e seus respectivos valores de atividade inibitória frente a DHFR de *H. sapiens* foram levantadas a partir da literatura para construção do modelo farmacofórico direcionado à enzima humana (KARABULUT *et al.*, 2016).

O conjunto teste de inibidores de HsDHFR foi obtido através do servidor DUD-E (MYSINGER *et al.*, 2012; <http://dude.docking.org/>).

4.1.2 Construção dos modelos farmacofóricos de DHFR de *L. chagasi* e *H. sapiens*

A estrutura 2D de todos os inibidores levantados foi desenhada e seu estado de protonação corrigido (pH = 7.0) (TEXEIRA, *et al.* 2019) no programa Marvin® Sketch 15.4.20 (CHEMAXON, 2015; <https://www.chemaxon.com/>) e posteriormente convertida para o formato 3D com o auxílio do módulo CONCORD utilizando parâmetros padrão disponíveis na ferramenta “*translate molecular file*” do programa SYBYL®-X 2.0 (TRIPOS, 2010). As cargas atômicas parciais foram então atribuídas

usando o método Gasteiger Huckel (GASTEIGER, MARSILI, 1980), como disponível na plataforma SYBYL®-X 2.0 (TRIPOS, 2010). Posteriormente, a estrutura 3D de cada molécula foi minimizada por método de Gradiente Conjugado (GC) empregando um critério de convergência de 0,001 Kcal/mol utilizando o campo de força Tripos (CLARK, CRAMER, VAN OPDENBOSCH, 1989) ($\epsilon = 80,4$; máximo de interações = 50.000).

Após a minimização dos compostos, os modelos farmacofóricos foram gerados a partir do conjunto treino. Os confôrmeros foram obtidos através de AG, sendo o tamanho da população e o número máximo de gerações para os inibidores de LcDHFR e HsDHFR utilizados conforme valores padrão, enquanto os demais parâmetros foram ajustados (CRUZAMENTO= 1,0 e MUTAÇÃO= 1,0). Posteriormente, os confôrmeros foram alinhados e sobrepostos, de forma flexível, entre si gerando os modelos farmacofóricos.

4.1.3 Validação dos modelos farmacofóricos

Os modelos farmacofóricos que apresentaram valor de ENERGY superior a duas ordens de magnitude (> 100 kcal/mol) em relação aos demais foram descartados. Em seguida, os modelos remanescentes foram avaliados quanto à pontuação de Pareto. Aqueles estatisticamente equivalentes aos demais (PARETO = 0) foram avaliados quanto ao poder discriminatório em detrimento a falsos positivos, estes últimos construídos com o auxílio do servidor DUD-E (MYSINGER *et al*, 2012; <http://dude.docking.org/>), utilizando a proporção de 50 *decoys* para cada ativo. Para tanto, realizou-se o cálculo da área sob a curva (do inglês, *Area Under the Curve - AUC*) de cada curva ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*) (GIGLIARANO; FIGINI; MULIERE, 2014; VANAGAS, 2004) com o auxílio do programa SigmaPlot™ v. 12.0 (SYSTAT, 2014).

Para os modelos que apresentaram empate quanto ao valor da AUC, utilizou-se como critério de seleção a capacidade dos modelos em recuperar uma maior quantidade de ativos entre os 2% de compostos melhores ranqueados de acordo com os valores de Query Fit (QFIT) (Equação 2) (XU, HUANG, ZOU, 2018).

Equação 2 – Fórmula para cálculo do fator de enriquecimento

$$EF (x\%) = \frac{n (\text{ativos em } x\% \text{ da base de dados}) / n (x\% \text{ da base de dados})}{n (\text{total de ativos}) / n (\text{total da base de dados})}$$

4.2 Triagem virtual por modelo farmacofórico

Os modelos farmacofóricos selecionados das DHFR do parasito e humana foram utilizados para identificar potenciais inibidores junto às moléculas contidas no catálogo da Sigma-Aldrich® (n = 214.446), disponível na plataforma ZINC15 (STERLING, IRWIN, 2015; <http://zinc.docking.org/>), e no banco de moléculas disponíveis gratuitamente pelo MMV (do inglês, *Medicines for Malaria Venture*; <https://www.mmv.org/mmv-open>). Estas buscas foram processadas com auxílio do módulo UNITY 3D do SYBYL®-X 2.0 (TRIPOS, 2010). As substâncias que pontuaram no modelo da LcDHFR e subsequentemente pontuaram no modelo da HsDHFR foram consideradas como potenciais inibidores para enzima humana e não foram consideradas para as análises subsequentes.

Para as moléculas remanescentes (que pontuaram no modelo LcDHFR e não no modelo HsDHFR), foram consideradas para as etapas posteriores as que apresentassem valor de QFIT acima do ponto de corte definido pela média mais duas vezes o desvio padrão dos valores de QFIT de todos os compostos na mesma condição, conforme Equação 3.

Equação 3 - Equação matemática da média somada a duas vezes o desvio padrão

$$X = x + 2 \times \sigma$$

X = Valor de QFIT do ponto de corte

x = Média dos valores de QFIT do banco triado

σ = Desvio Padrão

4.3 Aplicação dos filtros físico-químicos, toxicológicos e disponibilidade comercial

As moléculas remanescentes da Triagem Virtual por Modelos Farmacofóricos (HIKMAWATI *et al.*, 2022; MARTINS, 2017) foram avaliadas quanto aos principais descritores físico-químicos relacionados à biodisponibilidade por via oral. Para tanto, foram calculados o número de aceptores de ligação de hidrogênio (≤ 10) e grupos doadores de ligação de hidrogênio (≤ 5), massa molecular (≤ 500 g/mol), coeficiente de partição octanol-água (clogP) (≤ 5) e da área de superfície polar (PSA) (≤ 140 Å). Adicionalmente, as moléculas foram avaliadas quanto à parâmetros de toxicidade como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, mutagenicidade, potencialidade de representar compostos promíscuos. Os servidores a seguir foram respectivamente utilizados para essas determinações: Swissadme (DAINA, MICHIELIN, ZOETE, 2017; <http://www.swissadme.ch/>), Pkcsm (PIRES, BLUNDELL, ASCHER, 2015; <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/>) e Aggregator Advisor (IRWIN *et al.*, 2015; <http://advisor.bkslab.org/>). As moléculas que foram aprovadas após o filtro físico-químico e toxicológico, foram submetidas à análise da disponibilidade comercial através do domínio da Sigma-Aldrich® (<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt>) (CASTILHO, 2017; LIPINSKI *et al.*, 2001; VEBER, *et al.*, 2002; WERTERMAIER, BARRIL, SCAPOZZA, 2015).

4.4 Acoplamento molecular

Para o presente estudo foi utilizada a estrutura da enzima dihidrofolato redutase-timidilato sintase de *L. chagasi* (LcDHFR-TS) complexada ao seu substrato (DHF) e cofator (NADPH) obtida através de modelagem por homologia.

4.4.1 Construção e avaliação do modelo de LcDHFR-TS

A construção e avaliação do modelo foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Humberto Foseca de Freitas. Para tal, a sequência primária da LcDHFR (Código de Genbank: NC_009277) foi alinhada às estruturas 3D de *Trypanosoma cruzi* DHFR-TS (PDB: 3KJS) e *Trypanosoma brucei* (PDB: 3QFX) através do servidor Clustal Omega (SIEVERS *et al.*, 2011; <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Em seguida, o MODELLER 9.18 (WEBB, SALI, 2016) foi utilizado para a construção de 100 modelos tridimensionais de LcDHFR, os quais foram ranqueados quanto ao valor

de QMEAN (do inglês, *Qualitative Model Energy Analysis*; BENKERT, TOSATTO, SCHOMBURG, 2008; <https://swissmodel.expasy.org/qmean/>).

Os dez melhores modelos tridimensionais foram avaliados quanto à qualidade estéreo-química utilizando o software SAVES v. 6.0 (COLOVOS, YEATES, 1993; <https://saves.mbi.ucla.edu/>). A compatibilidade entre a sequência primária e o desdobramento tridimensional dos modelos foram avaliados através do servidor VERIFY 3D (EISENBERG, LUTHY, BOWIE, 1997; http://services.mbi.ucla.edu/Verify_3D/).

4.4.2 Avaliação dos parâmetros de busca

Para a realização do acoplamento molecular foi realizada a busca pela melhor função de pontuação capaz de analisar a afinidade de interação entre o modelo de LcDHFR-TS frente ao substrato (DHF), o procedimento foi realizado em colaboração com Quezia Victoria Faleiro Souza da Fonseca. Para tal, os cálculos realizados consideraram a região do sítio catalítico da enzima, o qual foi obtido a partir das coordenadas do substrato complexado à estrutura da enzima. Moléculas de água e artefatos foram removidos da estrutura 3D através do programa PyMOL 1.3 (SCHRÖDINGER, 2009). Prosseguiu-se com a determinação do estado de protonação dos resíduos da LcDHFR-TS em pH 7,0 no programa H++ (ANANDAKRISHNAN, AGUILAR, ONUFRIEV, 2012; <http://biophysics.cs.vt.edu/>), que representa àquele encontrado no meio biológico no parasito (TEXEIRA *et al.*, 2019).

A análise da eficácia das funções de pontuação (ASP, Goldscore, ChemPLP e Chemscore) foi realizada no programa GOLD 5.3 (GOLD, 2008), em que foi avaliada a capacidade de recuperação da pose biológica do substrato (DHF) por meio da investigação dos valores do desvio da raiz quadrada média (do inglês, *Root Mean Square Deviation* – RMSD, < 2 Å).

Adicionalmente, a eficiência do GOLD 5.3 (GOLD, 2008) foi avaliada quanto à capacidade de atribuir melhor pontuação de afinidade à inibidores já descritos para DHFR (verdadeiros positivos) em detrimento de *decoys* (falsos positivos) disponíveis na plataforma DUD-E (MYSINGER *et al.*, 2012; <http://dude.docking.org/>), na proporção de 50 *decoys* para cada ativo, mediante da análise da curva ROC e valores de AUC (GIGLIARANO; FIGINI; MULIERE, 2014; VANAGAS, 2004) utilizando as diversas funções de pontuação disponíveis no GOLD 5.3. Além disso, a fim de possibilitar a

identificação da melhor configuração de funções de pontuação para identificação de inibidores na etapa inicial do banco triado, utilizou-se a Equação 1 (CASTILHO, 2017; FONSECA, 2020; LEITE, 2016).

4.4.3 Triagem virtual por acoplamento molecular

As moléculas que foram selecionadas após avaliação pelos filtros físico-químicos, toxicológicos e disponibilidade comercial foram avaliadas quanto à sua afinidade e modo de ligação frente a *LcDHFR-TS* mediante acoplamento molecular pelo programa GOLD 5.3 (GOLD, 2008). A função de pontuação utilizada para a análise da afinidade de ligação entre os compostos e a enzima foi ASP (do inglês, *Astex Statistical Potential*), com *rescore* com GoldScore.

4.5 Dinâmica molecular

As simulações de DM foram realizadas com a colaboração do Prof. Dr. Samuel Silva da Rocha Pita através do programa GROMACS 5.0 (VAN DER SPOEL *et al.*, 2005), utilizando o campo de força GROMOS 54a7, T. 310K, pH 7,0 e pressão 1 bar. A estrutura tridimensional da *LcDHFR-TS* submetida ao programa foi a construída por modelagem por homologia e preparada no software H++ (ANANDAKRISHNAN, AGUILAR, ONUFRIEV, 2012). Os ligantes utilizados foram parametrizados através do servidor ATB 2.2 (VAN GUNSTEREN *et al.*, 2021; <https://atb.uq.edu.au>) para a geração da topologia.

Foi aplicado um protocolo de minimização energética com 100 ciclos de *Steepest Descent* e Gradiente Conjugado, com convergência de força de 1 Kcal/mol/Å, dinâmica de restrição (tempo= 1 ns) e dinâmica de produção (tempo= 110 ns) para avaliar a forma APO (*LcDHFR-TS*) complexos *LcDHFR-TS:NADPH*, *LcDHFR-TS:NADPH:SUB10* e *LcDHFR-TS:NADPH-SUB22*. Para tal, cada sistema foi solvatado em caixa cúbica com água SPC-E (BERENDSEN *et al.*, 1987), em que o complexo foi posicionado na região central com distância de 1,4 nm das bordas e neutralizado com contraíons (Na⁺ ou Cl⁻).

As análises da estabilidade dos sistemas foram realizadas através da interpretação do parâmetro de desvio médio da raiz quadrada média (RMSD), com o auxílio do módulo *g_rms*. O número e permanência das ligações de hidrogênio (H) entre ligantes e proteína foram calculadas através do módulo *g_hbond*.

Os cálculos dos parâmetros descritos acima foram realizados no pacote do GROMACS 5.0 (VAN DER SPOEL *et al.*, 2005). As coordenadas das simulações foram salvas a cada 100 ps e a trajetória obtida durante uma simulação de 110 ns no ensemble isotérmico-isobárico - NPT (número de partículas, temperatura e pressão constante). De forma adicional, os gráficos para análise das variações energéticas foram gerados pelo programa HbMap2Grace (<http://lmdm.biof.ufrj.br/software/hbmap2grace>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

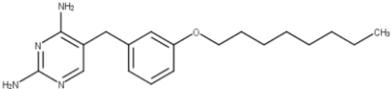
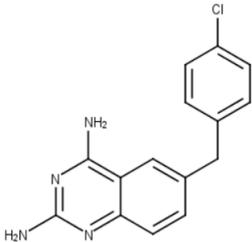
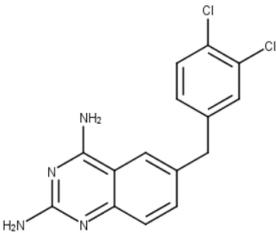
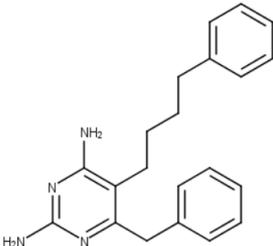
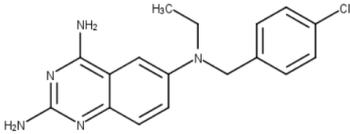
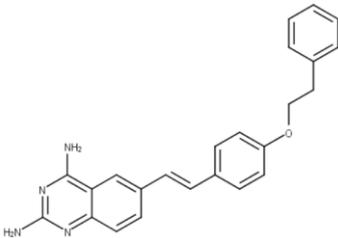
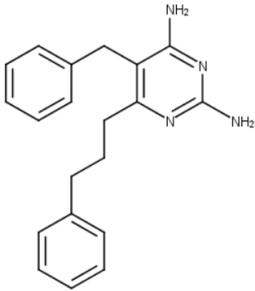
5.1 Modelos farmacofóricos

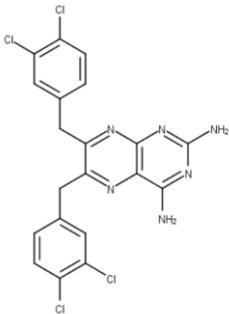
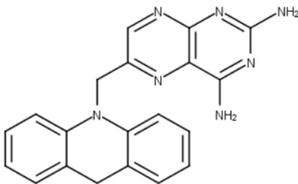
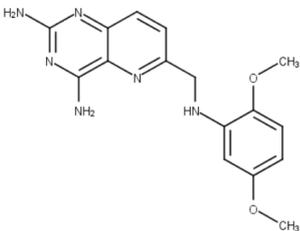
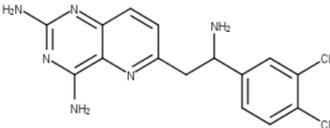
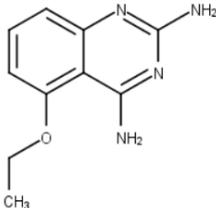
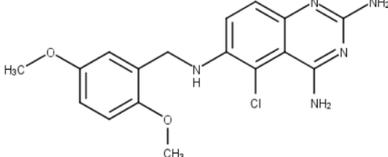
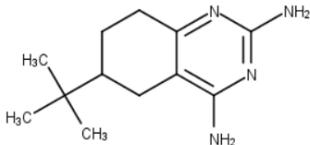
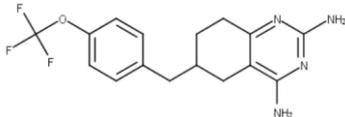
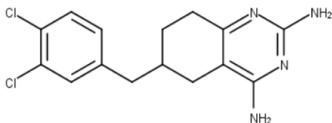
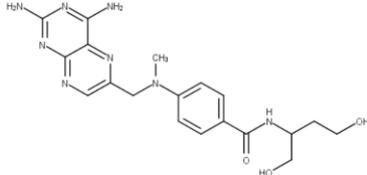
5.1.1 Definição dos conjuntos treino e teste

O levantamento de inibidores das DHFR de *L. chagasi* e *H. sapiens* descritos em literatura está diretamente relacionado ao sucesso das estratégias computacionais utilizadas. Selecionar compostos considerando potência e diversidade química em estratégias de planejamento de fármacos baseadas em ligantes (Ex: modelos farmacofóricos) é essencial para garantir não apenas a identificação dos requisitos estéreo-eletrônicos necessários para inibir o alvo em questão, mas também não limitar a diversidade estrutural de compostos potencialmente ativos a serem identificados. Por essa razão, uma análise visual das estruturas químicas foi permitiu a seleção das estruturas priorizando a diversidade estrutural (MARTINS, 2017).

Foram selecionados 14 inibidores para compor o conjunto treino (7) e teste (7) de LcDHFR descritos nos estudos de Hardy e colaboradores (1997), Gilbert (2002), Pez e colaboradores (2003), Khabnadideh e colaboradores (2005, Gangjee e Namjoshi (2007), Teixeira e colaboradores (2019) e Sharma e Bharatam (2020) além de 10 para o conjunto treino descritos por Karabulut e colaboradores (2016) e 20 para o conjunto teste (DUD-E, REF) de HsDHFR (Quadro 1).

Quadro 1 - Substâncias selecionadas para construção do modelo farmacológico de *LcDHFR* e *HsDHFR*

Estrutura química	Atividade biológica IC ₅₀ (μM)	Estrutura química	Atividade biológica IC ₅₀ (μM)
Substâncias selecionadas para construção do modelo farmacológico de <i>LcDHFR</i>			
<p style="text-align: center;">SUBS1</p> 	0,097	<p style="text-align: center;">SUBS2</p> 	0,14
<p style="text-align: center;">SUBS3</p> 	0,16	<p style="text-align: center;">SUBS4</p> 	0,17
<p style="text-align: center;">SUBS5</p> 	0,000012	<p style="text-align: center;">SUBS6</p> 	0,53
<p style="text-align: center;">SUBS7</p> 	1,65		

Substâncias selecionadas para construção do modelo farmacofórico de <i>HsDHFR</i>			
<p>SUBS1</p> 	3,5	<p>SUBS2</p> 	0,56
<p>SUBS3</p> 	0,83	<p>SUBS4</p> 	0,0004
<p>SUBS5</p> 	0,75	<p>SUBS6</p> 	0,0039
<p>SUBS7</p> 	0,022	<p>SUBS8</p> 	0,31
<p>SUBS9</p> 	0,094	<p>SUBS10</p> 	1,9

Fonte: Autor

Os compostos remanescentes foram empregados na etapa de avaliação dos modelos farmacofóricos (Apêndice A).

5.1.2 Construção e avaliação dos modelos farmacofóricos DHFR de *L. chagasi* e *H. sapiens*

O sucesso na estratégia de priorização de potenciais inibidores baseando-se no padrão farmacofórico de compostos com atividade já conhecida também está relacionado na qualidade dos modelos farmacofóricos gerados (ANDRADE, 2019; LIONTA, *et al.*, 2014). Neste contexto, a meta de selecionar inibidores potentes e com diversidade estrutural capazes de se ligar a LcDHFR pode ser um desafio para a construção dos modelos farmacofóricos.

Por se tratar de uma estratégia que considera a sobreposição de estruturas químicas para identificação de padrões farmacofóricos, o alinhamento de moléculas com quimiotipos diferentes pode apresentar limitações no momento da definição do arranjo conformacional e resultar em modelos com penalidades energéticas (ANDRADE, 2019; LIONTA, *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2010).

Para contornar essa limitação, a utilização de programas computacionais que utilizam métodos de alinhamento flexível (Ex: algoritmo genético) é uma alternativa para o alinhamento de compostos com diversidade química. Dentre os programas de geração de hipóteses farmacofóricas, o GALAHAD™ representa uma alternativa capaz de definir os confôrmeros de menor energia e alinhá-los flexivelmente, por meio da aplicação de um algoritmo genético. Além disso, este programa é capaz de analisar estatisticamente a qualidade das hipóteses farmacofóricas atribuindo pesos não-dominantes a cada parâmetro (ex. valor de energia estérica; concordância farmacofórica; sobreposição dos confôrmeros para a geração das hipóteses; pontuação de Pareto) (LIU, WU, HU, 2011; YANG, 2010).

Assim, com base na natureza estocástica do algoritmo genético implementado no GALAHAD™, dez modelos farmacofóricos de LcDHFR foram gerados (Quadro 2).

Quadro 2 – Dados estatísticos dos modelos farmacofóricos obtidos para *LcDHFR*

Modelo	Pareto	Energy	Sterics	H Bond	Mol_qry
Modelo 1	0	27,71	110,30	51,30	21,86
Modelo 2	0	15701,00	121,20	54,60	15,77
Modelo 3	0	19210,40	122,40	53,50	21,29
Modelo 4	0	14,16	90,10	49,60	16,80
Modelo 5	0	36,01	144,80	44,60	11,47
Modelo 6	0	118,18	121,40	49,90	14,13
Modelo 7	0	161,16	126,70	48,30	16,32
Modelo 8	0	69,64	143,20	49,90	8,95
Modelo 9	0	15,77	104,50	48,80	14,23
Modelo 10	0	21,79	106,90	51,50	10,73

Fonte: Autor

Da mesma forma, dez modelos farmacofóricos foram obtidos para a definição dos requisitos estereo-eletrônicos de inibidores da *HsDHFR*(Quadro 3).

Quadro 3 – Dados estatísticos dos modelos farmacofóricos obtidos para *HsDHFR*

Modelo	Pareto	Energy	Sterics	H Bond	Mol_qry
Modelo 1	0	18,66	214,80	95,80	43,46
Modelo 2	0	12,44	198,10	97,20	29,57
Modelo 3	0	18,58	195,10	96,70	37,75
Modelo 4	0	14,95	204,20	94,50	34,13
Modelo 5	0	15,99	201,30	95,50	56,35
Modelo 6	0	26,61	211,00	98,30	27,08
Modelo 7	0	10,17	191,40	94,70	32,34
Modelo 8	0	5747116,50	205,70	103,90	30,05
Modelo 9	0	11,28	203,00	96,50	29,90
Modelo 10	0	9,83	204,20	91,80	41,49

Fonte: Autor

Considerando os parâmetros de qualidade interna dos modelos gerados, sabe-se que hipóteses farmacofóricas com valores de energia maiores que duas ordens de magnitude (>100 kcal/mol) refletem alta penalidade torsional para possibilitar o alinhamento dos compostos, e, portanto, definir os requisitos estereo-eletrônicos (GOLD, 2008). Por esse motivo, quatro dos dez modelos de *LcDHFR* e um de *HsDHFR* foram descartados.

Os modelos remanescentes foram avaliados quanto ao valor de PARETO que normaliza os parâmetros Mol_qry, H_bond e STERICS, e através dos quais verifica a equivalência de consistência interna de cada modelo com relação aos demais. Dentre

os parâmetros considerados na análise PARETO, Mol_qry é responsável por avaliar o ajuste das características presentes nos ligantes empregados na construção do modelo em relação aos pontos farmacofóricos, STERICS analisa o grau de sobreposição das moléculas que foram alinhadas entre si, já HBOND avalia o grau de sobreposição das características farmacofóricas nos confôrmeros (CLARK, ABRAHAMIAN, 2009; LEITE, 2015).

Todos os modelos remanescentes apresentam PARETO = 0, o que significa que nenhum dos modelos foi considerado superior ou inferior com relação aos demais, sendo todos estatisticamente equivalentes no que se refere aos parâmetros citados. Diante desse empate, outras estratégias precisaram ser utilizadas para discriminar o melhor modelo farmacofóricos dentre os remanescentes a ser utilizado na etapa de triagem virtual (CLARK, ABRAHAMIAN, 2009; LEITE, 2015).

Uma estratégia adicional amplamente utilizada consiste em avaliar a capacidade dos modelos em identificar compostos ativos em detrimento a compostos falsos positivos (denominados *decoys*). Para auxiliar nesse processo, pode-se utilizar a análise ROC (*Receiver Operating Characteristic*), a qual é representada na forma de gráfico bidimensional cujo eixo Y mensura a sensibilidade do sistema de triagem (reconhecimento de ativos), enquanto o eixo X avalia sua especificidade (capacidade de priorizar falsos-positivos) (Figura 17) (CASTILHO, 2017; MARTINEZ, LOUZADA-NETO, PEREIRA, 2003; SHEPPHIRD, CLARK, 2006).

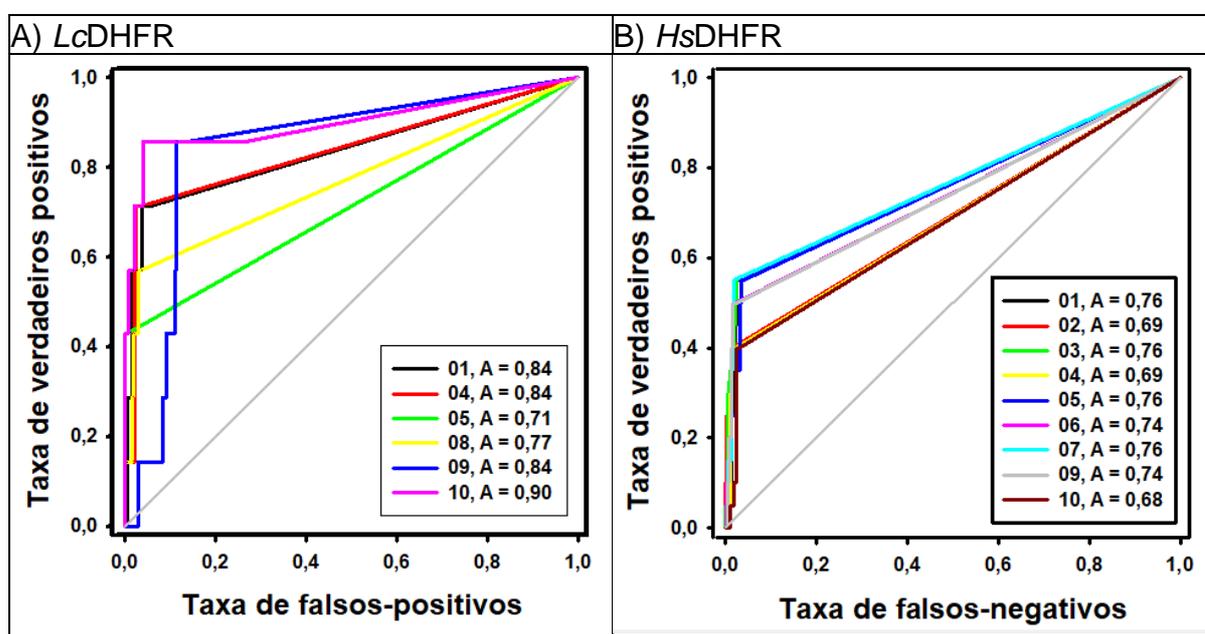
Uma curva ideal desloca-se de forma contínua verticalmente pelo eixo Y, e, em seguida, horizontalmente pelo eixo X, a qual representa a recuperação de todos os ativos do banco de moléculas alinhado sem nenhum reconhecimento de falsos-positivos, sendo nesse caso área sob a curva (AUC) igual a 1,0. Além disso, a linha diagonal representa a curva ROC de um ensaio randômico, onde as hipóteses farmacofóricas que possuírem $AUC < 0,50$ são associados a modelos com desempenho pior do que uma seleção aleatória, enquanto os modelos com $AUC > 0,70$ são moderadamente preditivos. Para mais, valores de AUC acima de 0,80 são considerados bons e entre 0,9 a 1,0 são considerados excelentes (CASTILHO, 2017; MARTINEZ, LOUZADA-NETO, PEREIRA, 2003; SHEPPHIRD, CLARK, 2006).

Os dados obtidos da triagem pelos modelos farmacofóricos dos bancos de ativos e *decoys* usados para validação dos modelos demonstraram que o modelo farmacofóricos 10 de LcDHFR apresentou maior valor de AUC entre os

demais (AUC = 0,90 Å). Para mais, este modelo também apresentou melhor taxa de enriquecimento de acordo com a Equação 1 (Quadro 4).

