



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM QUÍMICA

THAMILA MENEZES GUERRA

ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR DE DERIVADOS DA TIAZOLIDINA COMO
POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA CRUZAÍNA DE *Trypanosoma cruzi*

SERRA TALHADA-PE

2019

THAMILA MENEZES GUERRA

ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR DE DERIVADOS DA TIAZOLIDINA COMO
POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA CRUZAÍNA DE *Trypanosoma cruzi*

Monografia apresentada ao curso de licenciatura em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco/ Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como requisito parcial à obtenção do título de licenciada em química.

Orientador: Prof. Dr. Túlio Ricardo Couto de Lima Souza.

SERRA TALHADA-PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca da UAST, Serra Talhada - PE, Brasil.

G934e Guerra, Thamila Menezes

Estudos de docking molecular de derivados da tiazolidina como potenciais inibidores da enzima cruzaina de trypanosoma cruzi / Thamila Menezes Guerra. – Serra Talhada, 2019.

58 f. : il.

Orientador: Túlio Ricardo Couto de Lima Souza

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Química) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Unidade Acadêmica de Serra Talhada, 2019.

Inclui referências e apêndices.

1. Doenças transmissíveis. 2. Chagas, Doença de. 3. Saúde pública. I. Souza, Túlio Ricardo Couto de Lima, orient. II. Título.

CDD 540

THAMILA MENEZES GUERRA

ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR DE DERIVADOS DA TIAZOLIDINA COMO
POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA CRUZAÍNA DE *Trypanosoma cruzi*

Monografia Apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco/
Unidade Acadêmica de Serra Talhada como pré-requisito para obtenção
do título de licenciada em química.

Aprovada em, 07 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo de Castro Aguiar
(Universidade Federal Rural de Pernambuco –
Unidade Acadêmica de Serra Talhada)

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva
(Universidade Federal Rural de Pernambuco –
Unidade Acadêmica de Serra Talhada)

Prof. Dr. Túlio Ricardo Couto de Lima Souza.
(Universidade Federal Rural de Pernambuco –
Unidade Acadêmica de Serra Talhada)

SERRA TALHADA-PE

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido forças para enfrentar todos os obstáculos que surgiram durante toda minha caminhada e por me mostrar que a persistência pode trazer bons frutos. Sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, Cida e George, pelos sacrifícios e batalhas que enfrentamos juntos em prol de uma melhor qualidade de vida não só para mim, mas também para minhas irmãs. E a toda minha família que sempre esteve presente.

Ao meu orientador, Túlio Couto, por me aceitar como sua orientanda, pela paciência, incentivo, compromisso e dedicação. Sou muito grata por tudo que aprendi com você durante minha vida acadêmica, és um exemplo de profissional e ser humano.

Ao professor Eduardo Castro, por todo o apoio dado no Laboratório de Simulação Computacional, tenho muita admiração pelo profissional que és.

Agradeço em especial a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica.

E por fim, agradeço a todos meus amigos, de forma geral, por todos os momentos de descontração que tornaram a vida acadêmica mais leve. Porém, em especial agradeço ao meu querido amigo Lucas Matheus, por ter me ajudado durante toda a construção do meu trabalho, por me incentivar, por está sempre presente, por ser essa pessoa incrível, obrigada imensamente por tudo que fez por mim.