Com relação aos modelos farmacofóricos da *HsDHFR*, houve empate entre os modelos nº 3, 5, 7 e 10 quanto ao valor da AUC (0,76 Å). Dessa forma, a taxa de enriquecimento foi utilizada como critério de desempate por ser uma estratégia capaz de analisar a capacidade de cada modelo farmacofórico de *HsDHFR* em recuperar ativos nas fases iniciais (Quadro 5) (XU, HUANG, ZOU, 2018).

Figura 17 - Curva ROC e valores de AUC para os modelos de *LcDHFR* e *HsDHFR*



Curva ROC dos modelos remanescentes de *LcDHFR* e *HsDHFR* alinhados com um banco de moléculas contendo 20 ativos e 1000 *decoys* e 7 ativos e 350 *decoys*, respectivamente

Fonte: Autor

Quadro 4 - Fator de enriquecimento dos modelos farmacofóricos dos 2% compostos melhores ranqueados no conjunto de moléculas utilizado para validação de *LcDHFR*

Modelo	Ativos	Taxa enriquecimento
Modelo 1	3	43%
Modelo 4	1	14%
Modelo 5	3	43%
Modelo 8	2	29%
Modelo 9	0	0%
Modelo 10	4	57%

Fonte: Autor

Quadro 5 - Fator de enriquecimento dos modelos farmacofóricos dos 2% compostos melhores ranqueados no conjunto de moléculas utilizado para validação de *HsDHFR*

Modelo	Ativos	Taxa enriquecimento
Modelo 1	6	30%
Modelo 3	7	35%
Modelo 5	5	25%
Modelo 6	4	20%
Modelo 7	6	30%
Modelo 9	4	20%

Fonte: Autor

De acordo com os dados analisados, o modelo farmacofórico 3 de *HsDHFR* foi selecionado por apresentar um melhor desempenho na taxa de recuperação dos ativos em relação aos demais nas fases iniciais.

Uma vez definidos os modelos a serem utilizados para a triagem virtual, é interessante observar as características farmacofóricas propostas por cada um. O melhor modelo farmacofórico para de *LcDHFR* possui três centros hidrofóbicos (HY), três pontos doadores de interação de hidrogênio (HBD) e um ponto aceitador de interação de hidrogênio (HBA).

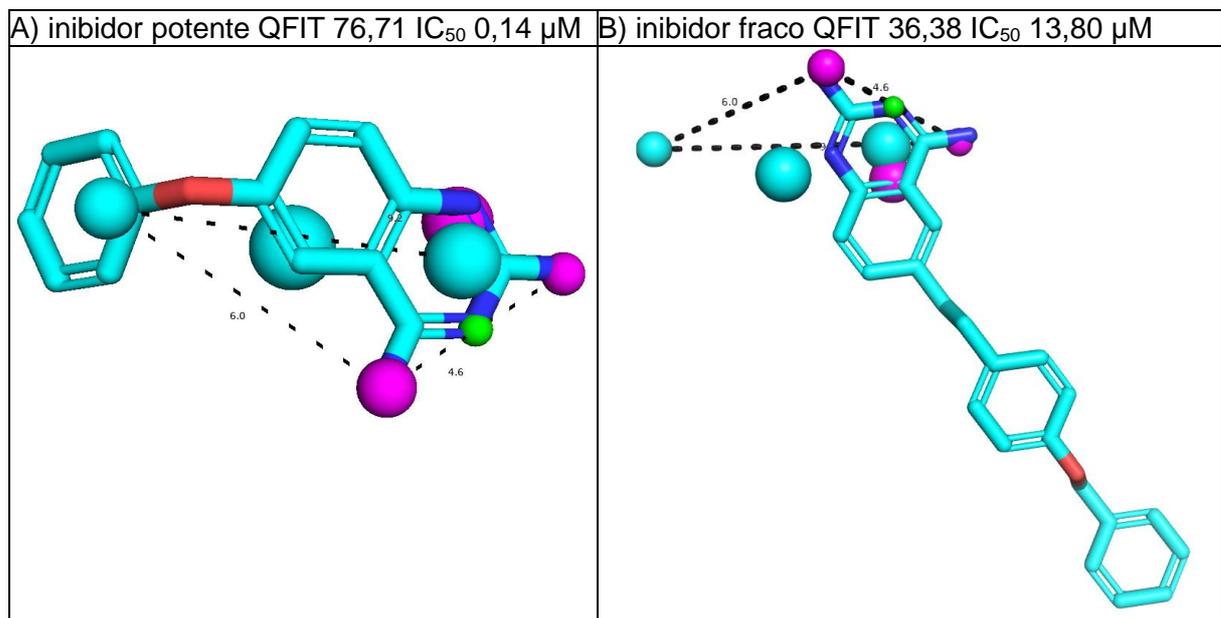
O modelo priorizado apresentou pontos convergentes ao proposto por Kumar e Siddic (2008), em que o modelo elaborado para DHFR de *Mycobacterium tuberculosis* também apresentou pontos hidrofóbicos e doadores de ligação de hidrogênio. Tais farmacóforos também se mostraram como requisitos essenciais em um modelo de parasito da família Trypanossomatidae, em que o modelo farmacofórico de *T. cruzi* elaborado por Schormann e colaboradores (2010) apresentou quatro centros hidrofóbicos, dois pontos doadores de ligação de hidrogênio e um ponto ionizável. Ambos os estudos corroboram que centros hidrofóbicos e de doação de interação de hidrogênio são requisitos essenciais para o reconhecimento pelo alvo, enquanto o ponto aceitador de interação de hidrogênio representa requisito de potência.

Já o modelo selecionado para *HsDHFR* apresentou três centros hidrofóbicos, quatro pontos doadores de interação de hidrogênio e quatro pontos aceitadores de interação de hidrogênio. O modelo referido apresentou pontos convergentes ao construído de *HsDHFR* por Arooj e colaboradores (2013), que possuiu seis pontos aceitadores de interação de hidrogênio, dois pontos doadores de interação de hidrogênio e um centro hidrofóbico, e pelo modelo elaborado por Rana e colaboradores (2019), em que foram encontrados quatro pontos doadores de

interação de hidrogênio, um centro hidrofóbico e dois pontos aceitadores de interação de hidrogênio. Os estudos sugerem que diferentemente do modelo de *LcDHFR*, os pontos aceitadores de interação de hidrogênio são requisitos essenciais para o reconhecimento para o alvo de *H. sapiens*, demonstrando que esse modelo é capaz de discriminar compostos com maior seletividade para a enzima humana.

A partir da visualização da sobreposição dos inibidores mais e menos potentes (ex potente: IC_{50} 0,14 μ M) identificados a partir do levantamento bibliográfico aos requisitos estereo-eletrônicos (Figura 18), o modelo dez pode ser considerado útil para a identificação de potenciais moléculas com atividade frente à *LcDHDR*, portanto, pode ser utilizado nas etapas de triagem virtual por modelo farmacofórico. Adicionalmente, apesar do inibidor fraco estar sobrepondo todas as características farmacofóricas, longas cadeias alifáticas podem causar impedimentos estéricos e, portanto, reduzir a atividade biológica de uma estrutura.

Figura 18 – Inibidores mais e menos potentes frente ao modelo dez de *LcDHFR*



Todas as distâncias estão mensuradas em Å. Pontos farmacofóricos se encontram em esferas. Centros hidrofóbicos estão na cor azul claro. Pontos doadores de interação de hidrogênio estão na cor roxa. Pontos aceitadores de interação de hidrogênio na cor azul escuro.

Fonte: Autor

5.1.3 Triagem Virtual por Modelo Farmacofórico

A partir da triagem virtual pelo modelo nº 10 de *LcDHFR*, de 214.446 moléculas disponíveis no banco da Sigma-Aldrich® da plataforma ZINC15 (STERLING, IRWIN, 2015; <https://zinc.docking.org/>), além de 400 substâncias da MMV (<https://www.mmv.org/mmv-open>), respectivamente, 84.522 e 150 (n. total: 84.672) compostos apresentaram algum registro de ajuste ao modelo ($0,28 < \text{QFIT} > 88,77$).

A partir desse quantitativo de compostos que apresentaram algum ajuste frente ao modelo de *LcDHFR*, decidiu-se prosseguir com as substâncias com valores de QFIT superior ao cálculo da média somada com duas vezes o desvio padrão (Equação 3), correspondentes àquelas que melhor pontuaram frente ao modelo do parasito ($\text{QFIT} > 71,91$). Este procedimento garante moléculas com valores de sobreposição ao modelo estatisticamente acima da normalidade das pontuações obtidas. Para mais, destaca-se que as moléculas remanescentes após o ponto de corte apresentaram valores de QFIT igual ou superior ao dos inibidores utilizados para a validação dos modelos.

Dos compostos remanescentes, 105 substâncias foram descartadas/discriminadas das etapas subsequentes por possivelmente apresentarem requisitos de reconhecimento da enzima humana, uma vez que pontuaram junto ao modelo de *HsDHFR*. Esse procedimento visa evitar a priorização de compostos para testes biológicos que apresentem no futuro problemas com seletividade frente a enzima humana e, conseqüentemente, na ocorrência de eventos adversos indesejáveis pela sua modulação.

Através dessa abordagem, foi possível identificar 254 moléculas com requisitos estereo-eletrônicos para se ligar seletivamente à *LcDHFR*. Todavia, estas estratégias não garantem que as moléculas priorizadas não possuam problemas farmacocinéticos em organismo humano, principalmente com relação a biodisponibilidade, bem como não predizem a segurança para o uso em seres humanos. Isso demonstra a necessidade de aplicação de filtros adicionais visando remover moléculas potencialmente problemáticas com relação a essas questões.

5.2 Filtro físico-químico, toxicológico e disponibilidade comercial

No contexto do desenvolvimento de medicamentos, estudos pré-clínicos e de fase clínica (I, II e III) são empregados com a finalidade de avaliar a efetividade e segurança de compostos inovadores, antes de sua efetiva comercialização. Contudo, este processo é deveras longo, complexo e de alto custo, podendo ser necessário despende de até 2,6 bilhões de dólares para a que o novo fármaco chegue ao mercado (DICKSON, GAGNON, 2004; MULLIN, 2014).

Estratégias que visam a identificação de propriedades toxicológicas e físico-químicas antes de etapas que predizem padrões de ligação intermolecular podem ser úteis na redução de compostos com possíveis problemas de biodisponibilidade por via oral e segurança e, portanto, reduzindo o custo para as etapas subsequentes.

Dentre os principais preditores de toxicidade, o servidor Pkcsm (PIRES, BLUNDELL, ASCHER, 2015; <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/>) foi utilizado com o intuito de prever o potencial de cardiotoxicidade (inibidores de herG e/ou herG II), hepatotoxicidade (capacidade de causar lesão hepática), mutagenicidade e genotoxicidade (teste de AMES).

Já o Aggregator Advisor (IRWIN *et al.*, 2015; <http://advisor.bkslab.org/>) foi empregado para prever a potencialidade dos compostos em apresentarem características promíscuas (capacidade de agregar com diversas outras moléculas de forma inespecífica) (CASTILHO, 2017; IRWIN *et al.*, 2015).

A exclusão de metabólitos potencialmente tóxicos poderá economizar recursos financeiros a serem empregados para o desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que poderão ser priorizadas àquelas substâncias que não apresentem riscos de causar danos no organismo humano, bem como melhor resultados de segurança em estudos posteriores (CASTILHO, 2017; DICKSON, GAGNON, 2004; MULLIN, 2014).

Assim, a predição da toxicidade de compostos, o cálculo dos descritores físico-químicos de moléculas que possuem requisitos estereo-eletrônicos frente a LcDHFR busca prever a capacidade de permeabilidade desses compostos pelas membranas biológicas humanas, a fim de garantir uma melhor absorção do fármaco no organismo. Nessa perspectiva, o servidor Swissadme (DAINA, MICHIELIN, ZOETE, 2017; <http://www.swissadme.ch/>) foi utilizado para prever sua biodisponibilidade por via oral.

Para tal, um ligante será promissor se o peso for inferior a 500 Da, se houver $c\text{Log } P$ for menor que 5, possuir menos de 5 pontos doadores de ligação de hidrogênio (HBD) (ex: OH, NH, etc), $\text{TPSA} < 140 \text{ \AA}$ e apresentar menos de 10 pontos aceitadores de ligação de hidrogênio (HBA) (ex: N, O, etc) (LIPINSKI *et al.*, 2001; VEBER, *et al.*, 2002; WERTERMAIER, BARRIL, SCAPOZZA, 2015).

Após a aplicação do filtro de toxicidade, de 254 compostos priorizados na etapa de Triagem virtual por modelo farmacofórico, 40 não possuíram penalidades e foram avaliadas quanto a disponibilidade comercial. Em seguida, dos 40, 27 compostos apresentaram disponibilidade comercial para aquisição e foram submetidos ao filtro físico-químico (Quadro 6).

Quadro 6 - Filtros físico-químicos e disponibilidade comercial e valor de aquisição

Molécula	Massa molecular (Da)	Área de superfície polar topológica (TPSA)	Pontos doadores de ligação de hidrogênio (HBD)	Pontos aceitadores de ligação de hidrogênio (HBA)	Coefficiente de partição octanol-água (cLoP)	Valor (R\$)
SUB1	126,12	97,79 Å	3	2	-0,85	R\$657,00
SUB2	191,53	112,06 Å	2	6	0,09	R\$657,00
SUB3	263,38	44,37 Å	2	2	2,75	R\$329,00
SUB4	270,28	78,43 Å	3	4	1,96	R\$657,00
SUB5	270,28	78,43 Å	3	3	1,99	R\$657,00
SUB6	320,29	82,26 Å	4	4	2,48	R\$329,00
SUB7	353,20	82,26 Å	4	2	2,98	R\$329,00
SUB8	234,34	41,13 Å	2	1	2,87	R\$329,00
SUB9	354,68	132,77 Å	2	6	1,76	R\$329,00
SUB10	249,31	70,23 Å	3	2	2,02	R\$329,00
SUB11	236,27	82,26 Å	4	2	0,99	R\$657,00
SUB12	340,16	90,46 Å	4	3	2,98	R\$329,00
SUB13	340,16	90,46 Å	4	3	2,94	R\$329,00
SUB14	373,71	90,46 Å	4	6	3,45	R\$329,00
SUB15	295,16	41,13 Å	2	1	3,81	R\$329,00
SUB16	205,04	55,12 Å	2	1	2,02	R\$657,00
SUB17	280,71	63,50 Å	2	3	2,22	R\$329,00
SUB18	319,74	90,46 Å	4	3	2,50	R\$329,00
SUB19	339,80	109,67 Å	3	4	2,04	R\$329,00
SUB20	291,73	63,25 Å	2	3	2,23	R\$329,00
SUB21	276,72	61,36 Å	3	2	2,87	R\$329,00
SUB22	239,49	55,12 Å	2	1	2,42	R\$329,00
SUB23	268,74	47,61 Å	2	3	1,42	R\$329,00
SUB24	288,32	122,46 Å	3	4	1,63	R\$329,00

Fonte: Autor

Dentre as 27 moléculas submetidas ao filtro físico-químicos, 24 compostos remanescentes possuíram requisitos de permeabilidade obedecendo a massa molecular menor que 446,63 Da ($MM \leq 500$ Da), área de superfície polar entre 41,13 Å e 132,77 Å ($TPSA \leq 140$ Å), coeficiente de partição octanol-água entre -0,85 e 3,81 ($cLogP \leq 5$), possuir menos de 7 pontos aceitadores de ligação de hidrogênio ($HBA \leq 10$) e menos de 4 pontos doadores de ligação de hidrogênio ($HBD \leq 5$). Também foram avaliadas quanto ao potencial dessas 24 moléculas em se caracterizarem como agregadores, contudo, nenhuma foi desclassificada por apresentar promiscuidade. Ou seja, as substâncias remanescentes não exibem perfil para se agregar de forma inespecífica a diversas outras moléculas, e conseqüentemente ocasionar efeitos colaterais (IRWIN *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018; TAVARES, ALVES, BORGES, 2020).

Embora os compostos identificados até o momento apresentem as características preditas desejáveis referidas acima, não se tem informações sobre seu provável modo de ligação das moléculas ao seu alvo farmacológico. Nesse sentido, a técnica do acoplamento molecular foi utilizada no intuito de prever o modo de ligação dos compostos melhores ranqueados no sítio catalítico da LcDHFR.

5.3 Acoplamento molecular na LcDHFR-TS

Ensaio de acoplamento molecular requerem a estrutura do alvo/receptor farmacológico para simular sua interação com os ligantes em estudo. Entretanto, não existe uma estrutura cristalográfica da LcDHFR-TS disponível, por exemplo no Protein Data Bank, que possa ser utilizada para essa análise. Para contornar o problema, procedeu-se com a predição da estrutura 3D da LcDHFR-TS por métodos teóricos de modelagem por homologia.

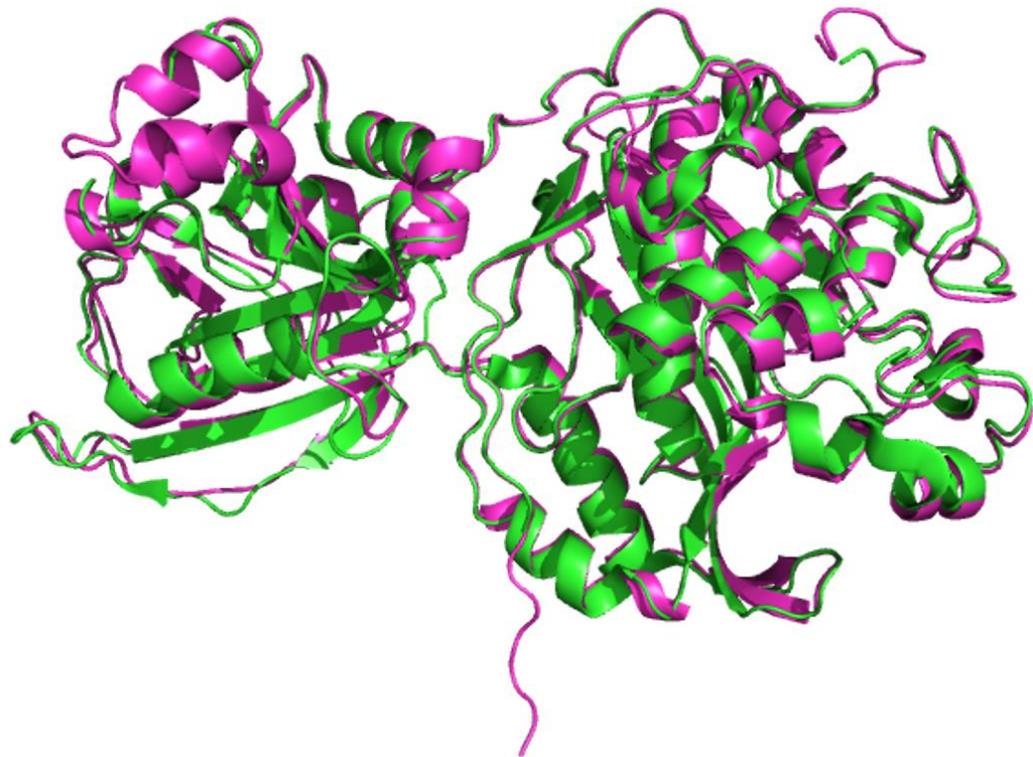
5.3.1. Construção e avaliação do modelo de LcDHFR-TS

Com base nos princípios de conservação de função biológica da DHFR-TS em organismos diferentes, a sequência primária da LcDHFR-TS possui uma identidade sequencial de 67,3 % e 48,0 % em relação a DHFR-TS de *T. cruzi* e *T. brucei*, respectivamente. Dessa forma, as estruturas analisadas possuem mais de 30 % de identidade sequencial e, portanto, são homólogas (KRISSINEL, 2007).

Para a realização da construção do modelo por homologia, o programa MODELLER 9.18 (WEBB, SALI, 2016) foi utilizado no intuito de alinhar de forma múltipla a sequência primária da *LcDHFR-TS* com os dobramentos tridimensionais das estruturas *TcDHFR-TS* e *TbDHFR* e, portanto, reproduzir os dobramentos tridimensionais das regiões evolutivamente conservadas. Adicionalmente, o método do Alinhamento de Múltiplas Sequências (do inglês, *Multiple Sequence Alingment - MSA*) implementado no MODELLER possui significância estatística e é capaz de indicar a similaridade global (WEBB, SALI, 2016).

Com base na dinâmica do alinhamento de múltiplas sequências implementado no MODELLER (WEBB, SALI, 2016), foi gerado um modelo de estrutura tridimensional de *L. chagasi* (Figura 19).

Figura 19 – Modelo de DHFR-TS de *L. chagasi* (roxa) sobreposta ao molde 3KJS (verde) gerado no programa PyMOL



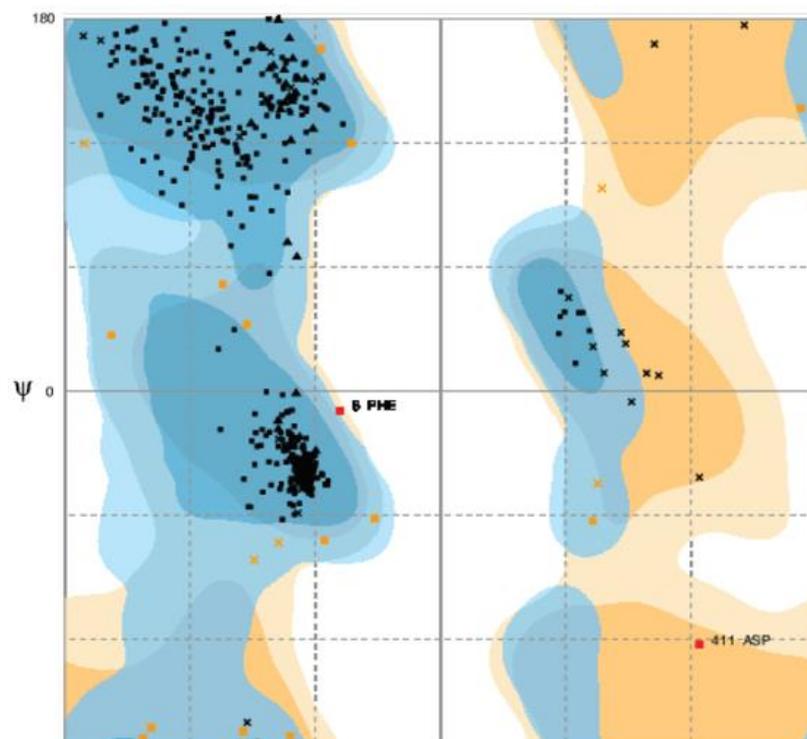
Fonte: Autor

Com o objetivo de validar o modelo gerado, foi utilizada a pontuação de QMEAN, a qual avalia a qualidade dos modelos através de estimativas de erro da estrutura global e local da proteína. Neste sentido, valores de QMEAN próximo a zero indicam boa concordância entre a estrutura do modelo e os moldes, enquanto

modelos de baixa qualidade normalmente têm pontuação de -4,0 ou inferior (BENKERT, TOSATTO, SCHOMBURG, 2008). O modelo por homologia selecionado possui valor de QMEAN = -0,79, apresentando poucos erros globais e locais ao se comparar com os moldes (PDB 3KJS e 3QFX).

Adicionalmente, para uma análise dos resíduos que estão em zonas energeticamente favoráveis e desfavoráveis, foi utilizado o Diagrama de Ramachandran através do servidor SAVES v. 6.0 (COLOVOS, YEATES, 1993; <https://saves.mbi.ucla.edu/>) com o intuito de avaliar a qualidade dos resíduos do modelo em comparação ao molde (Figura 20).

Figura 20 – Diagrama de Ramachandran da estrutura LcDHFR-TS gerado através do servidor SAVES. Número de resíduos na região favorecida: 498 (96,1%); Número de resíduos na região permitida: 18 (3,5%); Número de resíduos na região atípica: 2 (0,4%)

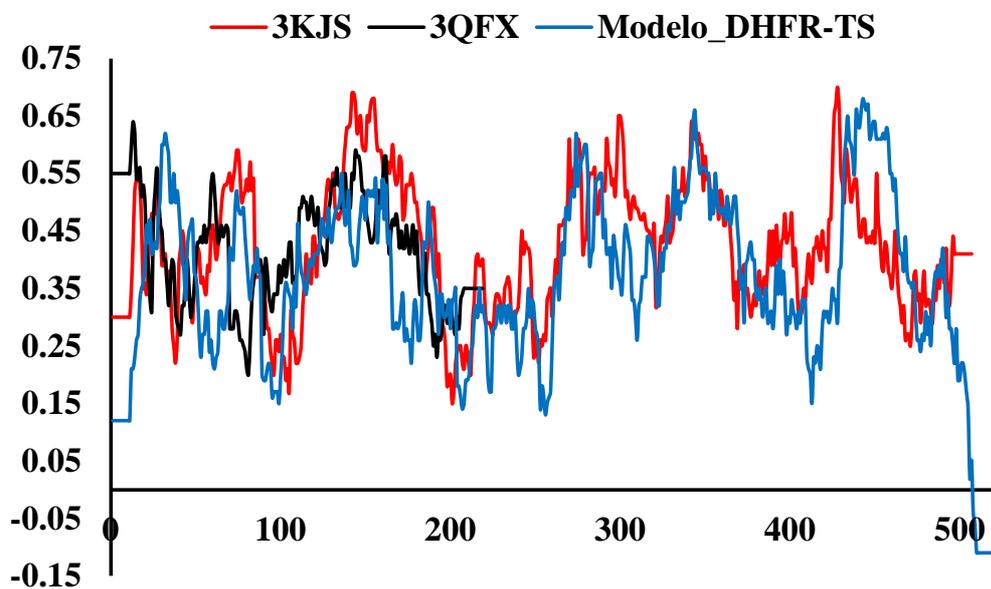


Fonte: Autor

Apesar do gráfico de Ramachandran ser uma boa métrica para avaliar a qualidade estereoquímica do modelo, o mesmo não é suficiente para validação. Logo, o modelo também foi analisado em relação à compatibilidade da sequência em relação ao enovelamento proteico adotado através do servidor VERIFY 3D

(EISENBERG, LUTHY, BOWIE, 1997). Neste sentido, a pontuação 3D-1D (Figura 21) é utilizada para avaliar se a posição de cada resíduo está de acordo com sua ocorrência esperada. Portanto, os resíduos que não se encontram em sua localização preferencial recebem uma menor pontuação, podendo ser identificados através de uma análise gráfica de sua pontuação 3D-1D, em função do número de sua sequência primária (FREITAS, 2011).

Figura 21 – Modelo de DHFR-TS de *L. chagasi* (azul) sobreposta aos moldes 3KJS (vermelho) e 3QFX (preto) no programa VERIFY 3D



Fonte: Autor

É possível avaliar a compatibilidade entre o modelo estrutural (3D) e a sequência primária de aminoácidos (1D) da proteína com o objetivo de obter informações acerca de erros no enovelamento geral ou local da proteína alvo através da geração do gráfico de 3D-1D. Neste sentido, sequências de valores abaixo de zero representam regiões cujos resíduos não se encontram em ambiente correto, decorrendo em enovelamento incorreto. Já valores acima de 0,20 indicam que os resíduos se encontram favoravelmente dispostos entre si, demonstrando em enovelamento correto (FREITAS, 2017). O modelo construído para a *LcDHFR-TS* apresenta valores positivos de pontuação 3D-1D, sugerindo que o enovelamento gerado é compatível com a sequência primária empregada. Foi encontrado que 89,62% dos resíduos de *LcDHFR-TS*, 96,47% de 3KJS e 100% de 3QFX se

apresentam em valores acima de 0,20, portanto, apresentam enovelamento com qualidade estereoquímica aceitável e enovelamento compatível. Partindo desses pressupostos, a estrutura tridimensional de LcDHFR-TS adotou o enovelamento observado no modelo por homologia.