RESUMO

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma infecção parasitária causada pelo parasita flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) e se constitui em um dos maiores problemas de saúde pública das regiões endêmicas, trazendo consequências devastadoras em termos de morbidade e mortalidade humana. As formas de tratamento contra a doença são bastante limitadas e insuficientes em todos os aspectos clínicos. Visando o desenvolvimento de novos agentes antichagásicos, várias proteínas do parasita têm sido exploradas como alvos terapêuticos. Nesse contexto, a enzima cruzaina, uma cisteinoprotease envolvida em todos os estágios de desenvolvimento e diferenciação do *T. cruzi* e essencial para a replicação do parasita intracelular foi selecionada para nossos estudos, visando a identificação de possíveis inibidores. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi investigar a ação tripanocida de oito compostos da classe tiazolidina *in silico*, onde foram realizados estudos de docking molecular tendo como alvo a enzima cruzaina, utilizando-se a estrutura cristalográfica do PDB ID: 1U9Q, e a análise das propriedades que afetam as características de absorção e distribuição desses compostos candidatos a fármacos foram avaliadas através das plataformas pkCMS e SwissADME, a fim de realizar um comparativo dos resultados experimentais encontrados no trabalho realizado pelo Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) da UFPE, com os resultados teóricos encontrados neste trabalho. Como resultado do docking e análise das interações intermoleculares, observou-se que os complexos proteína-ligante formados se dão principalmente por meio de interações hidrofóbicas, sendo os compostos 5D (bromo-indole-;3-4-dicloro) e 5G (bromo-indole-metilsulfanil) os que apresentaram maior interação com a cruzaina com energias de ligação de -8,24 e -8,16 kcal.mol⁻¹, respectivamente. E que a todos ligantes realizam interações com a Cys25, resíduo importante que compõe a tríade catalítica da enzima. Foi verificado que os resultados dos testes experimentais utilizados como estudo comparativo para a pesquisa teórica desse trabalho não foram compatíveis com os complexos que apresentaram maior energia de interação, uma vez que, o foco dos testes *in vitro* não era necessariamente a cruzaina, portanto, testes de inibição da proteína seriam necessários. O perfil farmacocinético dos compostos em estudo evidenciou que eles devem apresentar boas características de absorção e distribuição.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, cruzaina, docking molecular, ligantes tiazolidínicos, perfil farmacocinético.

ABSTRACT

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a parasitic infection caused by the flagellate parasite *Trypanosoma cruzi* (T.cruzi) and constitutes one of the greatest public health problems in endemic regions, with devastating consequences in terms of morbidity and mortality human. The forms of treatment against the disease are quite limited and insufficient in all clinical aspects. Aiming at the development of novel antichagasic agents, various parasite proteins have been exploited as therapeutic targets. In this context, the enzyme cruzain, a cysteine protease involved in all stages of development and differentiation of *T. cruzi* and essential for the replication of the intracellular parasite, was selected for our studies, aiming at the identification of possible inhibitors. Thus, the objective of this work was to investigate the trypanocidal action of eight compounds of the thiazolidine class in silico, where molecular docking studies were carried out with the cross-enzyme target, using the crystallographic structure of PDB ID: 1U9Q, and the analysis of the properties that affect the absorption and distribution characteristics of these drug candidate compounds were evaluated through the pkCMS and SwissADME platforms in order to perform a comparison of the experimental results found in the work carried out by the Laboratory of Chemistry and Therapeutic Innovation (LQIT) of UFPE, with the theoretical results found in this work. As a result of the docking and analysis of the intermolecular interactions, it was observed that the protein-ligand complexes formed mainly occur through hydrophobic interactions, the compounds 5D (bromo-indole-, 3-4-dichloro) and 5G (bromo- indole-methylsulfanyl) which showed the highest interaction with cruzaine with binding energies of -8.24 and -8.16 kcal.mol⁻¹, respectively. And that all ligands perform interactions with Cys25, an important residue that makes up the catalytic triad of the enzyme. It was verified that the results of the experimental tests used as a comparative study for the theoretical research of this work were not compatible with the complexes that presented higher interaction energy, since the focus of the in vitro tests was not necessarily the cruzaine, therefore, tests of protein inhibition would be required. The pharmacokinetic profile of the compounds under study showed that they should have good absorption and distribution characteristics.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, cruzaine, molecular docking, thiazolidine linkers, pharmacokinetic profile