5.3.2. Avaliação dos parâmetros de busca do acoplamento molecular

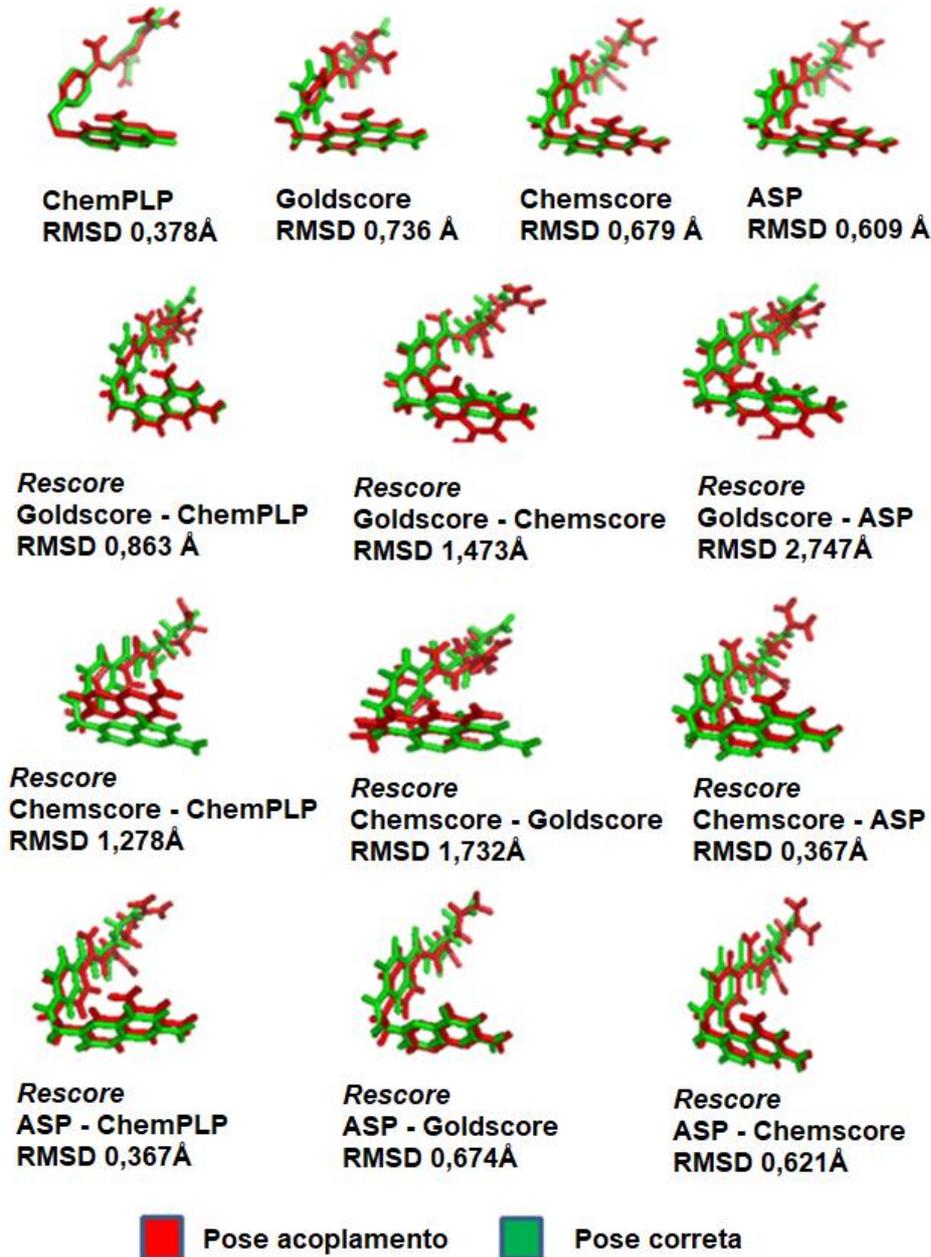
De posse da estrutura do receptor, procedeu-se com as análises de acoplamento molecular dos compostos obtidos na triagem virtual frente a LcDHFR-TS. Previamente, fez-se necessário definir os parâmetros de busca para solução do acoplamento que fossem mais adequados ao sistema em estudo. Tais parâmetros definem a predição da afinidade e geometria de interação de uma substância junto ao receptor.

A avaliação da eficácia do programa em identificar a corretamente a pose biológica do composto frente ao seu sítio ativo, o valor de RMSD do reacoplamento do seu substrato foi considerado. Tal métrica caracteriza-se pela medida quantitativa da similaridade entre duas coordenadas atômicas sobrepostas (FONSECA, 2020). São considerados como bons resultados valores de RMSD igual ou inferior a 2,0 Å em relação a pose de partida (MIZUTANI *et al.*, 2016).

Todas as quatro funções (ChemPLP, Goldscore, ChemScore e ASP) foram capazes de identificar a pose biológica da estrutura do substrato (DHF) junto à LcDHFR-TS, apresentando valores de RMSD menores que 0,8 Å (Figura 22). A fim de aprimorar a acurácia dos critérios de pontuação para o acoplamento molecular, o *rescore* foi empregado para as quatro funções de pontuação do programa GOLD 5.3 (GOLD, 2008). Tal procedimento permite que as melhores poses sugeridas possam ser automaticamente pontuadas por outra função de pontuação.

Foi possível identificar que a função de *rescore* Goldscore-ASP possuiu RMSD superior a 2 Å (Figura 22), o que demonstrou baixa predição, logo, foi descartada do estudo. As demais análises de *rescore* apresentaram valores de RMSD < 2 Å. Para definir a melhor função dentre as que apresentaram valores adequados de RMSD, procedeu-se com a avaliação da capacidade de recuperação de ativos em detrimento de *decoys* através da análise da curva ROC e valores de AUC (GIGLIARANO; FIGINI; MULIERE, 2014; VANAGAS, 2004).

Figura 22 - Valores de RMSD das funções de pontuação do programa GOLD 5.3 e seus *rescores*. As poses de acoplamento e biológica do DHF estão representadas em vermelho e verde, respectivamente.

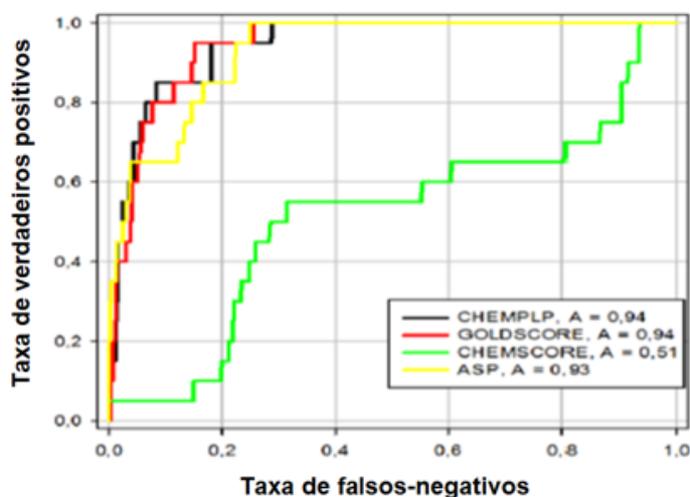


Fonte: Autor

A capacidade de recuperação de ativos foi analisada por meio dos valores de AUC obtidos a partir da curva ROC, em que foram encontrados como resultados os valores de 0,9 para três das quatro funções avaliadas (Figura 23), além de três *rescores* da função ASP (Figura 24). Valores de AUC de 0,9 indicam excelente capacidade de predição para os verdadeiros positivos. Como a função Chemscore

apresentou AUC insuficiente (0,51), não se avaliou o perfil de predição do *rescore* dessa função. Destaca-se que valores de AUC de 0,5 indicam capacidade insuficiente de poder discriminatório (CASTILHO, 2017; FONSECA, 2020; MARTINEZ, LOUZADA-NETO, PEREIRA, 2003; SHEPPHIRD, CLARK, 2006).

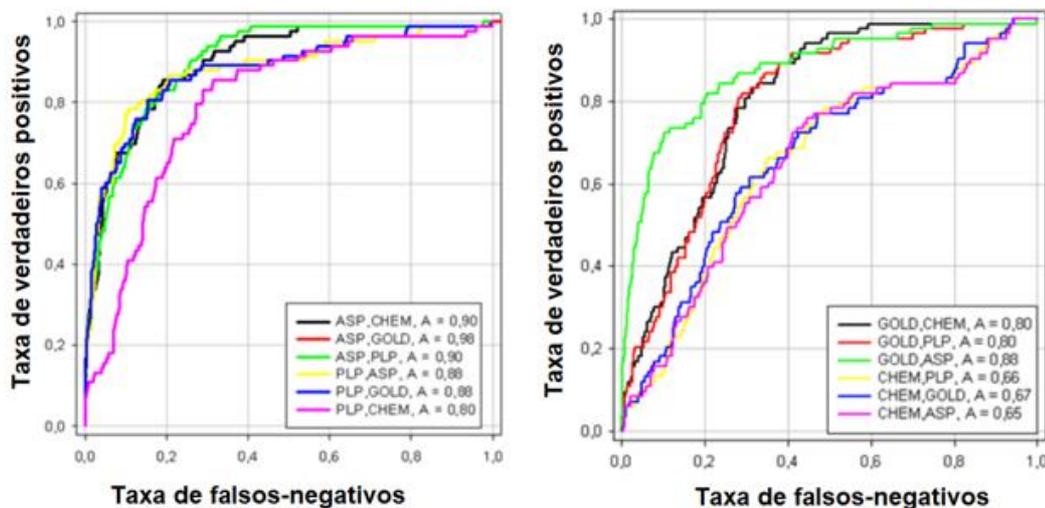
Figura 23 - Curva ROC de discriminação entre inibidores da DHFR e *decoys* pelas funções de pontuação do programa GOLD 5.3



Curva ROC das funções de pontuação de LcDHFR-TS alinhados com um banco de moléculas contendo 1.000 ativos e 50.000 *decoys*

Fonte: Autor

Figura 24 - Curva ROC de discriminação entre inibidores da DHFR e *decoys* pelos *rescores* das funções de pontuação do programa GOLD 5.3.



Curva ROC das funções de *rescore* de LcDHFR-TS alinhados com um banco de moléculas contendo 1.000 ativos e 50.000 *decoys*

Fonte: Autor

Adicionalmente a curva ROCs, os *rescores* foram avaliados quanto a taxa de enriquecimento encontrada a partir da potencialidade em identificar ativos em detrimento de *decoys* na porção inicial do banco de compostos triado, a exemplo dos 10% de compostos melhores ranqueados (Equação 2) (Quadro 7). Neste sentido, observa-se que ASP-Goldscore se apresentou como a melhor função de *rescore* capaz de identificar a pose de biológica de compostos frente à LcDHFR-TS, e excelente potencial em discriminar compostos ativos em detrimento de falsos positivos (AUC > 0,9 e taxa de enriquecimento de 20%). Portanto, a função ASP-Goldscore foi selecionada para a realização da triagem por acoplamento molecular.

Quadro 7 – Recuperação de compostos ativos das funções do programa GOLD 5.3

Funções de pontuação/Rescore	Ativos	% Fator de enriquecimento
ChemPLP	17	17%
Chemscore	1	1%
ASP	13	13%
ASP/Chemscore	16	16%
ASP/Goldscore	20	20%
ASP/ChemPLP	13	13%
ChemPLP/ASP	17	17%
ChemPLP/Goldscore	14	14%
ChemPLP/Chemscore	9	9%
Goldscore/Chemscore	11	11%
Goldscore/ChemPLP	10	10%
Goldscore/ASP	17	17%
Chemscore/ChemPLP	2	2%
Chemscore/Goldscore	1	1%
Chemscore/ASP	1	1%

Fonte: Autor

5.3.3. Triagem virtual por acoplamento molecular

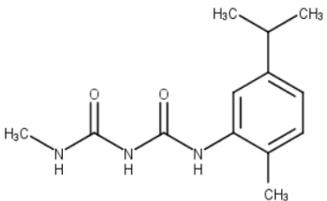
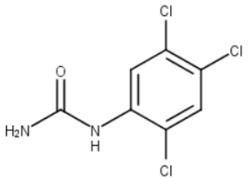
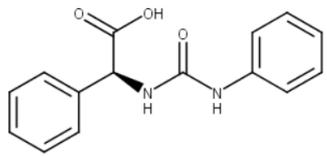
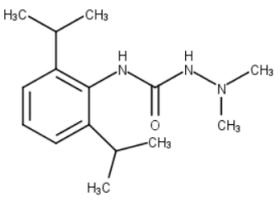
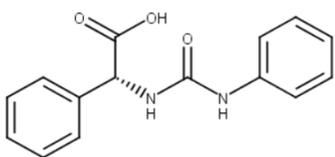
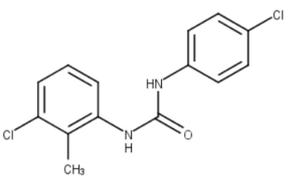
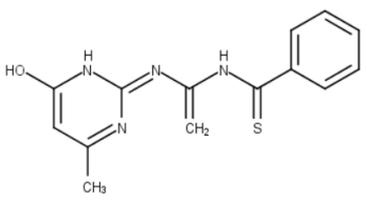
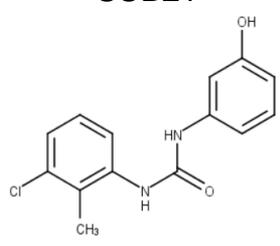
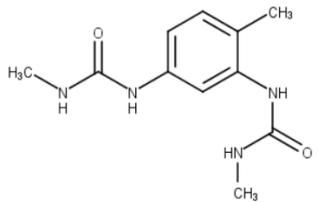
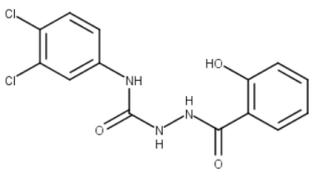
O acoplamento molecular é uma técnica baseada no receptor utilizada para aumentar a taxa de sucesso na identificação de potenciais compostos bioativos através da predição dos modos de ligação de uma molécula no sítio de ligação e a respectiva afinidade de ligação ao alvo farmacológico (SANTANA, 2016; TELES, 2016).

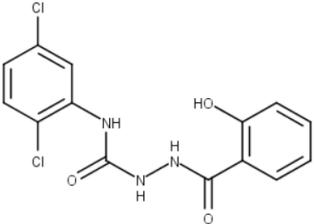
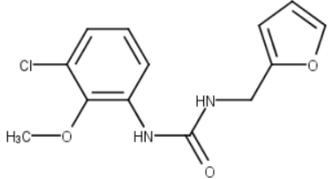
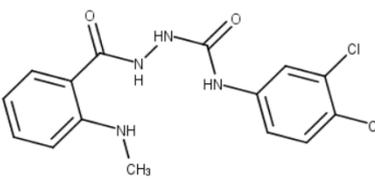
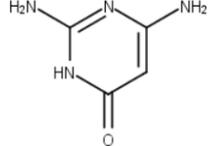
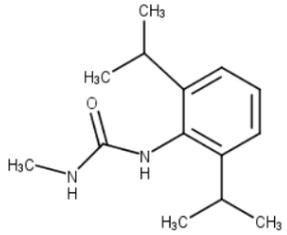
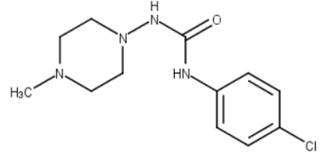
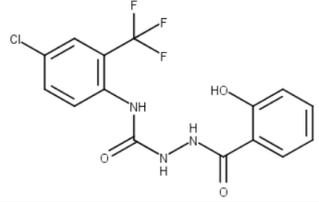
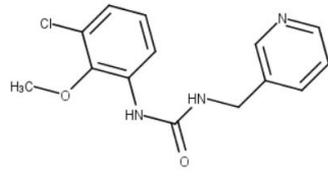
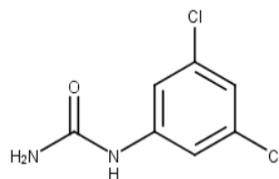
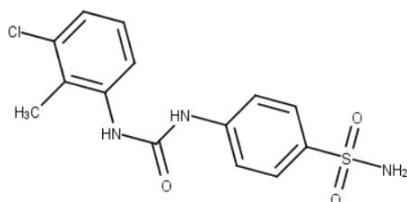
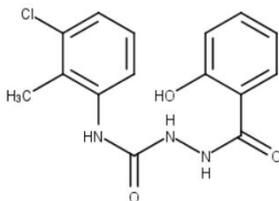
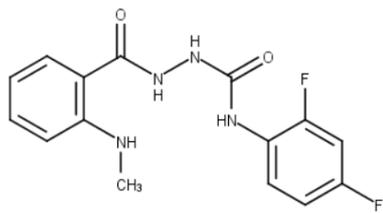
Dessa forma, esta técnica pode ser aplicada para selecionar as moléculas com maior afinidade a LcDHFR filtradas nas etapas de triagem virtual por

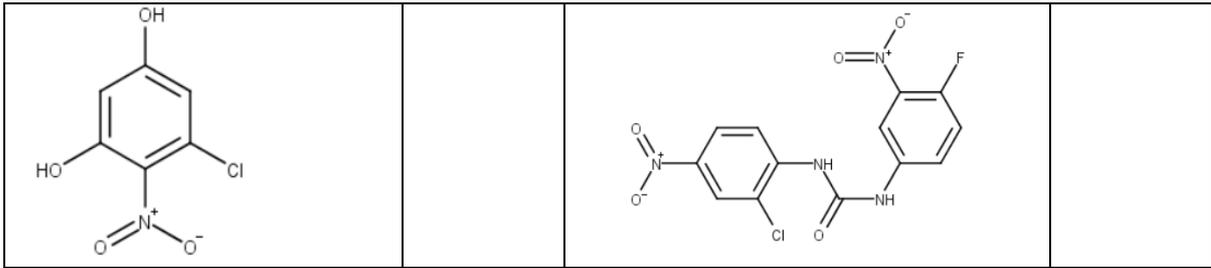
modelos farmacofóricos e filtros toxicocinéticos, e aumentar a taxa de sucesso da triagem virtual.

Com base na utilização nos parâmetros definidos na etapa anterior, a pontuação dos 24 compostos selecionados na TVBL foi calculada através da função ASP/Goldscore implementada no programa GOLD 5.3 (GOLD, 2008) (Quadro 8).

Quadro 8 – Pontuação dos compostos junto ao programa GOLD 5.3

Molécula	Fitness Goldscore	Molécula	Fitness Goldscore
<p>SUB10</p> 	43,91	<p>SUB22</p> 	43,67
<p>SUB5</p> 	41,79	<p>SUB3</p> 	41,25
<p>SUB4</p> 	41,23	<p>SUB15</p> 	40,71
<p>SUB24</p> 	38,32	<p>SUB21</p> 	38,19
<p>SUB11</p> 	38,06	<p>SUB13</p> 	37,32
<p>SUB12</p>	36,59	<p>SUB17</p>	36,55

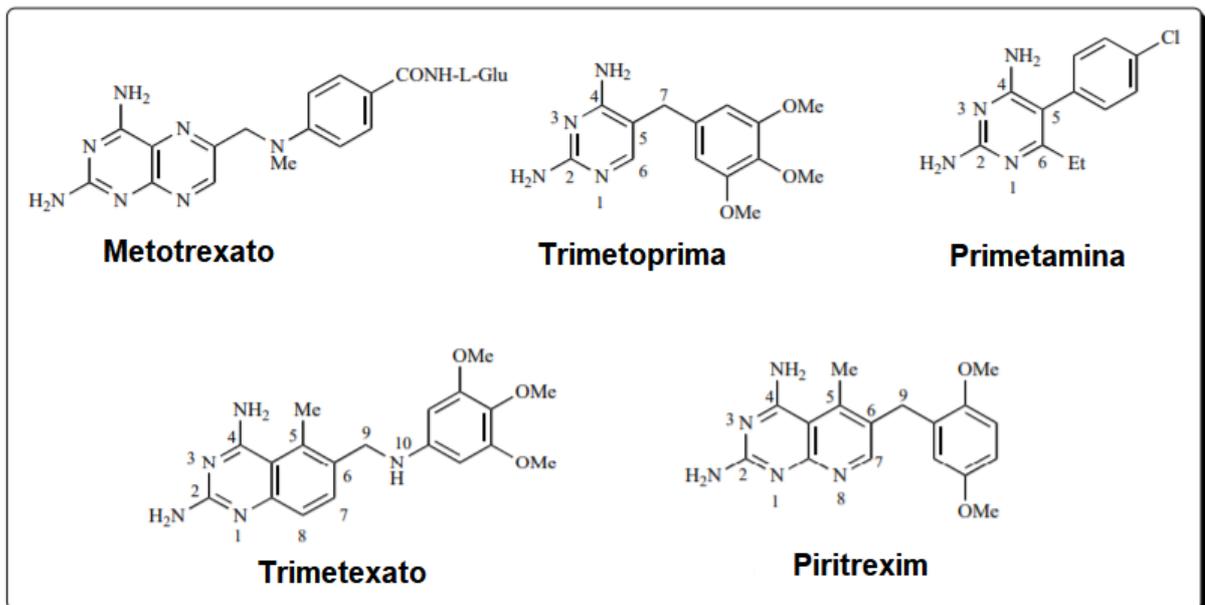
			
SUB7 	36,51	SUB1 	35,58
SUB8 	35,29	SUB23 	34,95
SUB14 	34,86	SUB20 	33,90
SUB16 	33,40	SUB19 	32,58
SUB18 	32,01	SUB6 	30,50
SUB2	30,28	SUB9	23,94



Fonte: Autor

Gangjee, Kurup e Namjoshi (2007) apontaram compostos já utilizados na prática clínica, cujo mecanismo de ação corresponde à inibição da DHFR (Figura 25). Neste sentido, as moléculas identificadas através da TV apresentaram em suas estruturas químicas características com similaridade à compostos já descritos na literatura. Observa-se que as substâncias priorizadas possuem em suas constituições obrigatoriamente a presença de anéis aromáticos e grupamentos nitrogenados, a exemplo de aminas e amidas, também encontradas nos inibidores de DHFR (ex: metotrexato e primetamina). Outras características a serem destacadas é a presença de átomos de oxigênio em sua composição, possibilitando juntamente com os compostos nitrogenados a realização de interações de hidrogênio (ex: trimetoprima e trimetexato).

Figura 25 – Inibidores de DHFR disponíveis comercialmente



Fonte: Adaptado de GANGJEE, KURUP, NAMJOSHI, 2007

Para mais, algumas das substâncias encontradas na TV apresentam o anel pteridínico, característico das aminopirimidinas, grupamentos estes característicos dos cinco inibidores disponíveis comercialmente. Adicionalmente, encontrou-se também a presença de heteroátomos nos compostos priorizados, em especial átomos de cloro, também encontrados na primetamina.

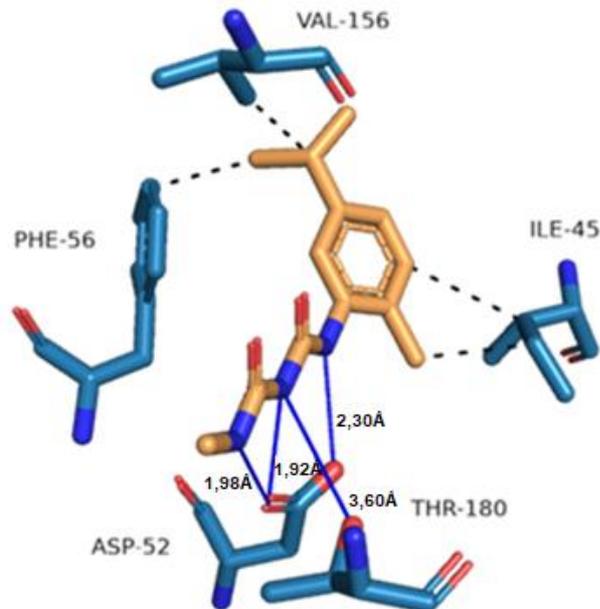
5.3.4 Caracterização das interações dos compostos priorizados na Triagem Virtual junto à LcDHFR-TS

A fim de ilustrar o modo de interação das duas moléculas melhor ranqueadas pelo acoplamento molecular (SUB10 e SUB22), as estruturas dos complexos formados pela LcDHFR e as substâncias SUB10 e SUB22 foram inspecionadas visualmente com auxílio do programa PLIP (ADASME, *et al.*, 2021; <https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>).

A observação das interações dos compostos melhor pontuados evidencia que a presença de derivados aromáticos de massa molecular pequena, com grupos químicos polares com características aceptoras/doadoras de interação de hidrogênio e capazes da realização de interações hidrofóbicas e de halogênio constitui um importante requisito para a priorização de moléculas que sejam capazes de inibir a LcDHFR-TS. Curiosamente, este padrão químico está relacionado a inibidores conhecidos da LcDHFR (HARDY *et al.*, 1997; GILBERT, 2002; PEZ *et al.*, 2003; KHABNADIDEH *et al.*, 2005; GANGJEE, NAMJOSHI, 2007; TEXEIRA *et al.*, 2019; SHARMA, BHARATAM, 2020).

O composto SUB10 (Figura 26) realiza três interações de hidrogênio (aceitador) com o resíduo ASP-52 (doador), uma interação de hidrogênio com o resíduo THR-180 (aceitador) e interações hidrofóbicas com os resíduos PHE-56, ILE-45 e VAL-156.

Figura 26 – Mapa de interação da SUB10 junto ao sítio ativo da LcDHFR-TS

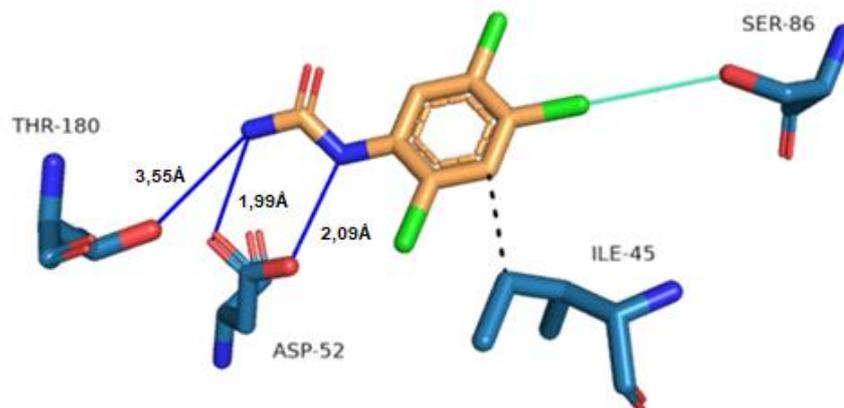


As estruturas se encontram em bastão. Resíduos: Carbonos então em cor azul claro. Nitrogênios estão em cor azul escuro. Oxigênios estão em cor vermelha; Ligante: Carbonos estão em laranja. Nitrogênios estão em azul escuro. Oxigênios estão em vermelho; Interações: Interações de hidrogênio estão em linhas retas azul escuro. Interações hidrofóbicas estão em linhas tracejadas na cor preta.

Fonte: Autor

Já o composto SUB22 (Figura 27) realiza duas interações de hidrogênio com o resíduo ASP-52 (doador), uma interação de hidrogênio com o resíduo THR-180 (aceitador), uma ligação de halogênio (aceitador) e uma interação hidrofóbica com a ILE-45.

Figura 27 – Mapa de interação da SUB22 junto ao sítio ativo da LcDHFR-TS

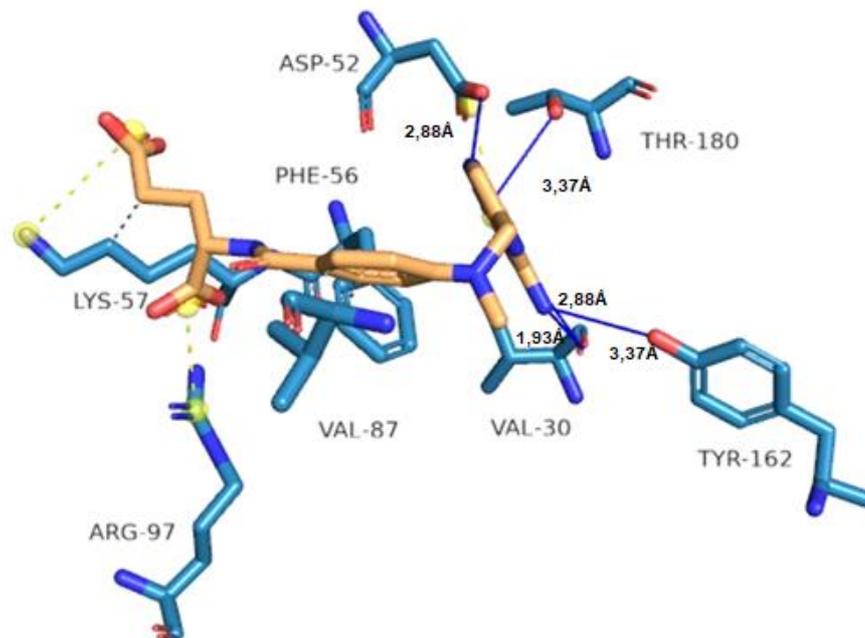


As estruturas se encontram em bastão. Resíduos: Carbonos então em cor azul claro. Nitrogênios estão em cor azul escuro. Oxigênios estão em cor vermelha; Ligante: Carbonos estão em laranja. Nitrogênios estão em azul escuro. Oxigênios estão em vermelho. Cloros estão em verde; Interações: Interações de hidrogênio estão em linhas retas azul escuro. Interações hidrofóbicas estão em linhas tracejadas na cor preta. Interações halogênicas estão em linhas retas na cor verde.

Fonte: Autor

Quando os mapas de interação das moléculas melhor pontadas são comparados com as interações realizadas com o metotrexato (inibidor da enzima DHFR) (Figura 28) percebe-se que este realiza cinco interações de hidrogênio com os resíduos VAL-30 (aceitador), ASP-52 (aceitador), TYR-162 (doador) e THR-180 (aceitador). Além disso, é observado a presença de três interações iônicas com os resíduos ASP-52, LYS-57 e ARG-97, além de interações hidrofóbicas com os resíduos PHE-56, LYS-57, VAL-87.

Figura 28 – Mapa de interação do metotrexato junto ao sítio ativo da LcDHFR-TS



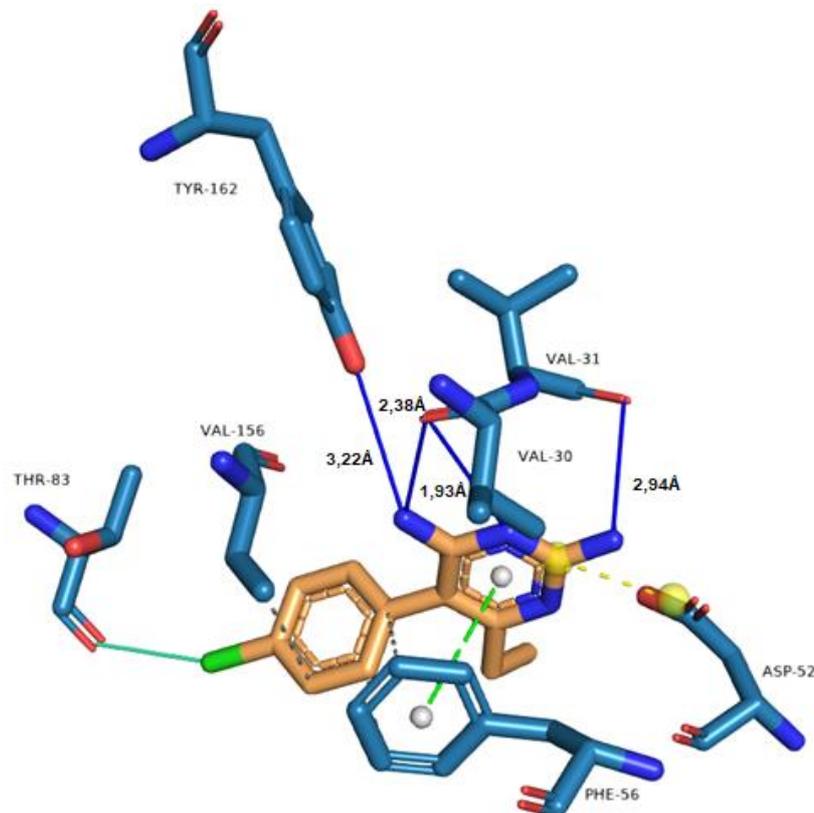
As estruturas se encontram em bastão. Resíduos: Carbonos então em cor azul claro. Nitrogênios estão em cor azul escuro. Oxigênios estão em cor vermelha; Ligante: Carbonos estão em laranja. Nitrogênios estão em azul escuro. Oxigênios estão em vermelho; Interações: Interações de hidrogênio estão em linhas retas azul escuro. Interações hidrofóbicas estão em linhas tracejadas na cor preta. Pontes salinas estão em linhas tracejadas na cor amarela.

Fonte: Autor

Já quanto à comparação frente a primetamina (GANGJEE, KURUP, NAMJOSHI, 2007) (Figura 29) observa-se que esta realiza quatro interações de

hidrogênio com os resíduos VAL-30 (aceitador), VAL-31 (aceitador) e TYR-162 (doador). Além disso, encontra-se uma interação iônica com o resíduo ASP-52, três interações hidrofóbicas com os resíduos PHE-56 e VAL-156, uma interação halogênica com o resíduo TYR-83 e uma interação do tipo π com o resíduo PHE-56.

Figura 29 – Mapa de interação a primetamina junto ao sítio ativo da LcDHFR-TS



As estruturas se encontram em bastão. Resíduos: Carbonos então em cor azul claro. Nitrogênios estão em cor azul escuro. Oxigênios estão em cor vermelha; Ligante: Carbonos estão em laranja. Nitrogênios estão em azul escuro. Oxigênios estão em vermelho; Interações: Interações de hidrogênio estão em linhas retas azul escuro. Interações hidrofóbicas estão em linhas tracejadas na cor preta. Pontes salinas estão em linhas tracejadas na cor amarela. Interações halogênicas estão em linhas retas na cor verde. Interações de empalhamento π estão em linhas tracejadas na cor verde.

Fonte: Autor

A partir da análise dos mapas de interação do metotrexato e da primetamina, substâncias reconhecidas na literatura como inibidoras da DHFR (GANGJEE, KURUP, NAMJOSHI, 2007), observa-se que a interação com dos resíduos ASP-52, PHE-56, TYR-162, VAL-30 se mostraram essenciais para o reconhecimento dos ligantes pelo alvo.

Neste sentido, ambos os ligantes SUB10 e SUB22 apresentaram capacidade de realização de interações de hidrogênio com o resíduo ASP-52, em que o grupamento amida dos ligantes se apresentam como aceitadores de hidrogênio dos grupamentos ácido carboxílico ou hidroxila do resíduo ASP-52. Contudo, apesar do metotrexato realizar interação com este aminoácido, os resultados encontrados no acoplamento demonstram que este se encontra como doador da interação de hidrogênio, diferentemente ao apontado para os ligantes priorizados na TV.

Além disso, as substâncias SUB10 e SUB22 também realizam interação frente ao resíduo THR-180, os quais se apresentam como doadores de interação de hidrogênio ao ceder este átomo do seu grupamento amida para a carbonila do THR-180. Para mais, tal padrão de interação converge ao encontrado para o metotrexato, uma vez também se apresenta como doador de interação de hidrogênio para o este resíduo.

Além disso, a primetamina e o metotrexato realizam três interações hidrofóbicas cada um, este padrão de interação converge ao encontrado para os ligantes SUB10 e SUB22, que realizam quatro e uma interações hidrofóbicas, respectivamente. Para tal padrão de interação é importante destacar que dois compostos realizam interação hidrofóbica com o resíduo PHE-56, sendo estes primetamina e SUB10. Destaca-se que o ligante SUB22 também apresenta um padrão de interação similar à primetamina, os resultados de acoplamento molecular demonstraram que ambos são capazes de realizar interações halogênicas com o alvo.

Ante ao exposto, os dados obtidos indicam que os pontos hidrofóbicos e pontos de doação de interações de hidrogênio propostos pelo modelo farmacofórico de LcDHFR são requisitos essenciais para modulação da enzima, já os pontos aceitadores de interação de hidrogênio requisitos de potência. Além disso, tal padrão de pontos farmacofóricos apresentados pelo modelo se mostram alinhados com os encontrados em estruturas químicas de inibidores de DHFR descritos na literatura além dos utilizados para construção e validação do modelo (GANGJEE, KURUP, NAMJOSHI, 2007). Como exemplo, tem-se as substâncias com anéis pteridínicos em seu quimiotipo. Neste âmbito, os compostos identificados e priorizados no acoplamento molecular apresentam em sua constituição cadeias laterais com grupamentos nitrogenados que possivelmente possuem o mesmo padrão de interação que substâncias descritas como aminopirimidinas, e conseqüentemente, podem vir a compartilhar da mesma atividade biológica (HARDY *et al.*, 1997;

GILBERT, 2002; PEZ *et al.*, 2003; KHABNADIDEH *et al.*, 2005; GANGJEE, NAMJOSHI, 2007; TEXEIRA *et al.*, 2019; SHARMA, BHARATAM, 2020).

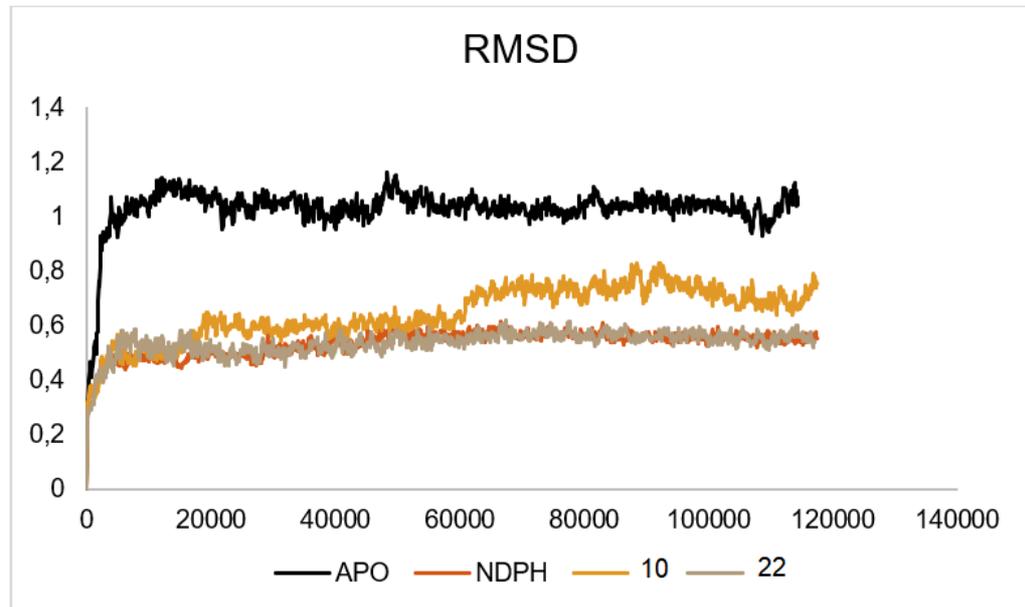
5.4 Dinâmica molecular

A DM é uma estratégia computacional com capacidade de simular o comportamento entre um ligante e uma proteína em um meio biológico, conferindo liberdade conformacional ao sistema e possibilitando a análise da estabilidade do complexo, bem como avaliar os dados dos modos de ligação entre o composto e o alvo (BONFIM, 2014; NANBA, SILVA, SILVA, 2008).

Contudo, a confiabilidade dos resultados gerados a partir das simulações de DM depende se um sistema se manteve estável durante sua trajetória. Através da análise do desvio médio quadrático (do inglês, *Root-Mean Square Deviation*) é possível verificar a estabilidade de um sistema, tendo em vista que este quantifica a variação das coordenadas atômicas do complexo, em relação à estrutura em sua pose de partida, ao longo da simulação.

Ante ao exposto, a forma APO da *LcDHFR-TS*, bem como seus complexos (*LcDHFR-TS:NADPH*, *LcDHFR-TS:NADPH:SUB10* e *LcDHFR-TS:NADPH-SUB22*), foram analisados quanto ao desvio das suas posições atômicas ao longo da trajetória da DM (Figura 30), o que demonstrou que todos os complexos se mantiveram estáveis em 60 ns - *LcDHFR-TS:NADPH* (RMSD = $0,56 \pm 0,03 \text{ \AA}$), *LcDHFR-TS:NADPH:SUB10* (RMSD = $0,73 \pm 0,04 \text{ \AA}$) e *LcDHFR-TS:NADPH-SUB22* (RMSD = $0,56 \pm 0,02 \text{ \AA}$), estes possuíram valores de RMSD menores que a forma APO (RMSD = $1,03 \pm 0,09 \text{ \AA}$), que se estabilizou em 20 ns. Ao se comparar com a forma APO, os complexos apresentaram valores de RMSD inferior, sugerindo que as interações intermoleculares entre os ligantes SUB10 e SUB22 e a *LcDHFR-TS* conferem estabilidade ao sistema.

Figura 30 – Representação gráfica do RMSD da cadeia principal da LcDHFR-TS na forma APO e complexos durante a DM

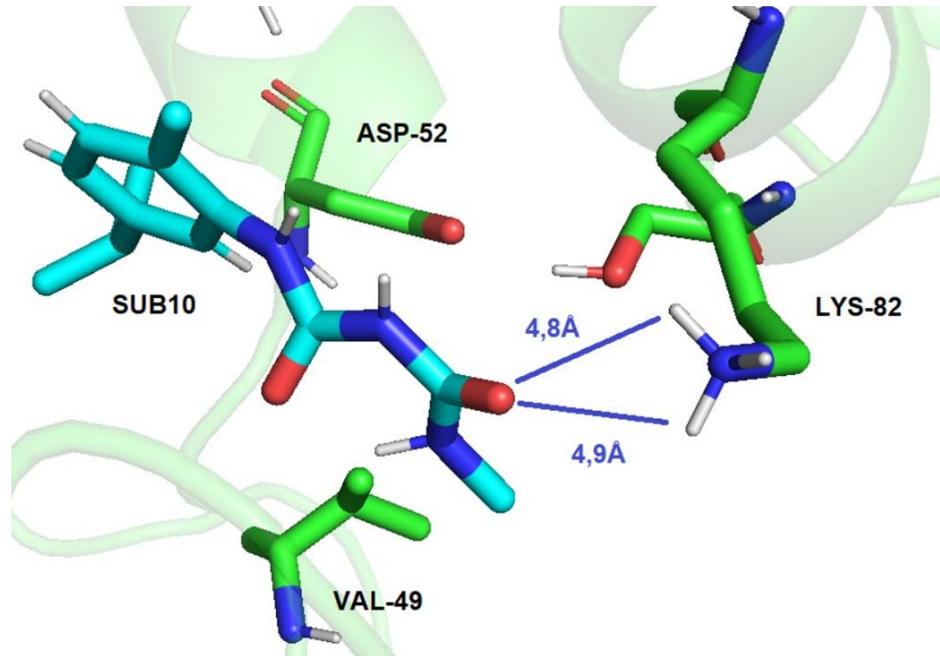


Fonte: Autor

O RMSD é considerado como uma métrica global da análise de estabilidade, contudo, a partir dela não é possível obter dados das interações entre os ligantes e a proteína. Logo, o módulo *g_hbond* foi utilizado para possibilitar verificar o tempo de permanência das interações de hidrogênio que ocorreram durante a simulação (MARKOVITCH, AGMON, 2008).

As simulações sugeriram que a SUB10 realiza interação de hidrogênio com o nitrogênio da LYS-82 por 56,09% do tempo da DM. Este dado diverge parcialmente ao apontado através do acoplamento molecular, uma vez que foi observado nesta estratégia interações de hidrogênio com os resíduos ASP-52 e TYR-180. Contudo, apesar das estratégias apontarem interações com diferentes resíduos, a interação de hidrogênio com a LYS-82 por um período acima de 50%, demonstra que provavelmente esta é a interação mais recorrente durante a DM, e portanto, pode ser uma interação importante que ocorra no meio biológico (Figura 31).

Figura 31 – Interações de hidrogênio entre a SUB10 e o resíduo LYS-82 no sítio ativo da LcDHFR-TS a partir da última pose da dinâmica de produção



As estruturas se encontram em bastão. Resíduos: Carbonos então em verde. Nitrogênios estão em cor azul escuro. Oxigênios estão em cor vermelha. Hidrogênios estão em cor branca; Ligante: Carbonos estão em azul claro. Nitrogênios estão em azul escuro. Oxigênios estão em vermelho; Hidrogênios estão em azul claro. Interações: Interações de hidrogênio estão em linhas retas azul escuro.

Fonte: Autor

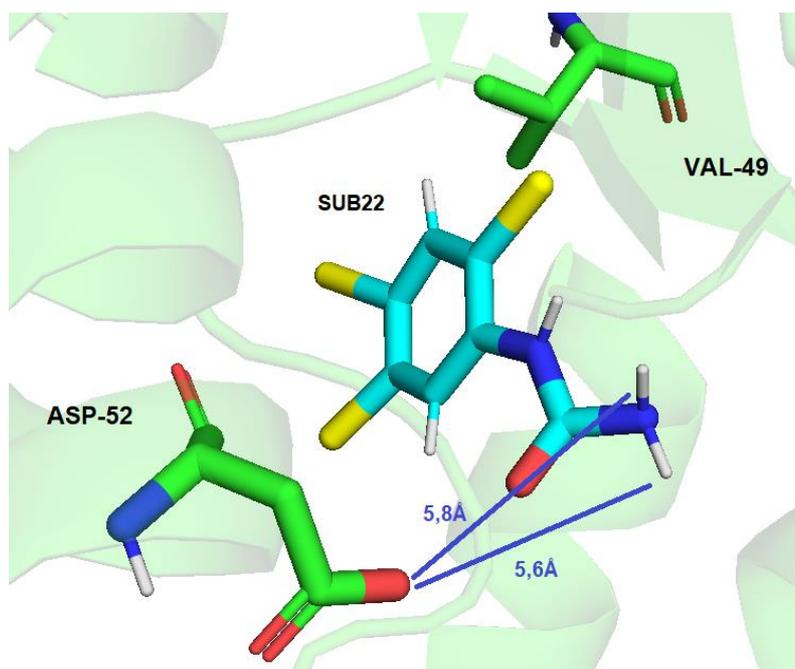
A diferença dos resultados encontrados por diferentes técnicas computacionais, se justifica pelo fato que as simulações de DM incorporam liberdade conformacional ao sistema, possibilitando a descoberta de poses não encontradas por outras estáticas, a medida em que as cadeias laterais da enzima se acomodam em resposta à permanência do ligante.

Para mais, afinidade entre o nitrogênio da cadeia lateral da SUB10 pelo hidrogênio doado pelo resíduo LYS-82 se assemelha à modalidade de interação entre os grupamentos aminos do anel pteridinico de compostos com atividade inibitória frente à DHFR já conhecidos (GANGJEE, KURUP, NAMJOSHI, 2007).

A SUB 22 apresentou tempo de permanência da interação de hidrogênio de 53,69 e 35,73% junto aos oxigênios do resíduo ASP-52, confirmando os resultados apontados pelo acoplamento molecular, tendo em vista que esta estratégia apontou interações de hidrogênio entre o ligante e o ASP-52. Contudo, a DM sugere que a SUB22 realiza a doação de ligações de hidrogênios das amins presentes na cadeia

lateral para o resíduo, o que se mostra divergente ao apontado pelo acoplamento, que sugere a doação de hidrogênios pelo ASP-52 para as aminas do ligante (Figura 32).

Figura 32 – Interações de hidrogênio entre a SUB22 e o resíduo ASP-52 no sítio ativo da *LcDHFR-TS* a partir da última pose da dinâmica de produção



azul escuro. Oxigênios estão em cor vermelha. Hidrogênios estão em cor branca; Ligante: Carbonos estão em azul claro. Nitrogênios estão em azul escuro. Oxigênios estão em vermelho; Hidrogênios estão em branco. Cloros estão em amarelo. Interações: Interações de hidrogênio estão em linhas retas azul escuro.

Fonte: Autor

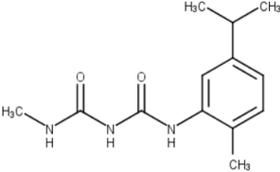
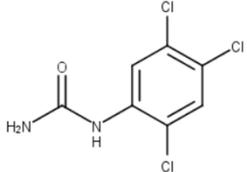
Destarte, as informações demonstram que a o composto SUB22 também apresenta padrão de interação de acordo com as características farmacofóricas encontradas nos anéis pteridínicos e no modelo farmacofórico proposto para *LcDHFR*, tendo em vista que neste último apresentou pontos de doação de interação de hidrogênio como requisitos essenciais para modulação da enzima.

As interações de hidrogênio da SUB22 junto ao resíduo ASP-52 se mostram promissoras, tendo em vista que o metotrexato e a primetamina (inibidores comerciais da DHFR) apresentaram de interação com este resíduo nos ensaios de acoplamento molecular. Neste sentido, sugerimos que o ligante SUB22 pode realizar o mesmo padrão de interação de hidrogênio que o metotrexato, em que ambos realizam a doação do hidrogênio para o oxigênio do resíduo ASP-52.

As figuras 31 e 32 foram geradas a partir das conformações finais obtidas ao término da dinâmica de produção, possibilitando demonstrar que os ligantes SUB10 e SUB22 ao final da simulação permaneceram situados no sítio catalítico da *LcDHFR-TS*, o que demonstra que as interações intermoleculares entre os compostos e a enzima resultaram em estabilização da proteína por um maior período de tempo. Contudo, a partir das últimas poses, foi possível observar que as distâncias encontradas entre os doadores e aceptadores dessa interação foram maiores que 3,5 Å (LYS-82: SUB10, 4,8 Å e 4,9 Å; ASP-52: SUB22 5,6 Å e 5,8 Å), excedendo o critério de aceitabilidade para esta modalidade de interação (LEITE, 2016). Entretanto, as conformações utilizadas representam apenas uma única pose gerada na DM, logo, estas não reproduzem todos os padrões de interação de hidrogênio durante a simulação, tampouco representa todas as conformações encontradas ao longo de toda trajetória da DM (110ns). Ademais, a DM incorpora ao sistema liberdade conformacional, possibilitando que, com a mobilidade dos complexos durante a trajetória, as interações de hidrogênio apresentem um maior tempo de permanência em distâncias inferiores à 3,5 Å, convergindo aos resultados encontrados a partir do módulo *h_bond* (LYS-82: SUB10, 56,09%; ASP-52: SUB22, 53,69 e 35,73%) (MARKOVITCH, AGMON, 2008).

Portanto, as simulações de DM demonstraram que os complexos formados entre *LcDHFR-TS:NADPH:SUB10* e *LcDHFR-TS:NADPH-SUB22* corroboram com a potencial atividade moduladora dos ligantes SUB10 e SUB22 frente à *LcDHFR-TS*, tendo em vista que estes estabilizaram o sistema com valores de RMSD menores que a forma APO. Estes dados são ratificados pelos tempos de permanência acima de 50% encontradas para as interações de hidrogênio entre os ligantes e os resíduos LYS-82 e ASP-52, sendo este último também envolvido em interações junto à inibidores de DHFR empregados na prática clínica. Para mais, as SUB10 e SUB22 apresentam em sua estrutura química uma cadeia lateral nitrogenada que apresenta aparente similaridade quanto à característica de realização de interações de hidrogênios dos anéis pteridínicos de inibidores de DHFR já descritos na literatura. Logo, infere-se que as SUB10 e SUB22 devem ser priorizadas para a realização de estudos *in vitro* subsequentes que corroborem para avaliação da sua capacidade de inibição da *LcDHFR-TS*, bem como atividade antileishmania.

Quadro 9 - Resumo diagnóstico dos resultados encontrados pela TV para as SUB10 e SUB22

Parâmetros avaliados através dos filtros	SUB10	SUB22
		
<i>Query Fit</i> (modelo farmacofórico <i>LcDHFR</i> nº10)	76,91	74,63
<i>Query Fit</i> (modelo farmacofórico <i>HsDHFR</i> nº3)	0	0
Mutagenicidade e Genotoxicidade (teste de AMES)	Não	Não
Hepatotoxicidade	Não	Não
Cardiotoxicidade (inibidor herG I e herG II)	Não	Não
Massa molecular (Da)	249,31 Da	239,49 Da
Área de superfície polar topológica (TPSA)	70,23 Å	55,12 Å
Pontos doadores de ligação de hidrogênio (HBD)	3	2
Pontos aceitadores de ligação de hidrogênio (HBA)	2	1
Coefficiente de partição octanol-água (cLoP)	2,02	2,42
Valor (R\$)	R\$329,00	R\$329,00
Composto agregador/promiscuo	Não	Não
Fitness Goldscore	43,91	43,67
Interações hidrofóbicas apontadas pelo acoplamento molecular junto à <i>LcDHFR</i> -TS	PHE-56 (1), ILE-45 (2) e VAL-156 (1)	ILE-45 (1)

Interações de hidrogênio apontadas pelo acoplamento molecular junto à <i>LcDHFR-TS</i>	ASP-52 (3) e THR-180 (1)	ASP-52 (2) e THR-180 (1)
Interações halogênicas apontadas pelo acoplamento molecular junto à <i>LcDHFR-TS</i>	N/A	SER-86 (1)
Estabilização total da forma APO da <i>LcDHFR-TS</i> na dinâmica molecular	60ns	60ns
<i>Root-Mean Square Deviation</i> (RMSD) da dinâmica molecular junto à <i>LcDHFR-TS</i>	0,73 ± 0,04 Å	0,56 ± 0,02 Å
Tempo de permanência das interações de hidrogênio pelo módulo <i>g_hbond</i>	LYS-82 56,09%	ASP-52 53,69 e 35,73%

Fonte: Autor

6. CONCLUSÕES

O emprego de técnicas de triagem virtual baseada no ligante e no receptor constitui estratégia promissora na identificação de compostos com potencial biológico frente a alvos de relevância farmacológica em parasitos causadores de doenças negligenciadas, a exemplo de *L. chagasi*, agente etiológico da leishmaniose visceral.

No presente trabalho, foi possível realizar uma triagem virtual por modelos farmacofóricos, filtros físico-químicos e toxicológicos para triar rapidamente, em um grande banco de dados (214.446 substâncias), moléculas com requisitos estéreo-eletrônicos para se ligar à *LcDHFR* (84.772 moléculas, QFIT 0,28 < QFIT > 88,77).

Os modelos 10 de *LcDHFR* e 3 de *HsDHFR*, construídos através do módulo GALAHAD™, demonstraram sensibilidade e especificidade suficientes para serem empregados na triagem de potenciais inibidores frente a *LcDHFR*.

Adicionalmente, a partir da técnica de modelagem por homologia, foi possível a obtenção da estrutura 3D da *LcDHFR*-TS útil para estudos de acoplamento molecular dos ligantes oriundos da triagem virtual. O modelo gerado da *LcDHFR*-TS foi o obtido dos moldes de *T. cruzi* (Identidade sequencial 67,3 %; Resolução 2,5 Å) e *T. brucei* (Identidade sequencial 48,0 %; Resolução 2,2 Å).

Os ensaios de acoplamento molecular na estrutura da *LcDHFR*-TS demonstraram melhor sensibilidade para identificação de compostos ativos na etapa de validação através da função ASP em *rescore* pelo Goldscore.

Das 24 moléculas selecionadas após triagem por modelo farmacofórico, filtros físico-químicos e toxicológicos e de viabilidade comercial, duas foram selecionadas com base nos valores de afinidade oriundos do ensaio de acoplamento molecular pelo GOLD 5.3. Tais compostos (SUB10, FITNESS 43.91; SUB22, FITNESS 43.67) possuem grupamentos químicos com similaridade à inibidores de DHFR disponíveis comercialmente (ex: trimetoprima e primetamina), destaca-se a presença de anéis aromáticos, grupamentos aceitadores (ex: N e O) e doadores (ex: OH e O) de interação de hidrogênio, além de uma cadeia lateral que se mimetiza os anéis pteridínicos das aminopirimidinas, sugerindo que tais compostos possam compartilhar o mesmo mecanismo de ação de moléculas com este quimiotipo.

Neste sentido, o acoplamento molecular dos compostos SUB10 e SUB22 junto à *LcDHFR*-TS possibilitou a identificar a importância da presença de centros hidrofóbicos, de interação halogênica, além de regiões aceitadoras e doadoras de

interações de hidrogênio, possibilitando a interações com os resíduos THR-180, ILE-45, VAL-156 e PHE-56.

As análises de DM sugerem que os ligantes SUB10 e SUB22 foram capazes de realizar interações intermoleculares junto à *LcDHFR-TS*, e conseqüentemente, gerando a estabilização do sistema. Para mais, os compostos permaneceram no sítio ativo durante toda a trajetória da dinâmica. Os dados apontam que os ligantes SUB10 e SUB22 realizam interações de hidrogênio com os resíduos LYS-82 e ASP-52, respectivamente, com permanência acima de 50%, demonstrando que tal padrão de interação ocorre de forma recorrente e poderá ser reproduzida no meio biológico.

Por fim, com base nas predições utilizadas, sugere-se que os compostos SUB10 e SUB22 foram preditivos tanto para a afinidade e reconhecimento seletivo frente a *LcDHFR* quanto para características favoráveis de biodisponibilidade por via oral e menor probabilidade de gerar toxicidade. Portanto, por apresentarem disponibilidade de aquisição, devem ser priorizados para estudos *in vitro* subsequentes, a exemplo de ensaios enzimáticos.

REFERÊNCIAS

- ADÃO, R. *et al.* Cardiotoxicidade associada à terapêutica oncológica: mecanismos fisiopatológicos e estratégias de prevenção. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 32, n. 5, p. 395-409, 2013.
- ADASME, M. F. *et al.* PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W530–W534, 2021.
- ANDRADE, Carine Raisa Barbosa de. **Caracterização química das folhas e avaliação *in silico* dos metabólitos isolados de *Zanthoxylum caribaeum* LAM (Rutaceae)**. 2018. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 171p. 2018.
- ANANDAKRISHNAN, R.; AGUILAR, B.; ONUFRIEV, A. V. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p.537-541, 2012.
- AROOJ, M. *et al.* An Innovative Strategy for Dual Inhibitor Design and Its Application in Dual Inhibition of Human Thymidylate Synthase and Dihydrofolate Reductase Enzymes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.
- BATISTA, F. M. A *et al.* Perfil epidemiológico e tendência temporal da leishmaniose visceral: Piauí, Brasil, 2008 a 2018. **Cad Saúde Pública**, v. 37, n. 11, 2021.
- BENKERT, P.; TOSATTO, S. C. E.; SCHOMBURG, D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. **Proteins**, v. 71, n. 1, p. 261-77, 2008.
- BERMAN, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.
- BERTOLAMI, M. C. Mecanismos de hepatotoxicidade. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, 2005.
- BEZERRA-SOUZA, A. *et al.* The antifungal compound butenafine eliminates promastigote and amastigote forms of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and

Leishmania (Viannia) *braziliensis*. **Parasitology International**, v. 65, p. 702-707, 2016.

BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JUNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. **Revista. Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 861-876, 2017.

BOMFIM, Mayra Ramos. **Identificação de potenciais inibidores de beta secretase-1 humana por triagem virtual hierárquica e dinâmica molecular**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, p. 87. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias de Saúde no SUS. **Relatório de Recomendação nº 365: Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. 1. ed. 5. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRINQUINHO, M. *et al.* Hepatotoxicidade associada ao uso de esteroides anabolizantes. **Galicia Clínica**, v. 78, n 2, p. 79-81, 2017.

BRUM, N. F. F. *et al.* Linfo-histiocitose hemofagocítica e leishmaniose em crianças: série de casos e revisão da literatura. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 40, n. e2020269, 2022.

CARREGAL, A. P *et al.* Inverse Virtual Screening Studies of Selected Natural Compounds from Cerrado. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 112, p. 3333–3340, 2012.

CARREGAL, A. P. *et al.* Triagem Virtual inversa como ferramenta para a química de produtos naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 8, n. 2, p. 71-82, 2011.

CASTILHO, Vanessa de Vasconcelos Sinatti. **Identificação *in silico* de Potenciais Inibidores da Ribose 5-Fosfato Isomerase de *Trypanosoma cruzi***. 2017. Tese (Doutorado em Biologia Computacional e Sistemas) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas, Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 210p. 2017.

CHEMAXON. Marvin Sketch version 15.4.20: ChemAxon, 2015

CLARK, M.; CRAMER, R. D.; VAN OPDENBOSCH, N. Validation of the general purpose tripos 5.2 force field. **Journal of Computational Chemistry**. v. 10, n. 8, p. 982- 1012, 1989.

CLARK, R. D.; ABRAHAMIAN, Æ. E. Using a staged multi-objective optimization approach to find selective pharmacophore models. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v.23, p. 765–771, 2009.

COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, v. 2, n. 9, p. 1511-1519, 1993.

DA SILVA, B. J. M *et al.* Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review. **Journal of Integrative Medicine**, v. 16, p. 211-222, 2018.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 42717, 2017.

DHORM PIMENTEL DE MORAES, A. R. *et al.* Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba- and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections. **Experimental Parasitology**, v. 187, p. 12-21, 2018.

DICKSON, M.; GAGNON, J. P. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. **Drug Discovery**, v. 3, n. 5, p. 417–429, 2004.

EISENBERG, D.; LUTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in Enzymology**, v. 277, p. 396-404, 1997.

FERREIRA, J. R. S. et al. American visceral leishmaniasis in a state of northeastern Brazil: clinical, epidemiological and laboratory aspect. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, n. e238383, 2022.

FONSECA, Quezia Victoria Faleiro Souza da. **Triagem *in silico* de potenciais inibidores da enzima dihidrofolato redutase - dimetilato sintase da *Leishmania chagasi***. 2020. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) - Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia. Salvador, 50p. 2020.

GANGJEE, A.; KURUP, S.; NAMJOSHI, O. Dihydrofolate Reductase as a Target for Chemotherapy in Parasites. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 609-639, 2007.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity — a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219- 3228, 1980.

GIGLIARANO, C.; FIGINI, S.; MULIERE, P. Making classifier performance comparisons when ROC curves intersect. **Computational Statistics & Data Analysis**, v. 77, p. 300-312, 2014.

GILBERT, I. H. Inhibitors of dihydrofolate reductase in leishmania and trypanosomes. **Biochimica et Biophysica**, v. 1587, n. 2-3, p. 249–257, 2002.

GOLD, version 4.0 (2008) Cambridge Crystallographic Database: Cambridge, U.K.

GRUMONT, R.; SIRAWARAPORN, W.; SANTI, D. V. Heterologous expression of the bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase from *Leishmania major*. **Biochemistry**. v. 27, n. 10, p. 3776-3784, 1988.

HARDY, L. W. *et al.* Biochemical and Genetic Tests for Inhibitors of *Leishmania* Pteridine Pathways. **Experimental Parasitology**, v. 87, p. 157-169, 1997.

IRWIN, J. J. *et al.* An Aggregation Advisor for Ligand Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 17, p. 7076–7087, 2015.

JOVELEVITHS, D. Toxicidade hepática de chás, ervas e fitoterápicos. Colestase induzida por drogas. **Revista GED Sociedade Brasileira de Hepatologia**, v. 30, 2011.

KARABULUT, S. *et al.* A DFT-based QSAR Study on Inhibition of Human Dihydrofolate Reductase. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 70, p. 23-29, 2016.

KHABNADIDEH, S. *et al.* Design, synthesis and evaluation of 2,4-diaminoquinazolines as inhibitors of trypanosomal and leishmanial dihydrofolate reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 2637–2649, 2005.

KNIGHTON, D. R. *et al.* Structure of and kinetic channelling in bifunctional dihydrofolate reductase–thymidylate synthase. **Nature Structural Biology**. v. 1, p. 186-194, 1994.

LAURO, G. *et al.* Inverse Virtual Screening of Antitumor Targets: Pilot Study on a Small Database of Natural Bioactive Compounds. **Journal of Natural Products**, v. 74, 1401–1407, 2011.

LAVECHIA, A; DI GIOVANNI, C. Virtual screening strategies in drug discovery: A critical review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 23, p. 2839–2860, 2013.

LEITE, Franco Henrique Andrade. **Planejamento e avaliação de novos inibidores de Pteridina Reductase 1 (PTR1) de *Leishmania major***. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 156. 2015.

LIONTA, E. *et al.* Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1923-1938, 2014.

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. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

LIU, M.; WU, Q.; HU, W. Pharmacophore screening on piperidinecarboxamides derivatives based on GALAHAD and CoMFA models. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 29, p. 1075-1083, 2011.

LOVELL, S. C. *et al.* Structure Validation by C α Geometry: ϕ , ψ and C β Deviation. **Proteins**, v. 50, n. 3, p. 437-450, 2003.

MAIA FILHO, Pedro Aurio. **Genotoxicidade e mutagenicidade em pacientes com leucemia mieloide crônica tratados com inibidores de tirosino-quinase**. 2017. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal do Ceará. Ceará, p. 64. 2017.

MARKOVITCH, O.; AGMON, N. Reversible geminate recombination of hydrogen-bonded water molecule pair. **The Journal of Chemical Physics**, v. 129, n. 8, 2008.

MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. D. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 11, n. 1, p. 7-31, 2003.

MARTINS, I. M. L. *et al.* Leishmaniose visceral: série histórica de pacientes hospitalizados e correlação com o clima em área endêmica de Minas Gerais, Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 57, p. 1-7, 2021.

MARTINS, João Paula Machado. **Triagem virtual de inibidores da enzima di-hidrofolato redutase de *Shchitosoma mansoni* (SmDHFR)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 92p. 2017.

MIZUTANI, M. Y. *et al.* Effective handling of induced-fit motion in flexible docking. **Proteins**. v. 63, n. 4, p. 878-891, 2006.

MULLIN, R. Cost to Develop New Pharmaceutical Drug Now Exceeds \$2.5B. **Chemical and Engineering News**, 2014.

MYSINGER, M. M. *et al.* Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 6582–6594, 2012.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. da; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, 2008.

NETO, Moysés Fagundes de Araújo. **Planejamento e avaliação de novos repelentes frente AO *Aedes aegypti***. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, p. 74. 2020.

NETO, M. F. A. *et al.* Identification of novel *Aedes aegypti* odorant-binding protein 1 modulators by ligand and structure-based approaches and bioassays. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 38, p. 1-13, 2020.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses**. Informe Epidemiológico das Américas, n. 7, 2019. Publicado em mar 2019. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/51738>>. Acesso: 25 de janeiro 2021.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses**. Informe Epidemiológico das Américas, n. 10, 2021. Publicado em dez 2021. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>>. Acesso: 25 de janeiro 2021.

PEZ, D. *et al.* 2,4-Diaminopyrimidines as Inhibitors of Leishmanial and Trypanosomal Dihydrofolate Reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, 4693–4711, 2003.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 4066–4072, 2015.

RAIMONDI, M. V. *et al.* DHFR Inhibitors: Reading the Past for Discovering Novel Anticancer Agents. **Molecules**, v. 24, n. 1140, 2019.

RANA, R. M. *et al.* In Silico Study Probes Potential Inhibitors of Human Dihydrofolate Reductase for Cancer Therapeutics. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 233, 2019.

RAZAK, S. *et al.* Molecular docking, pharmacokinetic studies, and in vivo pharmacological study of indole derivative 2-(5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-yl)-N'-[(E)-(3-nitrophenyl) methylidene] acetohydrazide as a promising chemoprotective agent against cisplatin induced organ damage. **Scientific Reports**, v. 11, n. 6245, 2021.

RODRIGUES, R. P. *et al.* Estratégias de Triage Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739-776, 2012.

SANTANA, Isis Bugia. **Modelagem comparativa e triagem virtual hierárquica para identificação de moduladores das OBPS de *Lutzomyia longipalpis***. 2016.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 91p. 2016.

SANTANA, M. T. P. et al., Avaliação da toxicidade *in silico* do monoterpeno ascaridol. Research, **Society and Development**, v. 9, n. 5, 2020.

SANTOS, R. C. et al. Modificação molecular incremental: análise de parâmetros físicoquímicos, farmacocinéticos e toxicológicos *in silico* de fármacos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs). **Boletim Informativo Geum**, v. 9, n. 2, p. 31-38, 2018.

SCHANELL, J.R., DYSON, H. J., WRIGHT, P. E. Structure, dynamics and catalytic function of dihydrofolate reductase. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**. n. 33, p. 119-40, 2004.

SHARMA, V. K.; BHARATAM, P. V. Identification of Selective Inhibitors of *LdDHFR* Enzyme Using Pharmacoinformatic Methods. **Journal of Computational Biology**, v. 27, n. 0, 2020.

SHEPPHARD, J. K.; CLARK, Æ. R. D. A marriage made in torsional space : using GALAHAD models to drive pharmacophore multiplet searches. **Journal of Computer Aided Drug and Design**, v. 20, p. 763–771, 2006.

SCHORMANN, N. et al. Structure-based approach to pharmacophore identification, *in silico* screening, and three-dimensional quantitative structure–activity relationship studies for inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase function. **Proteins**, v. 73, p. 889-901, 2008.

SILVA, Dayse Alessandra Almeida Silva. **Isolamento e identificação de metabólitos secundários presentes em espécies de Bromeliaceae para predição *in silico* de atividade biológica**. 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, p. 52. 2019.

SIEVERS, F et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 539, 2011.

SIGMA PLOT 12.0.version 12.0, San Jose: Systat Software, 2014.

SILVA, A. B. *et al.* Análise dos fatores que influenciam a ocorrência da Leishmaniose Visceral humana. **Cogitare Enfermagem**, v. 26, n. e75285, 2021.

SCHRÖDINGER. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, 2009.

STERLING, T.; IRWIN, J. J. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, p. 2324–2337, 2015.

TAVARES, G. G.; ALVES, S. F.; BORGES, L. L. Investigação *in silico* de compostos bioativos de *Croton linearifolius* Müll.Arg com atividade antidepressiva. **Revista Brasileira Militar de Ciências**, v. 6, n. 16, 2020.

TELES, André Lacerda Braga. **Dihidrofolato Redutase de *Schistosoma mansoni* e Dihidrofolato Redutase-Timidilato Sintase de *Leishmania chagasi***: Alvos potenciais para o desenvolvimento de fármacos. 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 79. 2016.

TELES, A. L. B. *et al.* Identification, Characterization and Molecular Modelling Studies of *Schistosoma mansoni* Dihydrofolate Reductase Inhibitors: From Assay Development to Hit Identification. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 0, p. 1-12, 2018.

TEXEIRA, B. V. F. *et al.* Dual and selective inhibitors of pteridine reductase 1 (PTR1) and dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) from *Leishmania chagasi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 1439-1450, 2019.

TRIPOS. SYBYL-X 2.0, St Louis, MO, USA, p. 1-90, 2010.

VALVERDE, Ricardo. **Doenças Negligenciadas**. Agencia Fiocruz de Notícias, 2013. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2022.

VAN DER SPOEL, D. *et al.* GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational**, v. 26, n. 16, p. 1701-1718, 2005.

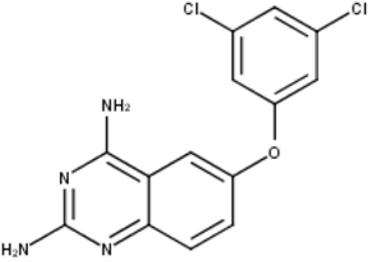
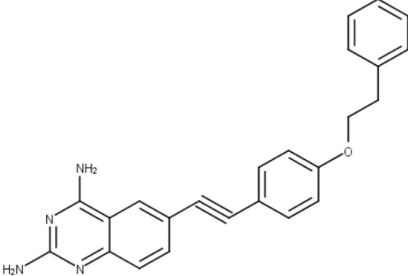
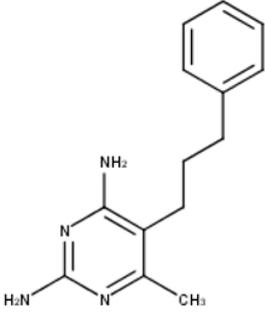
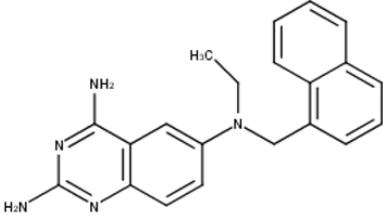
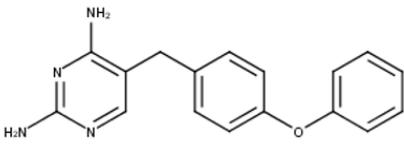
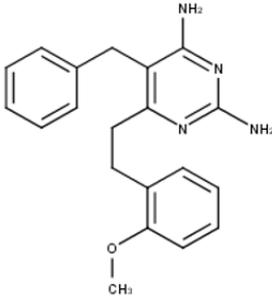
- VAN GUNSTEREN, W. F. *et al.* On the effect of the various assumptions and approximations used in molecular simulations on the properties of bio-molecular systems: Overview and perspective on issues. **Chem Phys Chem**, v. 22, p. 264-282, 2021.
- VEBER, D. F. *et al.* Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2615-2623, 2002.
- VICKERS, T. J., BEVERLEY, S. Folate metabolic pathways in *Leishmania*. **Essays in Biochemistry**, n. 51, p. 51-63, 2011.
- XIANG, Y.; HOU, Z.; ZHANG, Z. Pharmacophore and QSAR studies to design novel histone deacetylase 2 inhibitors. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 79, n. 5, p. 760– 770, 2012.
- XU, X.; HUANG, M.; ZOU, X. Docking-based inverse virtual screening: methods, applications, and challenges. **Biophysics Reports**, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2018.
- WESTERMAIER, Y.; BARRIL, X.; SCAPOZZA, L. Virtual screening: An *in silico* tool for interlacing the chemical universe with the proteome. **Methods**, v. 71, p. 44–57, 2015.
- YANG, S. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 11/12, p. 444–450, 2010.
- WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 54, p. 5.6.1–5.6.37, 2016.
- WHO, World Health Organization. **Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap.** Weekly epidemiological record, n. 3, p. 401-419, 2021.
- ZANONI, Thalita Boldrin. **Avaliação do perfil de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade dos corantes Basic Red 51, Yellow 57 e P-Fenilenodiamina usados na tintura de cabelo em células da pele.** 2014. Tese (Doutorado em Toxicologia) - Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, p. 57. 2014.

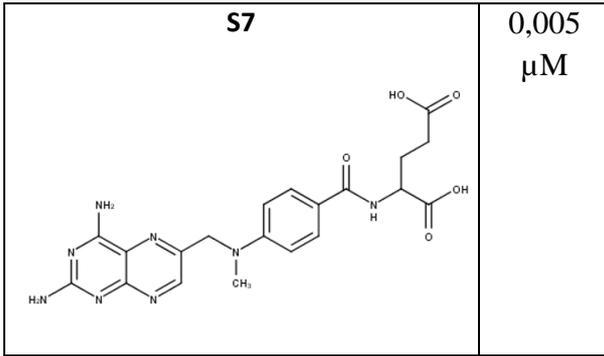
ZHAO, X. *et al.* Ligand-based pharmacophore model of n-Aryl and n-Heteroaryl piperazine α 1A-adrenoceptors antagonists using GALAHAD. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 2, p. 126–136, 2010.

APÊNDICES

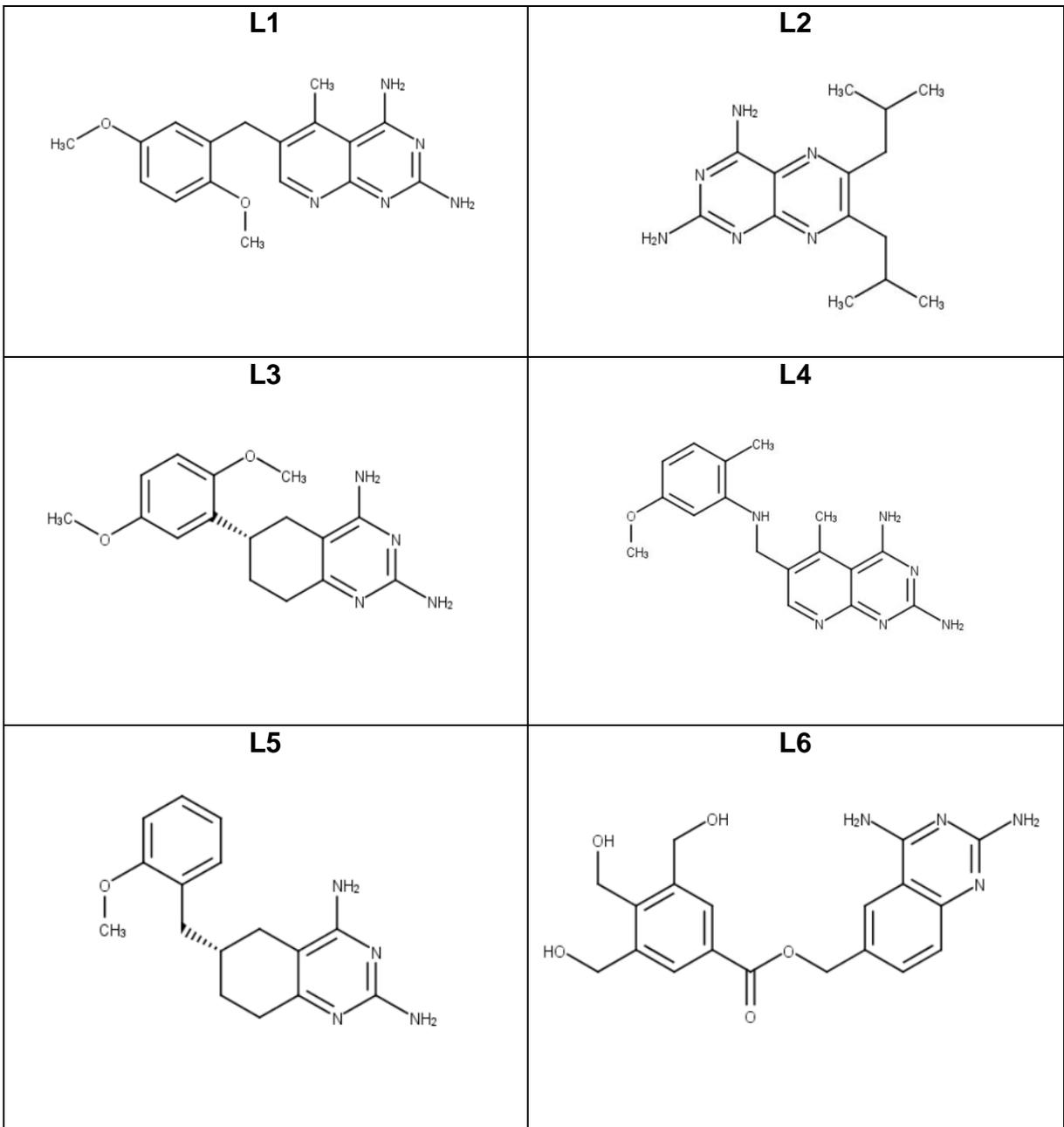
Apêndice A

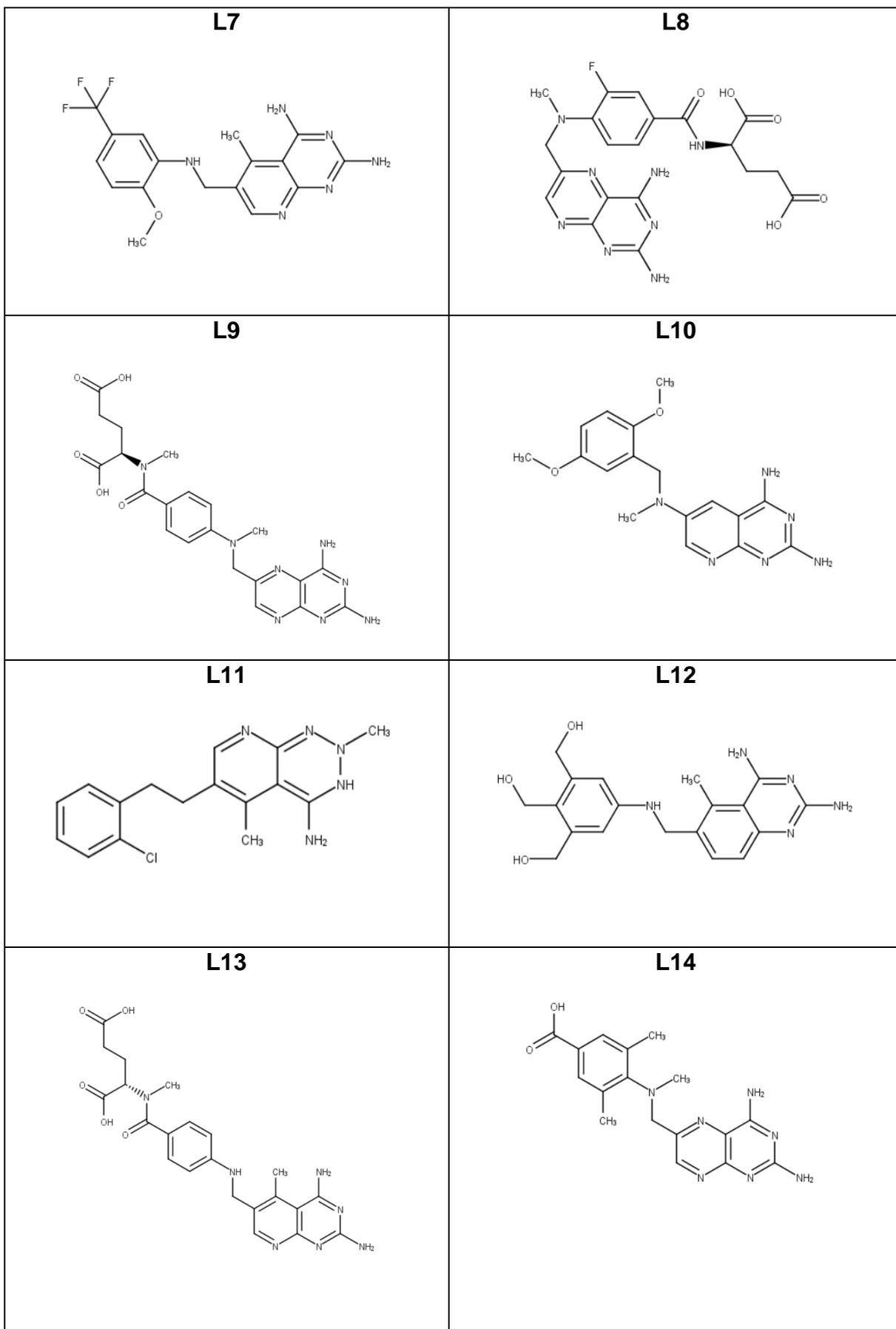
Estrutura química dos inibidores de *LcDHFR* utilizados para o banco teste

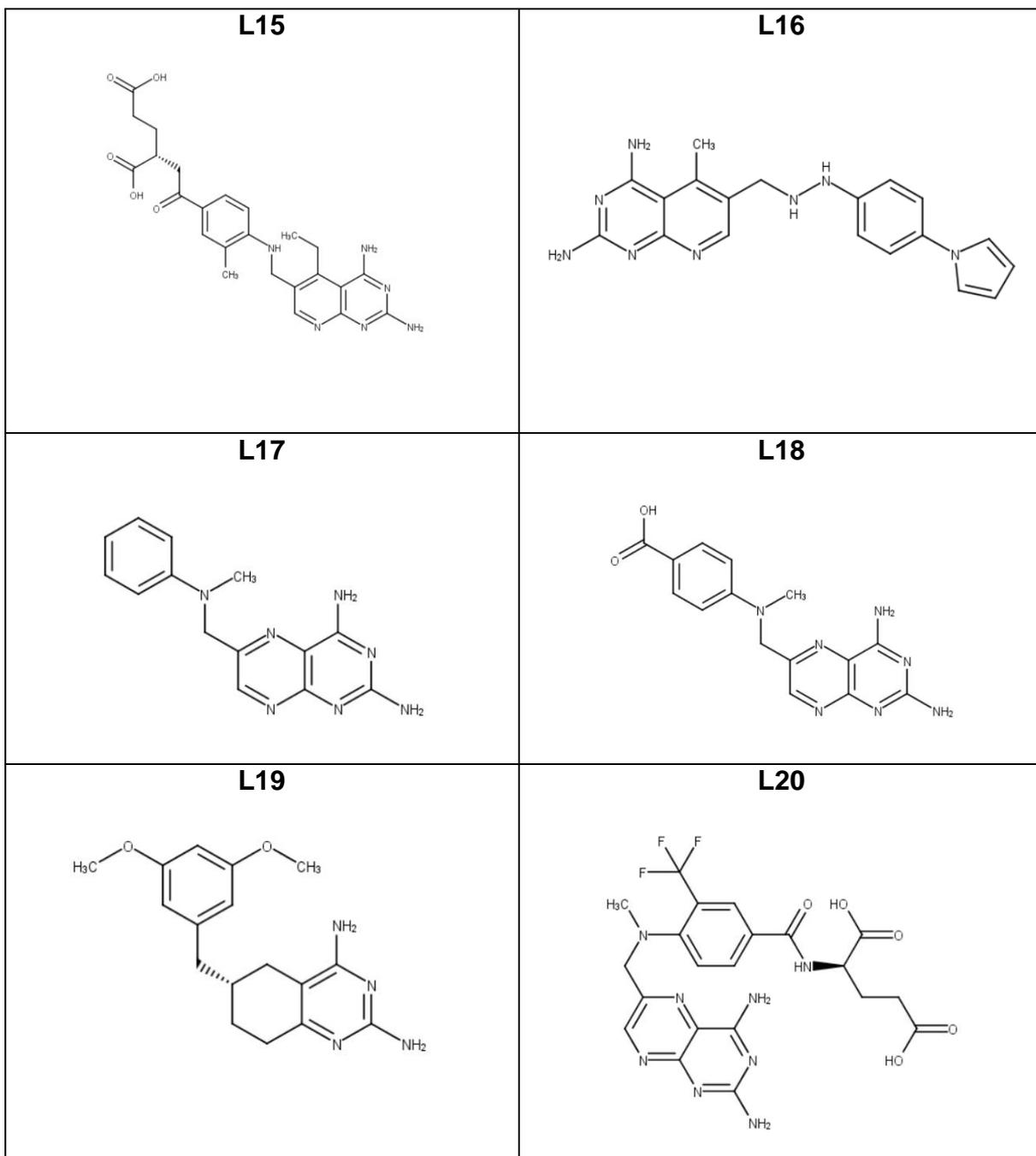
Moléculas	IC ₅₀	Moléculas	IC ₅₀
<p>S1</p> 	0,34 μM	<p>S2</p> 	1,6 μM
<p>S3</p> 	1,3 μM	<p>S4</p> 	0,000091 μM
<p>S5</p> 	0,22 μM	<p>S6</p> 	4,20 μM



Estrutura química dos inibidores de *Hs*DHFR utilizados para o banco teste obtidos através do servidor DUD-E







ANEXOS

Anexo A

Artigo aceito na *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas* (A3) -
Atividades biológicas avaliadas in vitro de espécies do gênero *Erythroxylum*: uma
revisão de literatura.