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i>	18
Figura 2. Principais vetores do <i>T. cruzi</i> . A - <i>Triatoma infestans</i> , B - <i>Rhodnius prolixus</i> e C - <i>Triatoma dimidiata</i>	19
Figura 3. Estruturas químicas dos fármacos A – benznidazol e B - nifurtimox.....	21
Figura 4. Estrutura cristalográfica da enzima cruzaina com destaque para os resíduos de aminoácidos.....	23
Figura 5. Enzima cruzaina, com ênfase no sítio catalítico demonstrando os subsítios.....	23
Figura 6. Mecanismo de catálise da papaína e suas semelhantes.....	24
Figura 7. Anel tiazolidínico.....	29
Figura 8. Estrutura química do composto tiazolidina LPSF SF29.	30
Figura 9. Resultado da concepção de novos híbridos de tiazolidinona-pirazolina.....	30
Figura 10. Anel indol.....	31
Figura 11. 2-aminofenilnaftoquinonas e compostos relacionados utilizados no crescimento de cultura de <i>T. cruzi</i>	31
Figura 12. Estrutura química base dos derivados do benzimidazol.	32
Figura 13. Compostos 5f (bromo-indole, 2-6- diflurano) e 5h (indol-metilsulfanil).	32
Figura 14. Sobreposição do α -cetoéster original (cinza) e da melhor pose de docking (amarelo), com RMSD=1,29Å.	36
Figura 15. Ilustração dos resíduos do sítio ativo da proteína cruzaina com os derivados de tiazolidina.	37
Figura 16. Estrutura básica dos ligantes	38
Figura 17. (a) Docking da conformação do ligante 5D com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5D com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.	41
Figura 18. (a) Docking da conformação do ligante 5G com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5G com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.	42
Figura 19. (a) Docking da conformação do ligante 5A com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5A com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.	57

Figura 20. (a) Docking da conformação do ligante 5B com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5B com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.	57
Figura 21. (a) Docking da conformação do ligante 5C com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5C com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.	58
Figura 22. (a) Docking da conformação do ligante 5E com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5E com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.	58
Figura 23. (a) Docking da conformação do ligante 5F com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5F com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.	59
Figura 24. (a) Docking da conformação do ligante 5H com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5H com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Energias de ligação e tipo de interação para cada complexo (proteína-ligante), após o estudo de docking.	38
Tabela 2. Atividade tripanocida de compostos tiazolidínicos contra formas epimastigotas e tripomastigotas comparadas a energia de ligação para a formação do complexo com a proteína cruzaina.....	43
Tabela 3. Parâmetros computacionais de biodisponibilidade dos compostos.	44

LISTA DE SIGLAS

2D	Bidimensional
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção
Ala	Alanina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
Cys	Cisteína
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
His	Histidina
IC ₅₀	Concentração de inibitória de 50% de uma resposta
Leu	Leucina
Met	Metionina
PDB	Protein Data Bank
RMSD	Desvio padrão quadrático médio
Ser	Serina
Trp	Triptofano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 DOENÇA DE CHAGAS	16
2.1.1 Histórico no Brasil	16
2.1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	17
2.1.3 Hospedeiro intermediário e transmissão	18
2.1.4 Sintomas	19
2.1.5 Quimioterapia antichagásica	20
2.2 CRUZAÍNA COMO ALVO TERAPÊUTICO PARA DOENÇA DE CHAGAS	21
2.2.1 Mecanismo de ação da tríade catalítica	24
2.2.2 Inibição da cruzaina	25
2.3 DOCKING MOLECULAR	26
2.4 FARMACOCINÉTICA	27
2.5.1 Propriedades dos fármacos baseados na regra de Lipinski e Veber	28
2.6 NÚCLEOS DE INTERESSE	29
2.6.1 Tiazolidina	29
2.6.2 Indol	30
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. METODOLOGIA	34
4.1 Re-docking	34
4.2 Tratamento do Receptor	34
4.3 Tratamento dos Ligantes	34
4.4 Cálculo do Grid e Docking	35
4.5 Análise das principais interações intermoleculares e das Propriedades Farmacocinéticas	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36

5.1	Análise do re-docking	36
5.2	Análise de docking para a classe de compostos derivados da tiazolidina-2,4-diones	37
5.3	Análise das propriedades farmacocinéticas	43
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
7.	PERSPECTIVAS	48
	REFERÊNCIAS	49
	APÊNDICE	57

1. INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas afetam milhões de pessoas, porém, cada vez menos tem recebido a devida atenção das indústrias farmacêuticas objetivando a buscar por formas de eliminar ou fazer o seu controle biológico. A prova disso é que somente 4% dos novos produtos introduzidos na terapêutica entre 2000 e 2011 foram direcionadas as doenças negligenciadas e somente 4 de 336 novas entidades químicas foram aprovadas. Diante desse cenário, se faz necessário a busca por fármacos para o tratamento dessas patologias (PEDRIQUE et al, 2013; AERTS,2017).