Carta de aceite:

Bogotá D. C., Colombia, 24 de julio de 2021

Investigadora
LUÍZA MATOS DE MACÊDO
Departamento de Ciências da Vida,
Universidade do Estado da Bahia,
Salvador, Bahia, Brasil

Estimada colega Luíza,

Mediante esta comunicación me es grato informarle que su manuscrito titulado
“**Atividades biológicas avaliadas in vitro de espécies do gênero *Erythroxylum*: uma
revisão de literatura**”, escrito por Luíza Matos de Macêdo, Lourdes Cardoso de Souza
Neta, Erika Maria de Oliveira Ribeiro y André Lacerda Braga Teles, ha sido aceptado
para publicación en nuestra revista (Vol. 51, No. 1, abril de 2022).

En este orden de ideas, esperamos enviarle las respectivas pruebas de imprenta tan
pronto como sea posible.

Sin otro particular y agradeciendo por la atención prestada me suscribo de usted.

Cordial saludo,



Prof. Fleming Martínez R., D.Sc.
Director-Editor RCCQF

20 AÑOS Bicentenario

**Atividades biológicas avaliadas *in vitro* de espécies do gênero *Erythroxylum*:
uma revisão de literatura**

**Biological activities evaluated *in vitro* of species of the genus *Erythroxylum*:
a literature review**

Luíza Matos de Macêdo¹; Lourdes Cardoso de Souza Neta²; Erika Maria de Oliveira Ribeiro¹; André Lacerda Braga Teles¹.

¹Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Ciências da Vida, Rua Silveira Martins, 2555, Cabula, Salvador, Bahia, Brasil, CEP: 41.150-000 *Autor para correspondência: luizamacedotp@outlook.com

²Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Rua Silveira Martins, 2555, Cabula, Salvador, Bahia, Brasil, CEP: 41.150-000

RESUMO: Introdução: O gênero *Erythroxylum* é composto por 230 espécies distribuídas em regiões subtropicais da América do Sul, que são utilizadas pela população tradicional para o tratamento de diversos acometimentos, como febre, asma, sinusite, gripe, sangramento, amenorreia, afecções virais, dentre outros. **Objetivo:** Realizar uma revisão sistemática da literatura sobre as atividades biológicas *in vitro* de espécies do gênero *Erythroxylum*. **Metodologia:** Para o presente estudo foram utilizadas as bases eletrônicas: LILACS, PubMed, SciELO, ScienceDirect e BIREME. Os descritores consultados foram: *Erythroxylum* AND “*in vitro*”. **Resultados e Discursão:** Um total de 64 artigos foram selecionados para compor a revisão após emprego da ferramenta PRISMA e serem avaliados quanto aos critérios de inclusão e exclusão. Esse levantamento demonstrou que diversas espécies do gênero *Erythroxylum* apresentaram suas propriedades biológicas validadas através de estudos *in vitro*, com destaque para as atividades antioxidante, antibiótica, anticâncer, anti-hipertensiva, antidiabética e neuroprotetora. Mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar as propriedades biológicas de *Erythroxylum sp.*, visto que apenas 30 espécies do gênero foram estudadas até o presente momento.

Palavras-chave: *Erythroxylum*, *in vitro*, antioxidante, anticâncer e antidiabética

ABSTRACT: Introduction: The genus *Erythroxylum* is composed of 230 species distributed in subtropical regions of South America, these are used by the traditional population for the treatment of various disorders, such as fever, asthma, sinusitis, flu, bleeding, amenorrhea, viral disorders, among others. **Objective:** To carry out a systematic literature review on the *in vitro* biological activities of species of the genus *Erythroxylum*. **Methodology:** For this study, the following electronic databases were used: LILACS, PubMed, SciELO, ScienceDirect and BIREME. The descriptors consulted were: *Erythroxylum* AND “*in vitro*”. **Results and Discussion:** A total of 64 articles were selected to compose the review after using the PRISMA tool and to be evaluated for inclusion and exclusion criteria. This study demonstrated that several species of the genus *Erythroxylum* presented their biological properties validated through *in vitro* studies, with emphasis on the antioxidant, antibiotic, anticancer, antihypertensive, anti-diabetic and neuroprotective activities. Further studies should be carried out in order to elucidate the biological properties of *Erythroxylum sp.*, since only 30 species of the genus have been studied so far.

Key words: *Erythroxylum*, *in vitro*, antioxidant, anticancer and antidiabetic

INTRODUÇÃO

Dados da Organização Mundial da Saúde apontam que aproximadamente 80% da população mundial são consumidores ativos de plantas ou medicamentos derivados de produtos naturais, sejam eles de origem vegetal, animal ou de microorganismos [1]. Nesse contexto, as plantas medicinais vêm sendo empregadas na medicina popular desde os tempos pré-históricos para o tratamento e prevenção de diversas patologias, podendo serem incorporadas em diversas formulações para fins nutricionais, cosméticos e principalmente medicinais [2].

Espécies vegetais podem produzir substâncias através do seu metabolismo secundário que apresentam capacidade de interagir com receptores e moléculas de organismos vivos. Tal

interação pode levar a uma resposta biológica específica e eventualmente à modulação de uma ação farmacológica [1,2]. A partir da ciência de plantas que apresentam propriedades medicinais, torna-se importante o investimento no estudo da composição química desses vegetais, visando o descobrimento de substâncias úteis para o desenvolvimento de novos medicamentos [3].

Nessa perspectiva, espécies do gênero *Erythroxylum* merecem destaque pela sua utilização na medicina popular frente a diferentes acometimentos. Há relatos da sua utilização para o tratamento de febre, asma, sinusite, gripe, sangramento, amenorreia, problemas no estômago e rim, além como tônico estimulante, diurético e antiparasitário [4]. *Erythroxylum* é considerado o maior gênero da família *Erythroxylaceae*, composta por árvores floridas de distribuição tropical e subtropical, apresentando aproximadamente 240 espécies catalogadas [5].

Plantas do gênero *Erythroxylum* são responsáveis por biossintetizar alcaloides tropanicos, que vêm apresentando atividades biológicas como anticolinérgica, antiemética, antidepressiva, anestésica e antitumoral [6]. Além disso, alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides e triterpenos oriundos de espécies desse gênero vêm sendo isolados e avaliados quanto a ações farmacológicas, o que vêm justificando as propriedades medicinais e o conhecimento etnobotânico descrito para essas plantas [2].

A *E. coca* é a espécie mais conhecida desse gênero, visto que é responsável pela síntese da cocaína, alcaloide tropanico utilizado para fins recreativos [7]. Contudo, dentre as espécies utilizadas medicinalmente, pode-se citar o exemplo da *E. minutifolium*, empregada popularmente no tratamento de infecções virais e bacterianas na pele, afecções respiratórias e renais [8]. Há descrição do uso de extratos de *E. laurifolium* para o tratamento de diarreia e eliminação de cálculos nos rins [9, 10]. *E. cuneatum* vem sendo relatada quanto a sua

propriedade abortiva [12]. Já *E. sideroxyloides* vem sendo utilizada na medicina tradicional para o tratamento de infecções de garganta, febre e pedra nos rins [13].

Dadas as diversas aplicações medicinais relatadas pelas culturas tradicionais, espécies do gênero *Erythroxylum* se mostram promissoras como fontes de moléculas úteis no desenvolvimento de novos medicamentos frente a diversos acometimentos em saúde [4].

Entretanto, observa-se a necessidade da realização de uma sistematização dos trabalhos já publicados sobre as propriedades bioativas já descritas para o gênero, de forma a contribuir tanto para divulgação de estudos que validem o seu uso na medicina popular quanto para auxiliar no levantamento de informações para pesquisas de planejamento de novos fármacos a partir de espécies do gênero [2] .

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão sistemática da literatura sobre as atividades biológicas de espécies do gênero *Erythroxylum* descritas a partir de ensaios *in vitro*, bem como traçar uma a comparação entre os resultados das propriedades encontradas em diferentes espécies estudadas.

METODOLOGIA

O presente estudo se trata de uma revisão sistemática de literatura [13]. As buscas foram realizadas em dezembro de 2020 nas seguintes bases eletrônicas: LILACS, PubMed, SciELO, ScienceDirect e BIREME. Os descritores consultados foram *Erythroxylum* AND “*in vitro*”. Não houve limite de período de tempo. O objetivo do trabalho foi responder a seguinte pergunta: “Quais propriedades biológicas do gênero *Erythroxylum* estão descritas através de testes *in vitro*?”.

O critério de seleção dos artigos seguiu a ferramenta PRISMA. Inicialmente, foram incluídos apenas os artigos que se enquadraram no tema proposto após análise de títulos e resumos. Além disso, apenas trabalhos contendo dados quantitativos dos resultados das análises

“*in vitro*” das atividades biológicas de espécies do gênero *Erythroxylum* foram considerados, redigidos nas línguas inglesa, espanhola ou portuguesa.

Como critérios de exclusão: trabalhos que abordavam estudos exclusivamente qualitativos, estudos de revisão/etnobotânicos estritamente descritivos e que não apresentavam resultados quantitativos *in vitro* de atividades biológicas no seu conteúdo, que não traziam dados sobre espécies do gênero *Erythroxylum*, que analisaram fórmulas fitoterápicas que continham *Erythroxylum ssp.* acrescidas de outras espécies, que apresentavam dados exclusivamente da atividade citotóxica e genotóxica, ou que apresentavam resultados de experimentos com a substância cocaína que não foi isolada diretamente de extratos ou frações da espécie *Erythroxylum* abordada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 expõe os resultados encontrados em cada uma das bases de dados pesquisadas, bem como o fluxograma ilustrando a seleção dos artigos. Dessa forma, foram encontradas 339 publicações através dos descritores empregados, contudo, após a revisão completa dos textos, remoção de publicações repetidas em diferentes bases de dados e acréscimo das referências cruzadas, um total de 64 artigos foram selecionados para a construção da revisão, visto que se enquadraram dentro dos critérios de inclusão.

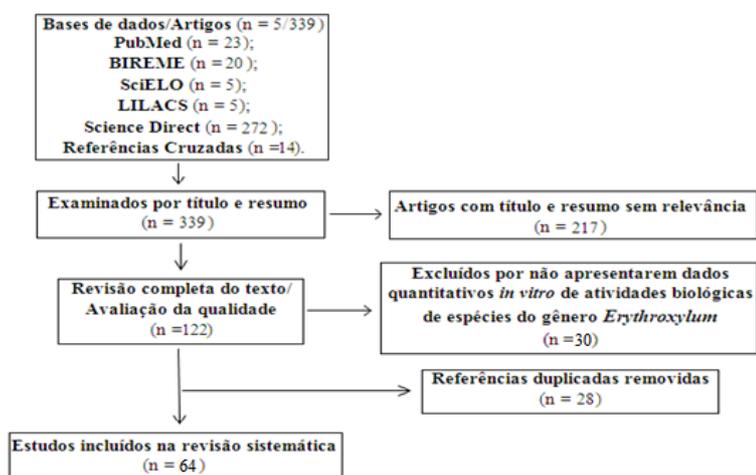


Figura 1 – Fluxograma da seleção dos artigos empregando a ferramenta PRISMA

Através do levantamento bibliográfico realizado, observou-se que os estudos incluídos nesta revisão validaram interessantes propriedades biológicas para as espécies *Erythroxylum*. A partir dos resultados encontrados, o gênero se mostrou rico na síntese de moléculas bioativas promissoras para o desenvolvimento de medicamentos com propriedades antimicrobiana, anti-hipertensiva, anticâncer, antiviral, antidiabética, antioxidante, dentre outras.

Atividade anti-hipertensiva

Duas espécies do gênero *Erythroxylum* foram testadas quanto à sua propriedade anti-hipertensiva por meio da capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). O extrato de 99% em etanol das folhas de *E. laurifolium* apresentou potencial atividade de reduzir a pressão arterial, o extrato na concentração de 0,33 mg/mL inibiu 64% da atividade da ECA. Este resultado foi atribuído à presença de quercetina-3-O-raminosídeo (quercitrina) ($IC_{50} = 0,67$ mM) e kaempferol-3-O-raminosídeo (afzelina) ($IC_{50} = 2,8$ mM) (Figura 2), que demonstraram atuar de forma sinérgica [14, 15].

O extrato etanólico das partes aéreas de *E. gonocladum* também foi avaliado quanto a inibição da ECA, este apresentou capacidade de inibição concentração-dependente com IC_{50} de 4,53 a 0,33 mg/mL. Astilbina (Figura 2), um flavonoide isolado de *E. gonocladum*, também promoveu inibição significativa *in vitro* da ECA (IC_{50} 5,87) na concentração de 10 mM [16].

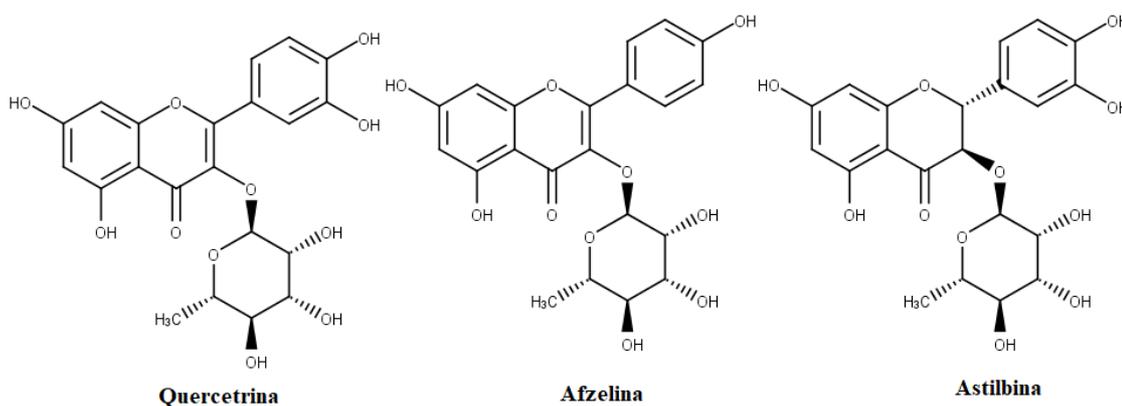


Figura 2 – Estruturas químicas da quercitrina, afzelina e astilbina

Atividade antidiabética

Picot, Subraty e Mahomoodally realizaram um estudo de cinética enzimática quanto a capacidade de inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase de extratos de cinco espécies medicinais utilizadas tradicionalmente para o tratamento da diabetes pela população das Ilhas Maurício [17]. O extrato metanólico da folha de *E. laurifolium* apresentou significativa inibição da α -amilase (IC_{50} 7472,92 μ g/mL) e α -glicosidase (IC_{50} 1,02 μ g/mL) ao se comparar com a acarbose. Demonstrou-se então que *E. laurifolium* apresenta uma potente atividade antidiabética, com forte inibição sobretudo da α -glicosidase [18].

O extrato das folhas de *E. macrocarpum* e suas frações em diclorometano, acetato de etila, n-butanol e água foram avaliados quanto a capacidade de antiglicação. Em concentrações entre 250 a 2000 μ g/mL, os extratos e frações de *E. macrocarpum* apresentaram baixa propriedade de antiglicação, com IC_{50} de 0.11 a 9.36 μ g/mL ao se comparar com o padrão aminoguanidina [19]. Já os esteroides 4-metil ergosta-7, 23-dien-3 β -ol e 4-metil ergosta-7, 24(28)-dien-3 β -ol, isolados das folhas de *E. monogynum*, demonstraram alta capacidade de antiglicação, com mais de 90% de inibição de produtos finais da glicação avançada (AGEs) na concentração de 100 mg/mL e com IC_{50} de 35,12 e 39,28 mg/mL da, respectivamente [20].

Atividade anticâncer

No estudo de Elias e colaboradores, o extrato hexânico das folhas de *E. daphnites* apresentou atividade anti-proliferativa em células escamosas de carcinoma oral SCC-9 (IC_{50} de 448.9 mg/mL), mediante redução dos níveis intracelulares de ciclinas D e E, juntamente com o aumento da expressão de caspase-3, demonstrando então propriedade pró-apoptótica [21]. Outra espécie vem apresentando atividade anticâncer, extratos e frações da casca em diferentes solventes de *E. caatingae* foram avaliadas *in vitro* contra linhas celulares cancerígenas, sendo

estas: células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano (NCI-H292), leucemia mielocítica crônica (K562) e células de carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2). Neste estudo, as maiores atividades se deram contra HEp-2, com IC₅₀ de 8,25 µg/mL para a fração em clorofórmio, e para a linha celular K562, com valores de IC₅₀ 9,86 µg/mL e 11,21 µg/mL para as frações em acetato de etila e clorofórmio, respectivamente [22].

Já no estudo de Pereira e colaboradores, as frações enriquecidas com alcaloides derivadas das folhas, cascas e raízes de *E. pugens* apresentaram atividade citotóxica para linhagens tumorais de carcinoma cervical causadas pelos vírus HPV18 (HeLa) e HPV16 (SiHa), além de células de câncer de próstata (PC-3) e renal (786-0) [6]. O mesmo efeito não foi observado para o extrato das folhas de *E. macrocarpum* em células epiteliais do câncer de mama, uma vez que não foi obtido um resultado estatisticamente significativo [23]. Em contrapartida, o extrato aquoso das folhas de *E. cuneatum* apresentou atividade citotóxica frente células de carcinoma de fígado (HepG2), com IC₅₀ de 125 µg/mL. Além disso, na concentração de 1 mg/mL o extrato não causou danos significativos em DNA no estudo de genotoxicidade, tanto para células normais do fígado (WRL68), quanto para HepG2 [11].

Em combinação com radioterapia, o extrato aquoso das folhas de *E. suberosum* a 500 µg/mL apresentou elevada toxicidade frente as células de carcinoma oral e da hipofaringe. O tratamento padrão com cisplatina (associada a 4 Gy de radiação) resultou em 36% de células de câncer oral viáveis, já o pré-tratamento com *E. suberosum* derivou em 27% de viabilidade celular, demonstrando aumento da eficácia [24].

O alcaloide tropânico Pervilleina A, isolado do extrato das raízes de *E. pervillei*, ressensibiliza as células de carcinoma epidermóide humano (KB-V1) multirresistente e CEM/VLB100 à vimblastina (VBT) com valores de IC₅₀ de 0,36 e 0,02 µM, respectivamente. Da forma semelhante, restaura a quimiossensibilidade das células KB-8-5 à colchicina com valor de IC₅₀ de 0,61 µM [25, 26, 27]. Já Pervilleinas B e C, também isolados de extratos da

raiz de *E. pervillei*, demonstraram capacidade de restaurar a sensibilidade à VBT de células KB-V1 resistentes a múltiplas drogas com IC₅₀ de 0,17 mM [28, 29], resultado este também encontrado para Pervilleina F com IC₅₀ de 0,40 mM, através da parada na fase G2/M do ciclo celular (Figura 3) [30].

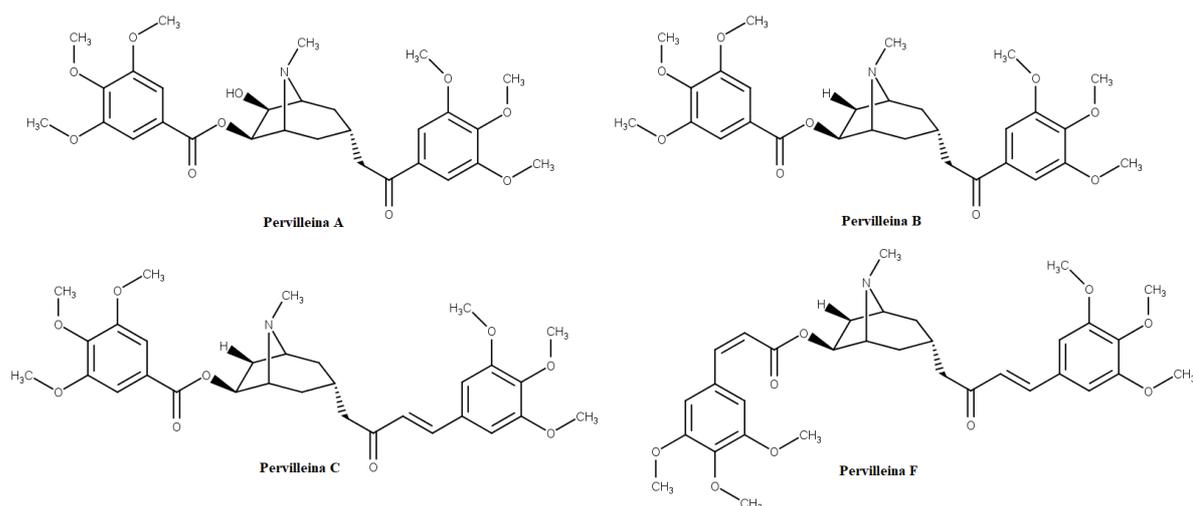


Figura 3 – Estrutura química das pervilleinas A, B, C e F

Compostos isolados de *E. rotundifolium* também foram avaliados contra células cancerígenas humanas. Os alcaloides 6 β -Benzoiloxi-3R-(Z)-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi) tropano, 6 β -Benzoiloxi-3R-(R)-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi) tropano, 6 β -Benzoiloxi-3R-(E)-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi) tropano-7 β -ol e 7 β -Acetoxi-6 β -benzoiloxi-3R-(E)-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi) tropano (Figura 4) apresentaram importante atividade frente células KB-V1 multirresistente incubadas com VBT [25]. Observou-se que os alcaloides isolados de *E. pervillei* e *E. rotundifolium* têm a capacidade de reverter a multirresistência ao interagir possivelmente com a glicoproteína-P [30, 31, 32].

Para mais, do extrato da casca do caule de *E. bezerrae* foram isolados os alcaloides tropânicos Eritrobezerrinas A, B, C, D, E, e F (Figura 5), que foram avaliados frente células do câncer de próstata metastático (PC-3), adenocarcinoma de cólon (HCT-116), glioblastoma (SNB-19) e câncer de pulmão (NCI-H460). Contudo, apenas Eritrobezerrina C apresentou

atividade moderada com valores de IC_{50} de 3,38 e 5,43 μ M para HCT-116 e NCI-H460, respectivamente [33].

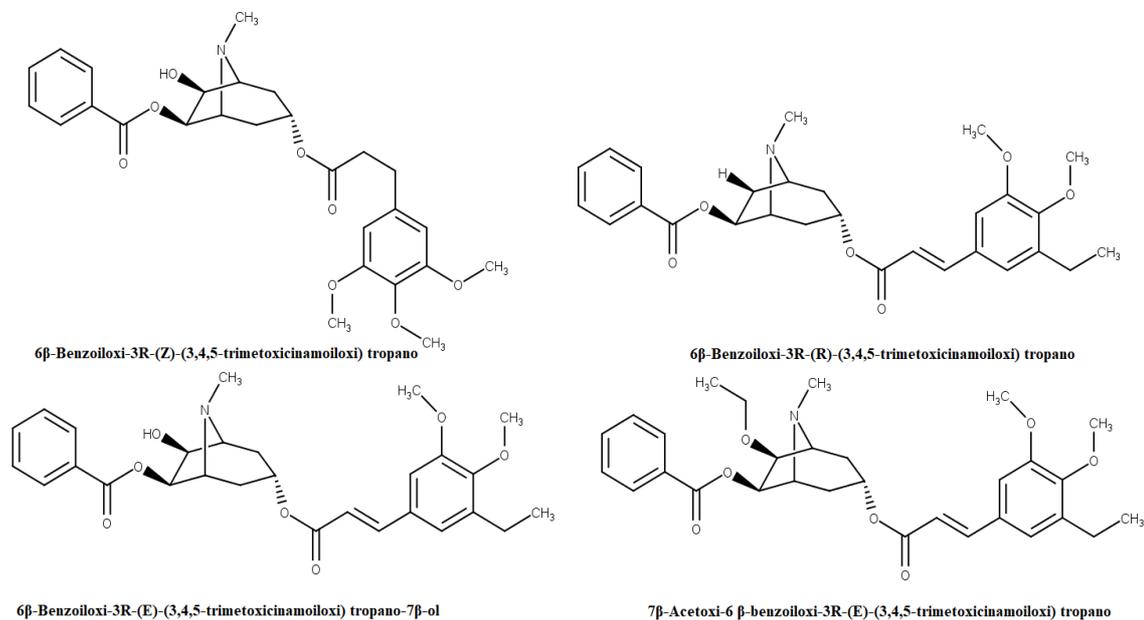


Figura 4 – Estruturas químicas dos alcaloides tropânicos avaliados de *E. rotundifolium*

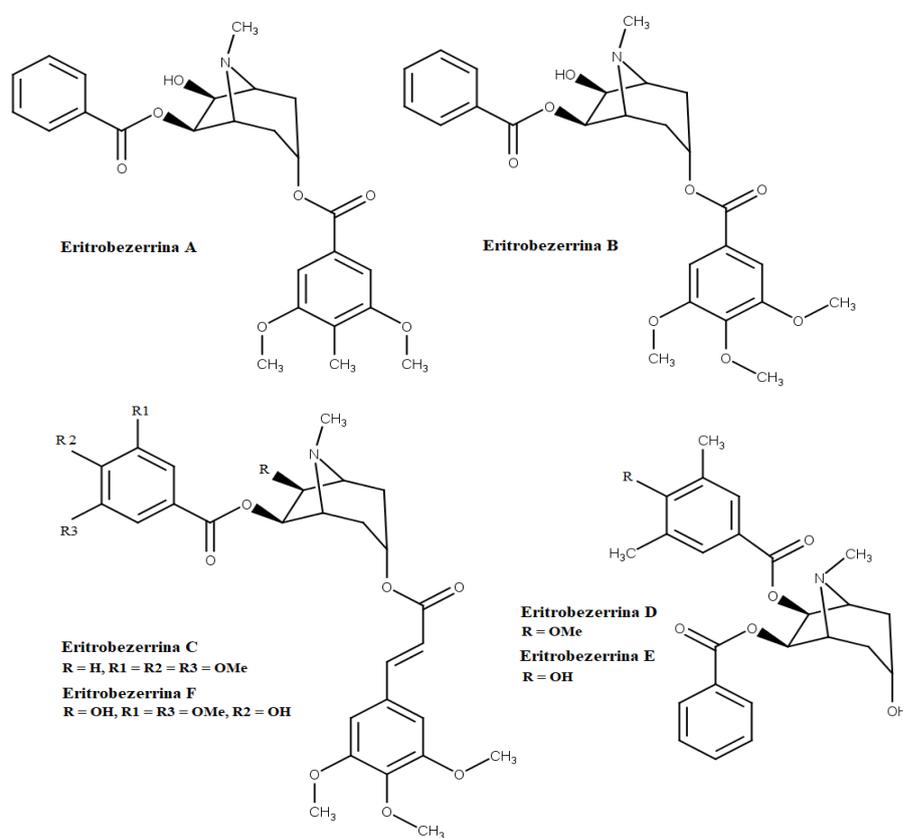


Figura 5 - Estruturas químicas de Eritrobezerrina A, B, C, D, E e F

Atividade antioxidante

Diversas publicações avaliaram a atividade antioxidante de espécies do gênero *Exrythroxyllum* através de diferentes metodologias. As técnicas *in vitro* analisaram a capacidade de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), o radical ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS), o radical peroxil (ORAC), óxido nítrico (ON), superóxido (SO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), além da inibição da xantina oxidase (XO) e do poder de redução do íon ferro (FRAP).

O extrato aquoso e metanólico das folhas de *E. macrocarpum* e suas frações (em diclorometano, acetato de etila, n-butanol e água) apresentaram baixa atividade antioxidante ao se comparar com as outras espécies avaliadas no mesmo estudo. Obtiveram-se na concentração de 100 µg/mL o valor de IC₅₀ entre 8,63 a 14,59 µg/mL frente ao radical DPPH, 2,23 a 19,36 µg/mL para o radical SO e 1,23 a 10,67 µg/mL para ON [19]. Ramhit e colaboradores também estudaram o extrato das folhas de *E. macrocarpum*, no entanto, estas apresentaram elevada atividade antioxidante se comparadas com outras espécies da flora Maurícia estudadas no mesmo material, com IC₅₀ de 0,30 mg/mL para sequestro de ON, 4,08 mg/mL para SO e 0,34 mg/mL para inibição da XO [23]. De forma adicional, o estudo de Neergheen e colaboradores apontou para o extrato da folha de *E. macrocarpum* os valores de 441 µM/g em peso fresco em equivalente de trolox para ABTS e 517 µM/g em peso fresco em equivalente de Fe (II) da capacidade de redução para FRAP [34]. A divergência de resultados entre os estudos pode ser justificada pelos diferentes locais de coleta da espécie, diferentes métodos extrativos empregados, resultando na variação da composição dos extratos, além das diferentes técnicas utilizadas para a avaliação desta propriedade.

Ledoux e colaboradores buscaram avaliar a atividade antioxidante por ABTS, FRAP e ORAC de 64 plantas endêmicas das Ilhas Mascarenhas, dentre elas *E. laurifolium* e *E.*

sideroxyloides, que demonstraram alta capacidade antioxidante. Para os extratos das folhas e da casca de *E. laurifolium*, encontrou-se como resultados de IC₅₀, respectivamente, ABTS 134,5, FRAP 18,1, ORAC 72,2 µM/mg/mL e ABTS 1927,0, FRAP 391,9, ORAC 6310,3 µM/mg/mL, já para *E. sideroxyloides* ABTS 157,4, FRAP 63,9, ORAC 229,1 µM de Trolox equivalente por mg/mL de extrato e ABTS 1493,7, FRAP 88,8, ORAC 4441,1 µM de Trolox equivalente por mg/mL de extrato [35]. *E. sideroxyloides* também foi estudada por Soobrate e colaboradores, o extrato das folhas apresentou promissor efeito protetor na peroxidação lipídica, com IC₅₀ de 0,0435 mg de peso fresco por mL no sistema Fe³⁺/ascorbato e 0,05 mg de peso seco por mL no sistema induzido de peroxidação lipídica microsomal [12].

Já os extratos em n-hexano, clorofórmio e acetato de etila das folhas de *E. alaternifolium* apresentaram propriedade antioxidante quase indetectável quando empregadas as técnicas de DPPH e ABTS. Apenas para fração em n-butanol foi encontrada propriedade antioxidante detectável (11,2 e 35,1 mg por Trolox/g de peso seco), demonstrando uma correlação entre o aumento desta propriedade com a utilização de solventes polares empregados na extração [36].

Outras duas espécies foram avaliadas quanto às suas atividades antioxidantes através do método de captação de DPPH, os extratos alcoólicos das folhas de *E. novogranatense* e *E. coca* apresentaram IC₅₀ de 271,20 µg/mL e 172,59 µg/mL, respectivamente [7]. A infusão aquosa de sachês de chá de *E. coca* adquiridos em comércio local do Chile apresentou como capacidade antioxidante o valor de 7,61 mM em equivalente de Trolox pelo método de ORAC [37].

Porém, destaca-se a capacidade de esteroides isolados das folhas de *E. monogynum*, em que 4-metil ergosta-7, 23-dien-3β-ol apresentou 100% de atividade antioxidante a 100 mg/mL para os ensaios de sequestro de DPPH e H₂O₂ e 4-metil ergosta-7, 24 (28)-dien-3β-ol demonstrou IC₅₀ de 38.74 mg/mL para sequestro de NO [20].

Atividade antimicrobiana

O extrato alcoólico das folhas de *E. novogranatense* em concentrações de 25 e 50 µg/mL apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* por difusão radial sobre as seguintes cepas orais: *Streptococcus mutans* (8,8 mm e 10,4 mm), *Lactobacillus acidophilus* (9,8 mm e 10,0 mm), *Actinomyces viscosus* (8,8 mm e 9,4 mm), *Prevotella melaninogenica* (12,6 mm e 13,4 mm) e *Fusobacterium nucleatum* (9,6 mm e 11,0 mm) [39]. O extrato a 1 g/mL das folhas de *E. novogranatense* também apresentou atividade antimicrobiana frente *Streptococcus epidermidis* (28 mm), *Escherichia coli* (24 mm) e *Pseudomonas aeruginosa* (19 mm) pelo método de difusão radial [7].

Outra espécie também apresentou propriedade contra tais microorganismos, o extrato das folhas de *E. coca* (1 g/mL) demonstraram halo de inibição de 33 mm frente *S. epidermidis*, 18 mm para *E. coli*, 23 mm para *P. aeruginosa* e 23 mm para *Staphylococcus aureus*, [7]. Já no que se refere à atividade antifúngica, os extratos aquosos e etanólicos das folhas de *E. coca* não apresentaram efeito sobre o crescimento de *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes*, mas sim para *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis* [39].

O extrato e as frações em diferentes concentrações de acetato de etila e metanol da casca de *E. caatingae* também foram avaliados através do método de difusão radial. No qual, obteve-se interessante atividade frente às cepas de *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus* e *C. albicans*, mas com um maior destaque para os halos de inibição de 13.5 a 29.5mm contra *Mycobacterium smegmatis* [22]. Já o estudo de Correia e colaboradores buscaram avaliar a atividade antifúngica dos extratos aquoso, alcoólico e hexânico das folhas de *E. subrotundum* e *E. daphnites* contra diferentes espécies de *Candida*. *E. subrotundum* demonstrou atividade contra as cepas de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* com valor de concentração inibitória mínima (CIM) de 1000 µg/mL [40].

Extratos brutos de *E. suberosum* também foram avaliados quanto a suas propriedades antibacterianas e antifúngicas. Os extratos da casca do caule (frações etanólica, hexânica,

diclocrometano, acetato de etila e hidrometanólica) apresentaram atividade frente diferentes cepas, com os valores de CIM para *C. albicans* (500 µg/mL), *C. glabrata* (125 µg/mL) *C. krusei* (62,5 µg/mL), *C. parapsilosis* (250 µg/mL), *S. aureus* (250 µg/mL) e *Cryptococcus neoformans* (250 µg/mL) [41].

Pilna e colaboradores buscaram avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de espécies medicinais contra culturas planctônicas de microrganismos cariogênicos, periodontais e candidais. Neste estudo, *E. catuaba* apresentou propriedade moderada, com concentração inibitória mínima de $IC_{50} \geq 256$ µg/mL para bactérias gram-positivas, gram-negativas e fermentadoras [42].

Os extratos das folhas de *E. macrocarpum* demonstraram possuir atividade antibacteriana alta (78,1 µg/mL) frente *P. fluorescens*, *Bacillus cereus* e *Klebsiella oxytoca*, moderada (156 µg/mL) frente *E. coli* e *Serratia marcescens* e fraca (625 µg/mL) para *P. aeruginosa* e *Salmonella entérica* [23]. Este estudo foi convergente ao realizado por Mahomoodally, Gurib-Fakim e Subratty, em que o extrato metanólico das folhas de *E. macrocarpum* também foram ativos contra *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* [43].

Para mais, Gurib-Fakim e colaboradores avaliaram a atividade dos extratos metanólicos e aquosos das folhas e do caule de *E. macrocarpum*, *E. hypericifolium*, *E. laurifolium* e *E. sideroxyloides* frente a *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhi*. Todas as espécies demonstraram propriedade antimicrobiana para pelo menos uma das cepas utilizadas, atividade esta atrelada à presença de quercitrina (Figura 2), isoquercitrina e catequina (Figura 6), substâncias isoladas das folhas das quatro espécies [44]. Contudo, houve destaque para *E. macrocarpum*, que se mostrou ativo frente a todas as bactérias testadas, e para *E. hypericifolium*, que apresentou atividade antifúngica para *Aspergillus niger*. Estes resultados se mostram semelhantes ao encontrado por outro estudo realizado com os extratos metanólicos da

casca do caule de *E. macrocarpum*, *E. sideroxyloides* e *E. laurifolium*, em que o CIM variou de 2 a 8 mg/mL para estas mesmas bactérias [45].

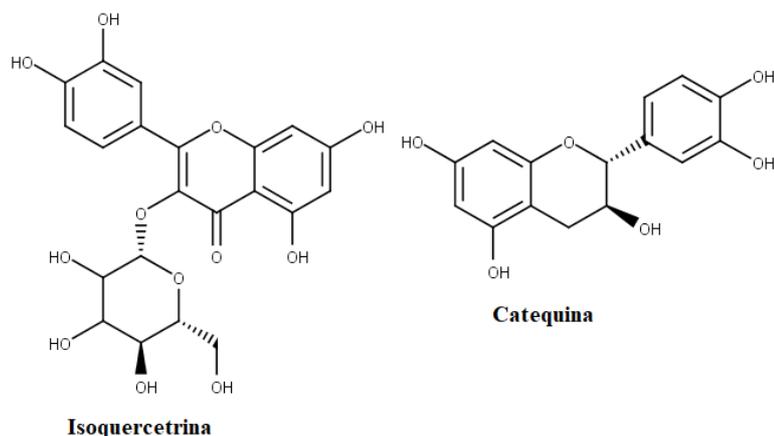


Figura 6 – Estruturas químicas de isoquercitrina, catequina

Além disso, extratos das folhas e *E. laurifolium* foram reportados por apresentar atividade inibitória do crescimento microbiano frente *Salmonella enteritidis*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *B. subtilis* e *C. albicans* [46]. Outrossim, extratos de *E. ovalifolium* apresentaram atividade antifúngica para *Stryphnodendron adstringens*, *Styrax spp.*, *Synadenium sp.* e *Symphytum officinale* [47].

Atividade antiprotozoária

Espécies do gênero *Erythroxyllum* foram analisadas quanto a sua propriedade antiplasmódica. Extratos das folhas de *E. monogynum* apresentaram uma interessante atividade antimalária, sendo o metanólico o mais promissor, com IC₅₀ de 12,23 µg/mL frente *Plasmodium falciparum* [48]. Em contrapartida, os extratos das folhas e da casca de *E. laurifolium* e *E. sideroxyloides* só possuíram capacidade em reduzir a população de *P. falciparum* em concentrações maiores que 50 µg/mL [35].

No que se refere à avaliação das atividades tripanocida e leishmanicida de espécies *Erythroxyllum*, os dados são praticamente inexistentes, demonstrando uma lacuna imensa de

estudos a serem realizados, com resultados inéditos a serem publicados. A única publicação encontrada investigou a atividade antiparasitária de 174 compostos e extratos de plantas do semi-árido baiano, dentre eles, uma substância pura isolada de *E. passerinum*, que na concentração de 0,1 mg/mL apresentou 21,39% de inibição para epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e 5,88% de inibição para promastigotas de *Leishmania amazonensis* [49].

Atividade antiviral

Ledoux e colaboradores avaliaram a atividade antiviral de extratos em acetato de etila das cascas e das folhas de *E. laurifolium* e *E. sideroxyloides* contra o vírus da chikunguya, no entanto, apenas o extrato da casca de *E. sideroxyloides* apresentou propriedade antichikunguya, com IC₅₀ de 22 µg/mL e índice de seletividade > 5,4 [35].

Outro estudo analisou a propriedade antiviral dos extratos metanólicos das folhas e casca de *E. laurifolium* frente os vírus Herpes simples tipo 1 (HSV-1) e Poliovírus tipo 2 (PV-2). Observou-se que os extratos não apresentaram capacidade de inibir o crescimento de PV-2, no entanto, se mostraram ativos para HSV-1 com IC₅₀ de 125 µg/mL e 16 de índice de seletividade [9]. Além disso, o extrato enriquecido de taninos a partir das folhas e casca e *E. laurifolium* na concentração de 2 mg/mL apresentou atividade virucida tempo-dependente para HSV-1, tal propriedade é justificada pelos taninos terem capacidade de afetar a replicação do vírus devido à sua habilidade de se complexar com proteínas do envelope celular [50].

Um complexo lignina-carboidrato da casca de *E. catuaba* foi estudada quanto a sua atividade anti-HIV e apresentou como índice de seletividade 43 [51, 52]. Já o extrato aquoso do tronco de *E. citrifolium* foi avaliado quanto a capacidade inibitória de proteases do HIV (HIV-1 PR) e se encontrou um valor de IC₅₀ de 43 µg/mL [53, 54].

Atividade imunomoduladora

Um estudo avaliou a capacidade dos extratos metanólicos e aquosos das folhas de *E. macrocarpum* em desencadear atividades da mieloperoxidase de fagócitos. Contudo, nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL, os extratos apresentaram baixa atividade imunomoduladora ao se comparar com o controle [55].

Atividade colinérgica e adrenérgica

Pervilleina A e seus análogos (±)- pervilleina H e (±)- cloridrato de pervilleina A (Figura 8), isolados de *E. pervillei*, foram estudados quanto ao seu efeito colinérgico e adrenérgico, visto que apresentam similaridade estrutural à cocaína e hiosciamina. O análogo (±)- cloridrato de pervilleina A apresentou atividade colinérgica fraca e não específica, além de bloqueio adrenérgico vascular. Já, (±)- pervilleina H foi inativo em todas as concentrações [56, 57].

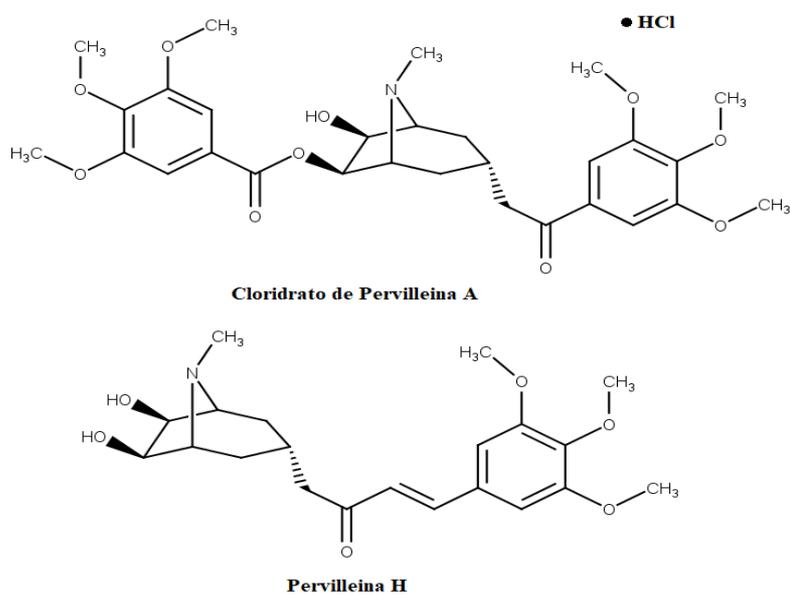


Figura 7 – Estrutura química dos análogos (±)- pervilleina H e (±)- cloridrato de pervilleina A

O alcaloide tropânico 7β-acetoxi-3β, 6β-dibenzoiloxitropano (Figura 8), isolado das folhas de *E. rimosum*, foi avaliado quanto a inibição da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), apresentando como valores de IC₅₀ 4,67x10³ mmol/L e 2,71x10⁴ mmol/L, respectivamente, efeito este significativo ao se comparar com obtido pelo controle com

fisostigmina [4]. Além disso, também foi descrito na literatura que o extrato das folhas de *E. macrocarpum* apresenta uma potente atividade inibitória da AChE com IC₅₀ de 0,04 mg de peso fresco por mL [23].

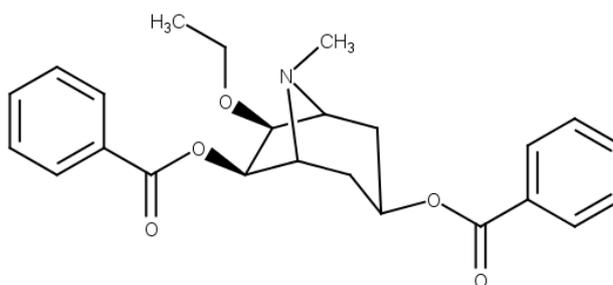


Figura 8 - 7β-acetoxi-3β, 6β-dibenzoiloxitropano

Atividade moduladora da CYP

Um estudo reportou a capacidade de extratos das folhas de *E. minutifolium* e *E. confusum* em modular o sistema citocromo P450 de hepatócitos de rato. Ambos os extratos produziram diminuição nas atividades de CYP1A2, CYP2E1 e SM4OH, ao passo que, não foram observadas a influência nos valores de CYP3A1, 2D2, e 2C6 [8].

Luck e colaboradores avaliaram misturas voláteis induzidas por ácido jasmônico de duas espécies *Erythroxylum*. O estudo concluiu que CYP79D60, CYP79D61 e CYP79D62 aceitam L-fenilalanina, L-leucina, L-isoleucina e L-triptofano como substratos, e que estes *in vivo* contribuem para a produção de compostos nitrogenados voláteis e semi-voláteis de defesa nitrogenada em *E. coca* e *E. fischeri* [58].

Atividade antiparkinsoniana

Astilbina (AST) (Figura 2), flavonoide isolado de espécies vegetais, em especial *E. gonocladum*, vem sendo relatado quanto a sua propriedade antiinflamatória, antioxidante e neuroprotetora. Nesse sentido, AST foi avaliado quanto seu potencial em tratar a doença de Parkinson (DP) induzido com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) em ratos. O AST apresentou capacidade de exercer efeitos neuroprotetores em camundongos DP induzidos

por MPTP, suprimindo a gliose, a superexpressão de α -sinucleína e o estresse oxidativo, sugerindo que o AST poderá ser empregado para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da DP [59].

Atividade hepatoprotetora

O efeito protetor no dano oxidativo induzido por modelos tóxicos em culturas de hepatócitos de ratos foram estudados para os extratos de *E. minutifolium* e *E. confusum*. Ambos os extratos apresentaram atividade hepatoprotetora, reduzindo dano aos hepatócitos causados por hidropéroxido de *tert*-butila (EC_{50} 72 a 83 $\mu\text{g/mL}$) e tetracloreto de carbono (EC_{50} 86 a 33 $\mu\text{g/mL}$), além de etanol e lipopolissacarídeo com $EC_{50} >100 \mu\text{g/mL}$ [60].

Outras atividades

Suliman e colaboradores buscaram determinar o efeito do extrato alcaloide das folhas de *E. cuneatum* contra dependência crônica à morfina e as influências nos processos de neurotransmissão *in vitro*. Sugeriu-se que *E. cuneatum* possui atividade antidependente contra a morfina, com propriedade similar à metadona, aumentando o tráfego de vesículas e liberação de neurotransmissores [61].

Quanto à atividade larvicida, os extratos metanólicos e em acetato de etila das folhas e frutas de *E. passerimum* e *E. numularia* se mostraram inativos frente às larvas de *Aedes aegypti* (L.), contudo, o composto 14-O-metil-rianodanol, diterpeno isolado de *E. nummularia*, apresentou leve atividade no teste larvicida com CL_{50} 82 ppm [62].

Também há relatos que *E. ovalifolium* e *E. subsessile* apresentam capacidade de neutralizar os efeitos tóxicos do veneno da serpente *Lachesis muta*. As frações e extratos em hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e butanol do caule de *Erythroxylum sp.* possuíram capacidade de inibir os efeitos de proteólise, coagulação, hemólise, hemorragia e edema do veneno de *L. muta*. O efeito antiveneno pode estar correlacionado à presença de

friedelina, lupeol e β -sitosterol na composição dos extratos, além dos flavonoides quercitrina e rutina [5].

Foram realizados estudos farmacológicos *in vitro* e *in vivo* de extratos brutos das folhas e raízes de *E. argentinum*. A espécie apresentou capacidade de reduzir a pressão arterial de rato e potenciaram o sono barbitúrico em camundongos, reduzir o edema induzido na pata de rato, relaxamento inespecífico no útero de rata e contração do íleo de cobaia. Além disso, os testes demonstraram que o extrato bruto ou frações semi-purificadas das folhas produziram uma ação semelhante à cocaína no canal deferente de rato. Observou-se que os constituintes de *E. argentinum* vêm a possuir distintas propriedades farmacológicas, dentre estas, destaca-se a antiinflamatória [63].

O efeito afrodisíaco e estimulante de uma amostra comercial da casca do caule de *E. vacciniifolium* foi avaliado *in vitro*, contudo não houve evidências de tais propriedades, pelo menos não no teste do corpo cavernoso de coelho, no qual não foi observado efeito na ereção e na libido [65]. No entanto, este resultado pôde ter sido encontrado pela amostra comercial ter uma menor concentração de catuabinas A, B, e C (Figura 11), substâncias relatadas como responsáveis pelo efeito afrodisíaco de *E. vacciniifolium* [66].

E. caatingae foi investigada quanto ao seu efeito miorelaxante do tecido muscular através da análise capacidade em reduzir a contratilidade do cérvix ovino. O extrato etanólico das folhas de *E. caatingae* em concentrações cumulativas (1–729 g/mL) diminuiu a amplitude da contratilidade *in vitro*, com EC₅₀ de 17,9 g/mL. O efeito miorelaxante pode envolver sinalização de óxido nítrico mediado por transdução celular de cGMP, relacionado com sequestro intracelular de cálcio [64].

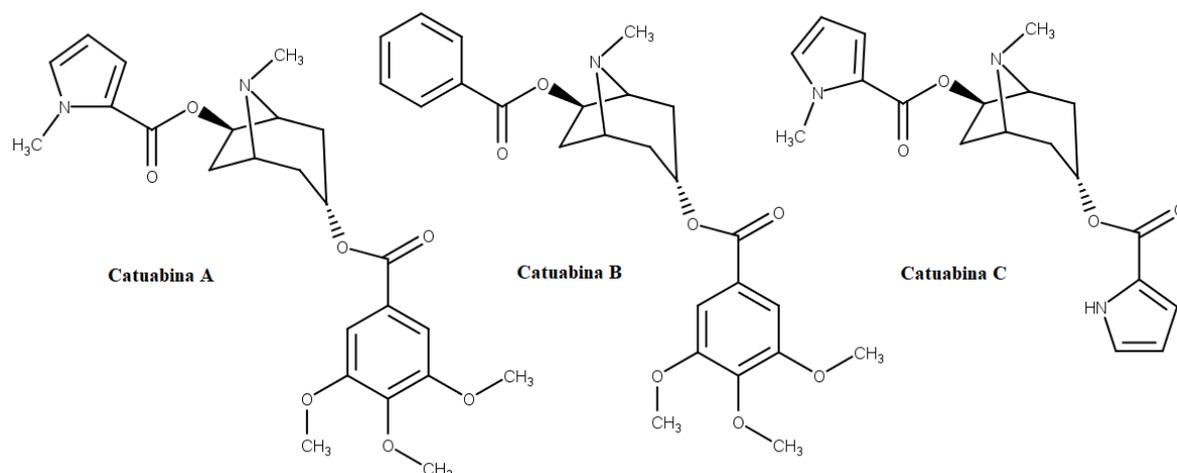


Figura 9 - Estruturas químicas das catuabinas A, B, C

Outras espécies também demonstraram interessantes efeitos no sistema muscular, os extratos aquosos e metanólicos das folhas e cascas de *E. sideroxyloides*, *E. hypericifolium*, *E. laurifolium* e *E. macrocarpum* apresentaram respostas de contração e relaxamento *in vivo* dos músculos lisos, músculos aortais e traqueais em animais de sangue frio [44].

O quadro 1 relaciona os trabalhos encontrados através da busca sistemática e respectivas informações sobre espécies estudadas, local da coleta, partes utilizadas e atividades biológicas avaliadas.

Quadro 1 – Espécies *Erythroxylum* avaliadas *in vitro* quanto à suas propriedades biológicas.

Espécie	Local de Coleta	Órgão da Planta / Substância isolada	Atividades Avaliadas	Referências
<i>E. alaternifolium</i>	Cuba	Folhas	Antioxidante	[36]
<i>E. argentinum</i>	Brasil	Folha Raiz	Analgésica Anti-inflamatória Anti-hipertensiva Hipnótica Efeito na contração e relaxamento muscular	[63]

<i>E. bezerrae</i>	Brasil	Eritrobezerrina A, B, C, D, E, F	Anticâncer	[33]
<i>E. caatingae</i>	Brasil	Folhas Casca	Antimicrobiana Anticâncer Efeito na contração e relaxamento muscular	[22, 64]
<i>E. catuaba</i>	República Tcheca	Casca do caule Catuabina A, B, C	Antimicrobiana Antiviral	[42, 51, 52]
<i>E. citrifolium</i>	Panamá	Tronco	Antiviral	[53, 54]
<i>E. coca</i>	Peru Chile Alemanha	Folhas	Antimicrobiana Antioxidante Moduladora da CYP	[7, 37, 39, 58]
<i>E. confusum</i>	Cuba	Folhas	Modulador CYP Hepatoprotetor	[8, 60]
<i>E. cuneatum</i>	Malásia	Folhas	Anticâncer Efeito antidependente da morfina	[11, 61]
<i>E. daphnites</i>	Ilha Maurícia Brasil	Folhas	Antimicrobiana Anticâncer	[21, 40]
<i>E. fischeri</i>	Quênia	Folhas	Modulador CYP	[58]
<i>E. gonocladum</i>	Brasil	Partes aéreas Astilbina	Anti-hipertensiva Tratamento Parkinson	[16, 59]
<i>E. hypericifolium</i>	Ilha Maurícia	Folhas Caule	Antimicrobiana Efeito na contração e relaxamento muscular	[44]
<i>E. laurifolium</i>	Ilha Maurícia	Folhas Casca Caule Quercitrina e afzelina	Antimicrobiana Antioxidante Anti-hipertensiva Anti-plasmódica Antiviral	[9, 15, 17, 18, 35, 44, 45, 46, 50]

			Efeito na contração e relaxamento muscular	
<i>E. macrocarpum</i>	Ilha Maurícia	Folhas Casca Galho Caule	Antimicrobiana Anticâncer Antioxidante Antidiabética Colinérgica e Adrenérgica Imunomoduladora	[14, 19, 23, 34, 43, 45, 55]
<i>E. minutifolium</i>	Cuba	Folhas	Modulador CYP Hepatoprotetor	[8, 60]
<i>E. monogynum</i>	Índia	4-metil ergosta-7, 23- dien-3 β -ol 4-metil ergosta-7, 24(28)-dien-3 β -ol	Antioxidante Antiplasmódica	[20, 48]
<i>E. novogranatense</i>	Peru	Folhas	Antimicrobiana	[7, 38]
<i>E. numulária</i>	Brasil	Folhas Frutas Rianodanol e 14-O-metil-rianodanol	Larvicida	[62]
<i>E. ovalifolium</i>	Brasil	Folhas Caule	Antimicrobiana Antídoto	[5, 12]
<i>E. passerimum</i>	Brasil	Folhas Frutas	Larvicida Tripanocida Leishmanicida	[49, 62]
<i>E. pervillei</i>	Madagascar	Pervilleina A, B, C, D, E, F (\pm)- Pervilleina H e (\pm)- Cloridato de Pervilleina A	Anticâncer Colinérgica e Adrenérgica	[27, 28, 29, 30, 31, 32, 56, 57]
<i>E. pungens</i>	Brasil	Folhas Caule Raízes	Anticâncer	[6]

<i>E. rimosum</i>	Brasil	7 β -acetoxi-3 β , 6 β -dibenzoiloxitropano	Colinérgica e Adrenérgica	[4]
<i>E. rotundifolium</i>	República Dominicana	Caule 6 β -Benzoiloxi-3R-(Z)-(3,4,5-trimetoxi-cinamoiloxi)tropano, 6 β -Benzoiloxi-3R-(Z)-(3,4,5-trimetoxi-cinamoiloxi)tropano, 6 β -Benzoiloxi-3R-(E)-(3,4,5-trimetoxi-cinamoiloxi)tropano 7 β -ol 7 β -Acetoxi-6 β -benzoiloxi-3R-(E)-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi) tropano	Anticâncer	[25, 31, 32]
<i>E. sideroxyloides</i>	Ilha Maurícia	Casca Caule Folhas	Antimicrobiana Antioxidante Antiplasmódica Antiviral Efeito na contração e relaxamento muscular	[12, 14, 15, 35, 44, 45]
<i>E. suberosum</i>	Brasil	Casca do caule Folhas	Antimicrobiana Anticâncer	[15, 24, 41]
<i>E. subrotundum</i>	Brasil	Folhas	Antimicrobiana	[40]
<i>E. subsessile</i>	Brasil	Caule	Antídoto	[5]
<i>E. vacciniifolium</i>	Brasil	Casca	Afrodisíaca	[65]

Potencialidades das espécies *Erythroxylum*

O gênero *Erythroxylum* se apresenta com ampla diversidade na produção de metabólitos secundários. A partir dos extratos das folhas, cascas, caules, partes aéreas, tronco e raízes, observou-se o isolamento de flavonoides, alcaloides, esteroides, terpenos, ácidos carboxílicos, dentre outros [16, 20, 23, 30, 62]. É importante destacar que as cascas do caule e as folhas foram os órgãos mais estudados, visto que tais partes são as empregadas na medicina popular para o

tratamento de diversas patologias. Partindo desse princípio, a partir da confirmação das atividades biológicas e das substâncias isoladas a partir de estudo *in vitro*, observa-se que a população tradicional vem selecionando corretamente o modo de uso de tais espécies [43, 44, 46].

Estudos etnobotânicos e fitoquímicos reportam uma ampla distribuição de *Erythroxylum* pelo globo, com um maior relato nos seguintes países: Cuba, Panamá, Índia, Ilha Maurícia, Brasil, Quênia, Madagascar, Malásia, Alemanha, República Dominicana, Peru e Chile. Apesar da maioria das espécies terem sido coletadas no Brasil, as duas espécies mais avaliadas quanto ao seu potencial farmacológico *in vitro* foram *E. laurifolium* e *E. macrocarpum*, cuja distribuição não é relatada no território brasileiro, demonstrando a necessidade da realização de mais estudos que avaliem o potencial farmacológico das espécies endêmicas do país.