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença endêmica negligenciada das Américas (especialmente em áreas rurais da América Latina, onde a pobreza é generalizada, porém, em grande número nas áreas urbanas, onde encontra-se cerca de 60% das pessoas infectadas) e se constitui de uma infecção parasitária, sistêmica e crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). É transmitida aos seres humanos, principalmente através das fezes de insetos triatomíneos, conhecidos como barbeiros, pelo hábito de picar o rosto de suas vítimas (CDC, 2017; ONU, 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (ONU), estima-se cerca de 7 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a doença de Chagas continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública, causando incapacidade em indivíduos infectados e mais de 10 mil mortes por ano. Até 30% das pessoas cronicamente infectadas desenvolvem alterações cardíacas e até 10% desenvolvem alterações digestivas, neurológicas ou mistas que podem requerer tratamento específico (ONU, 2018).

A forma de tratamento utilizada atualmente restringe-se ao uso de apenas um fármaco nitro-heterociclo: o Benznidazol – (Lafepe ®), descoberto no ano de 1970, que é caracterizado pelo longo tempo de tratamento e que acarreta efeitos colaterais graves, que levam à descontinuidade do tratamento. Um outro medicamento utilizado por bastante tempo foi o Nirfurtimox – (Lampit ®), que foi desenvolvido em 1960, porém, não é mais prescrito, visto que apresenta uma eficácia menor que a do benzminazol (KIRCHHOFF, 2000; DOS SANTOS, 2012). A infecção pelo *T.cruzi* é curável se o tratamento for iniciado logo após a infecção. Na fase crônica, o tratamento antiparasitário também pode prevenir ou reduzir o avanço da doença. Realizar o controle vetorial tem sido o método mais útil para prevenir a doença na América Latina (ONU,2018).

Nos últimos anos, as pesquisas direcionadas à descoberta de novos fármacos passaram a buscar alvos macromoleculares específicos para a doença. Nesse contexto, as enzimas são alvos de grande interesse, uma vez que desempenham papel fundamental em muitas doenças. Como exemplo da doença de Chagas, a cruzaina é a principal cisteinoprotease do *T. cruzi* e é liberada em todos os estágios do ciclo de vida do parasita, mas distribuída em diferentes compartimentos celulares em cada estágio. Esta enzima é essencial para a replicação do parasita intracelular e por esse motivo é considerada um alvo importante para o desenvolvimento de novos agentes anti *T. cruzi*. Logo, o planejamento de novos fármacos capazes de interagir com esse enzima, de forma efetiva, sem afetar o hospedeiro, é extremamente viável, porém tal objetivo constitui o principal desafio da química medicinal na busca de novos protótipos antichagásico (LEITE et al., 2006; LEITE et al., 2007; SANTOS FILHO et al., 2009; TROSSINI et al., 2009; ROCHA et al., 2018).

Muitos núcleos de interesse têm sido estudados, inclusive compostos não peptídicos que apresentam em sua estrutura núcleos tiazolídicos e indólicos e que tem demonstrado atividade contra o *T. cruzi*. Por essa razão, muitas tentativas têm sido feitas para explorar as relações entre a sua estrutura e atividade, com o intuito de conceber compostos menos tóxicos e com efeitos tripanocidas melhorados (MOREIRA; et al, 2013; PIACEZA, 2013; ASATI; MAHAPATRA; BHARTI, 2014; HAVRYLYUK; et al, 2014; OLIVEIRA; et al, 2015).

Modificações moleculares, como a substituição de um grupamento por outro com características semelhantes, representam uma estratégia útil para encontrar novos compostos biologicamente ativos e ajudar a alcançar melhores propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. O desenho de fármacos baseado em ligantes é uma das mais importantes ferramentas de modificação molecular baseadas no conhecimento de outras moléculas que se ligam ao alvo biológico de interesse (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2012). Diante disso, esse trabalho busca estudar por meio de técnicas de docking molecular (via inibição enzimática) uma série de ligantes da classe tiazolidina que foram sintetizadas por Oliveira et al (2015), onde verificaram a atividade tripanocida para formas epimastigota e tripomastigotas do *T. cruzi*, afim de buscar informações para sugerir um provável mecanismo de ação para os compostos analisados e que possam ser, futuramente, empregados como uma nova classe alternativa de fármacos mais eficientes, menos tóxicos e mais acessíveis a população.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