Extensas são as atividades biológicas avaliadas através de estudos *in vitro* para o gênero, com um maior destaque para as propriedades anticâncer, antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva e antidiabética [7, 20, 37, 41]. Tais atividades vêm sendo justificadas pela presença de compostos ativos produzidos a partir do metabolismo secundário, em especial os flavonoides e alcaloides, isolados de espécies *Erythroxylum* [14, 16, 23, 25, 30, 33]. De forma semelhante, os extratos que apresentaram maior potencial biológico foram os que empregaram solventes polares e ácidos, uma vez que a utilização da influência do pH no momento da extração é responsável pela obtenção de frações ricas em alcaloides, e o emprego de solventes como etanol, metanol, n-butanol e água facilitam a extração de flavonoides, taninos e demais compostos fenólicos. Já os extratos que obtidos a partir de solventes de baixa a média polaridade, a exemplo de clorofórmio, acetato de etila, hexano e diclorometano, mostraram-se com menor potencial biológico ao se comparar com as demais frações [23, 34, 36, 40].

Os flavonoides são um grupo de moléculas com capacidade de desempenhar variadas propriedades farmacológicas e de inibir uma gama diversificada de enzimas. Essa classe de

compostos, juntamente com os alcaloides e demais compostos fenólicos, justificam diferentes propriedades dos extratos de espécies *Erythroxylum*, a exemplo da anti-hipertensiva, antibiótica e antioxidante [5, 23, 34]. A atividade anti-hipertensiva de *E. laurifolium* e *E. gonocladum* foi atribuída à flavonoides isolados de suas folhas e partes aéreas, visto que quando as proantocianidinas foram removidas do extrato de etanol de *E. laurifolium* por precipitação com gelatina, a atividade inibitória da ECA foi reduzida significativamente. Astilbina, quercitrina e afzelina promovem inibição *in vitro* da ECA, sendo seus valores dependentes no padrão de substituição dos grupos hidroxila [14, 15, 16].

A inibição do crescimento de bactérias gram positivas e gram negativas de *E. sideroxyloides*, *E. laurifolium*, *E. macrocarpum* e *E. hypericifolium* se correlacionam à presença de quercitrina, isoquercitrina e (+) – catequina em seus extratos [55]. Os compostos fenólicos, em especial taninos e flavonoides, também estão relacionados a atividade antimicrobiana e antifúngica de *E. novogranatense* [38], *E. coca* [39], *E. suberosum* [41], *E. subrotundum*, *E. daphnites* [40], *E. sideroxyloides*, *E. laurifolium*, *E. macrocarpum*, *E. hypericifolium* [44], *E. catuaba* [42] *E. ovalifolium* [47] e *E. caatingae* [22]. Tais compostos possuem diferentes mecanismos de ação antibiótica, podendo agir através da inibição da produção de ácido e da enzima glucosiltransferase [38]. Contudo, estudos demonstram que os alcaloides também podem ser responsáveis pela propriedade antimicrobiana de espécies *Erythroxylum* [39, 40].

A atividade antioxidante do gênero é atribuída aos compostos fenólicos dos vegetais, cujos mecanismos de ação estão atrelados a eliminação de radicais livres, propriedades quelantes de metais, capacidade de regular a expressão gênica e ação como co-antioxidantes [12, 34]. Os flavonoides e compostos fenólicos se mostram como importantes doadores de hidrogênio e promissores para reduzir o stress oxidativo, estes podem exercer capacidade em influenciar processos patológicos, a exemplo dos inflamatórios [63], diabetes, aterogênese [34],

doença de Alzheimer [59] e na modulação da CYP [8]. O efeito hepatoprotetor de *E. minutifolium* e *E. confusum* também têm sido associados à sua atividade antioxidante, visto que podem fornecer proteção para doenças do fígado ao inibir e eliminar radicais livres [60].

Os alcaloides são outra classe de metabólitos secundários amplamente encontrados em espécies *Erythroxylum*, substâncias estas reconhecidas pela sua potencial atividade anticâncer. Dos extratos de *E. pervillei* e *E. rotundifolium* foram isolados alcaloides tropânicos com capacidade de restaurar a sensibilidade VLB de células KB-V1 multirresistentes. O grupamento dos ésteres aromáticos do grupamento tropano reverte o fenótipo de multirresistências a quimioterápicos através da inibição da glicoproteína P. Para as pervilleinas, postula-se que a unidade *trans*-3,4,5-trimetoxicinamoil na posição C-6 pode ser o requisito estrutural fundamental para a atividade anticancer, já substituintes em C-3 e C- 7 podem desempenhar papéis menos importantes [25, 26, 28, 29, 30].

Os alcaloides tropânicos isolados de *E. bezerrae* também foram avaliados quanto a sua propriedade anticâncer, contudo apenas eritrobezerrina C apresentou propriedade significativa [33]. Mas não somente substâncias isoladas foram estudadas quanto ao seu potencial antineoplásico, o extrato clorofórmico das cascas de *E. caatingae* demonstrou aumento de morte por apoptose para as linhas celulares HEP-2 e K562, em que possivelmente os ácidos graxos saturados (ácidos oleico, palmitoléico, palmítico e esteárico) levam a ativação de proteínas BCL-2, além dos mediadores de morte celular Bim e Bax, desencadeando na apoptose por via mitocondrial [22]. Outro extrato apresentou atividade citotóxica através da ativação da apoptose, o extrato hexânico de *E. daphnites* reduziu a expressão intracelular de ciclinas D e E e da caspase-3 de células SCC-9 [21]. Já o extrato aquoso das folhas de *E. cuneatum* demonstrou atividade anticancer por outra via de morte celular, em que promoveu a necrose através da disruptura da membrana celular de células HepG2 [11].

A citotoxicidade de extrato de espécies *Erythroxylum* não se aplicam exclusivamente quanto a sua propriedade anticâncer, mas também no que se refere ao seu potencial como antiviral. As atividades anti-herpética e anti-HIV de extratos de folhas e caule de *E. laurifolium* vêm sendo atribuídas a presença de taninos em sua composição, que apresentam capacidade de afetar um ou vários estágios do ciclo de replicação dos vírus, após a penetração e descapsidação, além de se associarem a proteínas do envelope [9, 35, 50]. As espécies *E. catuaba* e *E. citrifolium* também apresentam interessante atividade anti-HIV [51, 53, 54, 66].

É importante destacar também as propriedades dos esteroides 4-metil ergosta-7, 23-dien-3 β -ol e 4-metil ergosta-7, 24(28)-dien-3 β -ol isolados de *E. monogynum*, que vêm demonstrando atividades antioxidantes, anti-glicação e inibidoras da xantina oxidase [2]. Além do alcaloide tropânico 7 β -acetoxi-3 β , 6 β -dibenzoiloxitropano, isolado das folhas de *E. rimosum*, com importante capacidade na inibição de AChE e BuChE [4]. E para mais, o flavonoide astibilina com efeito neuroprotetor, suprimindo a gliose, a superexpressão de α -sinucleína e do estresse oxidativo [59].

Por fim, é necessário ressaltar que a apresentação de uma maior ou menor atividade biológica *in vitro*, além da divergência de resultados entre estudos podem ser justificados por diferentes fatores inerentes à produção de metabolitos secundários de espécies vegetais. Sabe-se que o estado de maturação do órgão recolhido, diferentes locais, estação do ano e horário de coleta, atrelados aos fatores bióticos e abióticos aos quais as plantas foram expostas, podem influenciar na produção e diferentes compostos para uma mesma espécie, ou no quantitativo de substância produzida, influenciando diretamente na atividade biológica avaliada [3].

Finalmente, diversas espécies do gênero *Erythroxylum* apresentaram suas propriedades biológicas validadas através de estudos *in vitro*, corroborando para a ratificação do seu uso popular para diferentes patologias, com destaque para as atividades antioxidante, antibiótica, anticâncer, anti-hipertensiva, antidiabética, neuroprotetora, dentre outras. O gênero

Erythroxylum é composto por 230 espécies distribuídas em todo o globo, no entanto, apesar de muitos artigos terem sido publicados empregando tais vegetais, foram encontrados estudos validando as propriedades biológicas de apenas 30 espécies, constatando a lacuna de vegetais do gênero a serem avaliados. Destaca-se a atividade anticâncer dos alcaloides de *E. pervillei*, *E. rotundifolium* e *E. pugens*, a propriedade antimicrobiana de extratos de *E. novogranatense*, *E. macrocarpum*, *E. caatingae*, *E. hypericifolium*, e *E. sideroxyloide*, o efeito antiparkinson a partir do composto isolado de *E. gonocladum*, além de *E. laurifolium* por suas atividades antidiabética, anti-hipertensiva, antiviral e antioxidante. Portanto, observa-se a necessidade da realização de mais estudos a fim de elucidar as atividades biológicas de *Erythroxylum sp.*, visto que o gênero se mostrou promissor para o desenvolvimento de medicamentos para as mais diversas indicações, além de contribuir com a validação do seu extenso uso popular.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA) e ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada (PGQA) da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) pela colaboração e apoio ao trabalho.

CONFLITO DE INTERESSES

Nenhum potencial conflito de interesse foi relatado pelos autores.

REFERÊNCIAS

1. J.S. Lins, A.R.R.A. Silva, C.A.G. Dantas, M.C. Duarte, A.P.N. Prata, R.N.S. Filho, J.F. Tavares, M.S. Silva, V.C.O. Costa, Busca por metabólitos secundários na espécie *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz, *Revista Virtual de Química*, **11** (2), 468-474 (2019).
2. D.A. Restrepo, E. Saenz, O.A. Jara-Muñoz, I.F. Calixto-Botía, S. Rodríguez-Suárez, P. Zuleta, B.G. Chavez, J.A. Sanchez, J.C. D’Auria, *Erythroxylum in Focus: An Interdisciplinary Review of an Overlooked Genus*, *Molecules*, **24** (20) 3788 (2019).

3. C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick, *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*, Artmed, Porto Alegre, 2017, Vol. 3, p. 486.
4. E.M.O. Ribeiro, L.S. Lima, J.M. David, A.E. Vale, L.M.X. Lopes, J.P. David, A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae), *Phytochemistry Letters*, **6**, 232–235 (2013).
5. E.C. Oliveira, R.A.S. Cruz, N.M. Amorim, M.G. Santos, L.C.S.P. Junior, E.O.F. Sanchez, C.P. Fernandes, R. Garrett, L.M. Rocha, A.L. Fuly, Protective effect of the plant extracts of *Erythroxylum* sp. against toxic effects induced by the venom of *Lachesis muta* snake, *Molecules*, **21** (1350), (2016).
6. G.M. Pereira, L.G.L. Moreira, T.S.N. Neto, W.A.M. Almeida, J. Almeida-Lima, H.A.O. Rocha, E.G. Barbosa, J.A.S. Zuanazzi, M.V. Almeida, R.M. Grazul, A. Navarro-Vázquez, F. Hallwass, L.S. Ferreira, M.F. Fernandes-Pedrosa, R.B. Giordani, Isolation, spectral characterization, molecular docking, and cytotoxic activity of alkaloids from *Erythroxylum pungens* O. E. Shulz. *Phytochemistry*, **155**, 12–18 (2018).
7. V. Gamarra, C. Fuertes, N. Chávez, D. Contreras, E. Goya, K. Huamantumba, F. Retuerto, G.R. Pacco, Metabolitos detectados en las hojas de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron y evaluación de sus propiedades biológicas mediante bioensayos, *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, **2** (4), 828-234 (2017).
8. I. Rodeiro, M.T. Donato, A. Lahoz, J.A. González-Lavaut, A. Laguna, J.V. Castell, R. Delgado, M.J. Gómez-Lechón, Modulation of P450 enzymes by Cuban natural products rich in polyphenolic compounds in rat hepatocytes, *Chemico-Biological Interactions*, **172** (1), 1–10 (2008).
9. H. Fortin, C. Vigor, F. Lohézic-Le Dévéhat, V. Robin, B. Le Bossé, J. Boustie, M. Amoros, *In vitro* antiviral activity of thirty-six plants from La Reunion Island, *Fitoterapia*, **73**, 346-350 (2002).

10. M.S. Al-Said, W.C. Evans, R.J. Grout., Alkaloids of *Erythroxylum macrocarpum* and *E. sideroxyloides*, *Phytochemistry*, **25** (4), 851–853 (1986).
11. R.K. Wesam, A.N. Ghanya, H.H. Mizaton, M. ILham, A. Aishah, Assessment of genotoxicity and cytotoxicity of standardized aqueous extract from leaves of *Erythroxylum cuneatum* in human HepG2 and WRL68 cells line, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **6** (10), 811-816 (2013).
12. M.A. Soobrattee, T. Bahorun, V.S. Neergheen, K. Googoolye, O.I. Aruoma, Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants, *Toxicology in Vitro*, **22**, 45–56 (2008).
13. M.A. Piriz, C.A.B. Lima, C.M.R. Jardim, M.K. Mesquita, A.D.Z. Souza, R.M. Heck, Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **16** (3), 628-636 (2014).
14. K. Hansen, A. Adersen, U.W. Smiti, U. Nyman, S.B. Christensen, C. Schwartzner, H. Wagner, Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Erythroxylum laurifolium*, *Phytomedicine*, **2** (4), 313-317 (1996).
15. N. Rummun, V.S. Neergheen-Bhujun, K.B. Pynee, C. Baider, T. Bahorun, The role of endemic plants in Mauritian folkloric medicine - Therapeutic efficacy or placebo effect? *Journal of Ethnopharmacology*, **213**, 111-117 (2017).
16. M.D. Lucas-Filho, G.C. Silva, S.F. Cortes, T.R. Mares-Guia, V. Perpétua Ferraz, C.P. Serra, F.C. Braga, ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) O.E. Schulz, *Phytomedicine*, **17**, 383–387 (2010).
17. C.M.N. Picot, A.H. Subratty, M.F. Mahomoodally, Inhibitory potential of five traditionally used native antidiabetic medicinal plants on α -amylase, α -glucosidase, glucose entrapment, and amylolysis kinetics *in vitro*, *Advances in Pharmacological Sciences*, **2014**, (2014).

18. SHORI, A. B. Screening of antidiabetic and antioxidant activities of medicinal plants, *Journal of Integrative Medicine*, v. **13** (5), 297–305 (2015).
19. F.M. Mahomoodally, A.H. Subratty, A. Gurib-Fakim, M.I. Choudhary, Antioxidant, antiglycation and cytotoxicity evaluation of selected medicinal plants of the Mascarene Islands, *Complementary and Alternative Medicine*, **12** (165), (2012)
20. G. Bindu, R.K., Suripeddi, Development and validation of HPTLC method for identification and quantification of sterols from leaves of *Erythroxylum monogynum* Roxb. and in vitro evaluation of anti-oxidant and anti-glycation activities, *South African Journal of Botany*, **137**, 24-34 (2021).
21. S.T. Elias, C.C.S. Macedo, L.A. Simeoni, D. Silveira, P.O. Magalhães, A. Lofrano-Porto, R.D. Coletta, F.A.R. Neves, E.N.S. Guerra, Cytotoxic effect of *Erythroxylum daphnites* extract is associated with G1 cell cycle arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma, *Cell Cycle*, **15** (7), 948–956 (2016).
22. J.S. Aguiar, R.O. Araújo, M.D. Rodrigues, K.X.F.R. Sena, A.M. Batista, M.M.P Guerra, S.L Oliveira, J.F. Tavares, M.S. Silva, S.C. Nascimento, T.G. Silva, Antimicrobial, antiproliferative and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman, *International Journal of Molecular Sciences*, **13** (4), 4124–4140 (2012).
23. P. Ramhit, L. Rago, T. Bahorun, V.S. Neergheen-Bhujun, Multi-targeted effects of untapped resources from the Mauritian endemic flora, *South African Journal of Botany*, **115**, 208–216 (2018).
24. T.B.C. Macedo, S.T. Elias, H.M. Torres, F.P. Yarnamoto-Silva, D. Silveira, P.O. Magalhães, A. Lofrano-Porto, E.N.S. Guerra, M.A.G. Silva. Cytotoxic effect of *Erythroxylum suberosum* combined with radiotherapy in head and neck cancer cell lines. *Brazilian Dental Journal*, *Brazilian Dental Journal*, **27** (1), 108-112 (2016).

25. D. Chávez, B. Cui, H.B. Chai, R. García, M. Mejía, N.R. Farnsworth, G.A. Cordell, J.M. Pezzuto, A.D. Kinghorn, Reversal of multidrug resistance by tropane alkaloids from the stems of *Erythroxylum rotundifolium*, *Journal of Natural Products*, **65** (4), 606–610 (2002).
26. P. Joshi, R.A. Vishwakarma, S.B. Bharate, Natural alkaloids as P-gp inhibitors for multidrug resistance reversal in cancer, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **138**, 273–292 (2017).
27. G.L. Silva, B. Cui, D. Chávez, M. You, H.B. Chai, P. Rosoanaivo, S.M. Lynn, M.J. O’Neill, J.A. Lewis, J.M. Besterman, A. Monks, N.R. Farnsworth, G.A. Cordell, J.M. Pezzuto, A.D. Kinghorn, Modulation of the multidrug-resistance phenotype by new tropane alkaloid aromatic esters from *Erythroxylum pervillei*, *Journal of Natural Products*, **64** (12), 1514–1520 (2001).
28. Q. Mi, B. Cui, D. Chávez, H. Chai, G.A. Cordell, S. Hedayat, H. Zhu, A.D. Kinghorn, J.M. Pezzuto, Characterization of novel tropane alkaloid aromatic esters that reverse the multidrug-resistance phenotype, *Anticancer Research*, **22** (3), 1385–1398 (2002).
29. M. Wang, Z.F. Liu, H. Tang, B.A. Chen, Application of alkaloids in reversing multidrug resistance in human cancers, *Chinese Journal of Natural Medicines*, **16** (8), 561–571 (2018).
30. Q. Mi, B. Cui, D. Lanvit, E. Reyes-Lim, H. Chai, J.M. Pezzuto, A.D. Kinghorn, S.M. Swanson, Pervilleine F, a new tropane alkaloid aromatic ester that reverses multidrug resistance. *Anticancer Research*, **23** (5), 3607–3615 (2003).
31. H.M. Abdallah, A.M. Al-abd, R.S. El-Dine, A.M. El-Halawany, P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review, *Journal of Advanced Research*, **6**, 45–62 (2015).
32. Q. Mi, B. Cui, G.L. Silva, D. Lanvit, E. Lim, H. Chai, M.G. Hollingshead, J.G. Mayo, A.D. Kinghorn, J.M. Pezzuto, Pervilleines B and C, new tropane alkaloid aromatic esters that reverse the multidrug-resistance in the hollow fiber assay, *Cancer Letters*, **84** (1), 13–20 (2002).

33. L.S.O. Brito, F.C.L. Pinto, M.O.M. Filho, D.D. Rocha, M.F.M. Mendonza, A.P. Ayala, B.P. Bezerra, M.I.B. Loiola, K.M. Canuto, E.R. Silveira, O.D.L. Pessoa, Tropane alkaloids from the stem bark of *Erythroxylum bezerrae*. *Phytochemistry*, **178** (112458), (2020).
34. V.S. Neergheen, T. Bahorun, L.S. Jen, O. Aruoma, Bioefficacy of mauritian endemic medicinal plants: assessment of their phenolic contents and antioxidant potential. *Pharmaceutical Biology*, **45** (1), 9-17 (2007).
35. A. Ledoux, M. Cao, O. Jansen, M. Lucia, P.E. Campos, B. Payet, P. Clerc, I. Grodin, E. Girad-Valenciennes, T. Hermann, M. Litaudon, C. Vanderheydt, L. Delang, J. Neyts, P. Leyssen, M. Frederich, J. Smadla, Anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **52** (5), 622-628 (2018).
36. W.H.P. Córdova, M.G. Matos, J. Tabart, C. Kevers, J. Dommes, *In vitro* characterization of antioxidant properties of Cuban endemic varieties of *Erythroxylum alaternifolium* A. Rich. Isolation of two flavonol glycosides, *Journal of the Chilean Chemical Society*, **57** (4), 1340-1343 (2012).
37. A. Poblete, C. López-Alarcón, E. Lissi, A.M. Campos, Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) values of herbal teas obtained employing different methodologies can provide complementary data. *Journal of the Chilean Chemical Society*, **54** (2), 154-157 (2009).
38. V.A. Villanueva, H.M. Nakata, Plantas medicinales: Efecto antibacteriano *in vitro* de *Plantago major* L, *Erythroxylum novogranatense*, Plowman var truxillense y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importância estomatológica, *Odontología Sanmarquina*, **13** (2), 21-25 (2010).
39. L.M. Luna-Vílchez, C.D. Díaz-Vélez, F.B. Baca-Dejo, Efecto del extracto acuoso, ácido y alcohólico de las hojas secas de *Erythroxylum coca* var coca (coca) en *Trichophyton rubrum*,

Trichophyton mentagrophytes, *Microsporum canis* y *Candida albicans* in vitro, *Horizonte Médico*, **17** (1), 25- 30 (2017).

40. A.F. Correia, D. Silveira, Y.M. Fonseca-Bazzo, P.O. Magalhães, C.W. Fagg, E.C. Silva, S.M. Gomes, L. Gandolfi, R. Pratesi, Y.K.M. Nóbrega, Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species, *Complementary and Alternative Medicine*, **16** (203), (2016).

41. I.M.P. Violante, L. Hamerski, W.S. Garcez, A.L. Batista, M.R. Chang, V.J. Pott, F.R. Garcez, Antimicrobial activity of some medicinal plants from the Cerrado of the central-western region of Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology*, **43** (4),1302–1308, (2012).

42. J. Pilna, E. Vlkova, K. Krofta, V. Nesvadba, V. Rada, L. Kokoska, *In vitro* growth-inhibitory effect of ethanol GRAS plant and supercritical CO₂ hop extracts on planktonic cultures of oral pathogenic microorganisms. *Fitoterapia*, **105**, 260–268 (2015).

43. F.M. Mahomoodally, A. Gurib-Fakim, A.H. Subratty, Antimicrobial Activities and Phytochemical Profiles of Endemic Medicinal Plants of Mauritius, *Pharmaceutical Biology*, **43** (3), 237-242 (2005).

44. A. Gurib-Fakim, H. Subratty, F. Narod, J. Govinden-Soulange, F. Mahomoodally, Biological activity from indigenous medicinal plants of Mauritius, *Pure and Applied Chemistry*, **77** (1), 41–51 (2005).

45. L. Jelager, A. Gurib-Fakim, A. Adsersen, Antibacterial and antifungal activity of medicinal plants of Mauritius, *Pharmaceutical Biology*, **36** (3), 153–161 (1998).

46. O. Rangasamy, G. Raelison, F.E. Rakotoniriana, K. Cheuk, S. Urverg-Ratsimamanga, J. Quetin-Leclercq, A. Gurib-Fakim, A.H. Subratty, Screening for anti-infective properties of several medicinal plants of the Mauritian flora, *Journal of Ethnopharmacology*, **109**, 331–337 (2007).

47. M.D.C. Sales, H.B. Costa, P.M.B. Fernandes, J.A. Ventura, D.D. Meira, Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **6** (1), 26-31 (2016).
48. V. Venkatesalu, N. Gopalan, C.R. Pillai, V. Singh, M. Chandrasekaran, A. Senthilkumar, N. Chandramouli, *In vitro* anti-plasmodial activity of some traditionally used medicinal plants against *Plasmodium falciparum*, *Parasitology Research*, **111**, 497–501 (2012).
49. J.F.O. Costa, *Investigação de atividades anti-Leishmania amazonensis, anti-Trypanosoma cruzi e imunomoduladora em extratos de plantas do semi-árido brasileiro*, dissertação de mestrado, Universidade Federal da Bahia, 2004, pp. 79
50. F. Lohezic, M. Amoros, J. Boustie, L. Girre, Antiherpetic activity of *Erythroxylon laurifolium* (Erythroxylaceae), *Pharmacy and Pharmacology Communications*, **5** (3), 249–253 (1999).
51. H. Manabe, H. Sakagami, H. Ishizone, H. Kusano, M. Fujimaki, C. Wada, N. Komatsu, H. Nakashima, T. Murakami, N. Yamamoto, Effects of Catuaba extracts on microbial and HIV infection, *In Vivo*, **6** (2), 161–166 (1992).
52. H. Sakagami, T. Kushida, T. Oizumi, H. Nakashima, T. Makino, Distribution of lignin-carbohydrate complex in plant kingdom and its functionality as alternative medicine, *Pharmacology & Therapeutics*, **128** (1), 91–105 (2010).
53. A. Mandal, D. Biswas, B. Hazra, Natural products from plants with prospective anti-HIV activity and relevant mechanisms of action, *Studies in Natural Products Chemistry*, **66** (1), 225-271 (2020).
54. I.I. Matsuse, Y.A. Lim, M. Hattori, M. Correa, M.P. Gupta, A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes, *Journal of Ethnopharmacology*, **64** (1), 15–22 (1999).

55. F.M. Mahomoodally, A. Mesaik, M.I. Choudhary, A.H. Subratty, A. Gurib-Fakim, *In vitro* modulation of oxidative burst via release of reactive oxygen species from immune cells by extracts of selected tropical medicinal herbs and food plants, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **5** (6), 440-447 (2012).
56. Y.W. Chin, W.P. Jonest, T.J. Waybright, T.G. McCloud, P. Rasoanaivo, G.M. Cragg, J.M. Cassady, A.D. Kinghorn, Evaluation of the cholinergic and adrenergic effects of two tropane alkaloids from *Erythroxylum pervillei*, *Phytotherapy Research*, **21** (10), 1002–1005 (2007).
57. Z. Zhao, H. Song, J. Xie, T. Liu, X. Zhao, X. Chen, X. He, S. Wu, Y. Zhang, X. Zheng, Research progress in the biological activities of 3,4,5-trimethoxycinnamic acid (TMCA) derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **173**, 213-227 (2019).
58. K. Luck, J. Jirschitzka, S. Irmisch, M. Huber, J. Gershenzon, T.G. Köllner, CYP79D enzymes contribute to jasmonic acid-induced formation of aldoximes and other nitrogenous volatiles in two *Erythroxylum* species, *BMC Plant Biology*, **16** (215), (2016).
59. Y.L. Zhu, M.F. Sun, X.B. Jia, K. Cheng, Y.D. Xu, Z.L. Zhou, P.H. Zhang, C.M. Oiao, C. Cui, X. Chen, X.S. Yang, Y.O. Shen, Neuroprotective effects of Astilbin on MPTP-induced Parkinson's disease mice: Glial reaction, α -synuclein expression and oxidative stress, *International Immunopharmacology*, **66**, 19–27 (2019).
60. I. Rodeiro, M.T. Donato, I. Martínez, I. Hernández, G. Garrido, J.A. González-Lavaut, R. Menéndez, A. Laguna, J.V. Castell, M.J. Gómez-Lechón, Potential hepatoprotective effects of new Cuban natural products in rat hepatocytes culture, *Toxicology in Vitro*, **22**, 1242–1249 (2008).
61. N.A. Suliman, M.A.M. Moklas, C.N.M. Taib, M.I. Adenan, M.T.H. Baharuldin, R. Basir, Z. Amom, Morphine antidependence of *Erythroxylum cuneatum* (Miq.) Kurz in neurotransmission processes *in vitro*, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2016**, (2016).

62. M.L. Barreiros, J.P. David, J.M. David, L.M.X. Lopes, M.S. Sá, J.F.O. Costa, M.Z. Almeida, Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species. *Phytochemistry*, **68** (13), 1735–1739 (2007).
63. R.N. Takahashi, J.B. Calixto, I.M. Costa, T.C.M. Lima, G.S. Morato, M. Nicolau, G.A. Rae, R.M.R. Valle, R.A. Yunes, Análise Química e Perfil Farmacológico de *Erythroxylum argentinum*, *Supl. Acta. Amazônica*, **18** (1-2), 407-429 (1998).
64. K.C. Santos, A.P.O. Monte, J.T. Lima, L.A.A. Ribeiro, R.C. Palheta-Junior, Role of NO–cGMP pathway in ovine cervical relaxation induced by *Erythroxylum caatingae* Plowman, *Animal Reproduction Science*, **164**, 23-30 (2016).
65. C. Kletter, S. Glasl, A. Presser, I. Werner, G. Reznicek, S. Narantuya, S. Cellek, E. Haslinger, J. Jurenitsch, Morphological, chemical and functional analysis of catuaba preparations. *Planta Medica*, **70** (10), 993-1000 (2007).
66. B. Zanolari, D. Guilet, A. Marston, E.F. Queiroz, M.Q. Paulo, K. Hostettmann, Tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium*, *Journal of Natural Products*, **66** (4), 497–502 (2003).