2.1.1 Histórico no Brasil

Em 1907, Oswaldo Cruz, diretor do Instituto Soroterápico de Manguinhos, designou o higienista e bacteriologista brasileiro Carlos Chagas, que trabalhava como seu assistente de pesquisa, para atuar no controle da malária em Lassance, Minas Gerais, onde estava sendo realizada a construção da Estrada Ferro Central do Brasil. Chagas foi convocado pois ele já havia trabalhado com pacientes infectados com a malária e em pouco tempo essa doença acabou trazendo prejuízos para o avanço das obras (CHAGAS, 1909; COURA; VINÃS; JUNQUEIRA, 2014).

Em meados de 1908, o engenheiro da obra da estrada de ferro Cantarino Motta notificou Chagas e sua equipe sobre a presença de um inseto hematófago triatomíneo chamado pelos habitantes locais de “barbeiro”, que acabou recebendo esse nome pois na maioria das vezes ele possuía o hábito de picar o rosto das pessoas. O ataque era feito preferencialmente no período noturno. Durante o dia eles se escondiam nas frestas das paredes que eram feitas de palha, conhecidas como casas de pau-a-pique, característica comum da população mais pobre do local (CHAGAS, 1909).

O grupo liderado por Chagas improvisou consultórios e laboratórios nos vagões dos trens que serviram para verificar se os insetos encontrados abrigavam potenciais patógenos, já que além da malária ele encontrou quadros de difícil interpretação, pois a poluição apresentava arritmias, sinais de insuficiência cardíaca e alguns casos de mortes súbitas (GALVÃO, 2014). Chagas dissecou os insetos e analisou seu conteúdo intestinal e encontrou numerosos tripanossomas em seu intestino que mais tarde recebeu o nome de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a seu mentor e líder do instituto, Oswaldo Cruz. Ele supôs que os insetos que transportavam esses parasitas podiam transmiti-los aos humanos quando sugavam seu sangue (STEVERDING, 2014; COURA; VINÃS; JUNQUEIRA, 2014).

Chagas não possuía instalações necessária em Lassance para realizar estudos experimentais em animais, sendo assim, enviou espécimes do barbeiro ao seu diretor Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, pedindo que ele os colocasse em contato com saguis (*Callithrix penicillata*) não infectados. Três semanas depois de colocar os insetos em contato com os animais, Cruz observou a presença do parasita no sangue dos saguis e convocou Carlos Chagas

imediatamente para prosseguir com os estudos em outros animais, inclusive domésticos. Seguindo os experimentos, Chagas descobriu que o parasita era infectante para vários outros animais do laboratório. Ele tinha certeza de que havia encontrado um organismo patogênico de uma doença infecciosa humana, mas não sabia que tipo de doença era (STEVERDING, 2014; COURA; VINÃS; JUNQUEIRA, 2014).

O avanço veio em 1909, quando ele foi chamado para retornar a Lassance e examinar uma menina de dois anos chamada Berenice, que estava febril com o aumento do baço e fígado e inchaço dos gânglios linfáticos. Quatro dias após o exame, vários tripanosomas foram localizados em seu sangue com morfologia semelhante àsquelas detectadas nos saguis infectados. Após este caso, Chagas publicou seu trabalho relatando a descoberta de uma nova doença, a tripanossomíase americana, que acabou ficando conhecida como doença de Chagas, em decorrência do descobridor (STEVERDING, 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que cerca de 6 -7 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* em todo o mundo, sendo que o Brasil exibiu uma das maiores presenças dessa doença nas últimas décadas — cerca de 1,1 milhão de indivíduos infectados (OMS, 2018). Esse é um episódio que está diretamente relacionado ao aumento de atividades antrópicas de desmatamentos e ocupações de áreas ambientalmente frágeis, o que reduz as fontes naturais de alimentação e abrigo dos triatomíneos, que passam a se alimentar de animais domésticos e, eventualmente, do próprio ser humano, condicionando processos de peridomicialização e domicialização da doença (COURA; VINÃS; JUNQUEIRA, 2014).

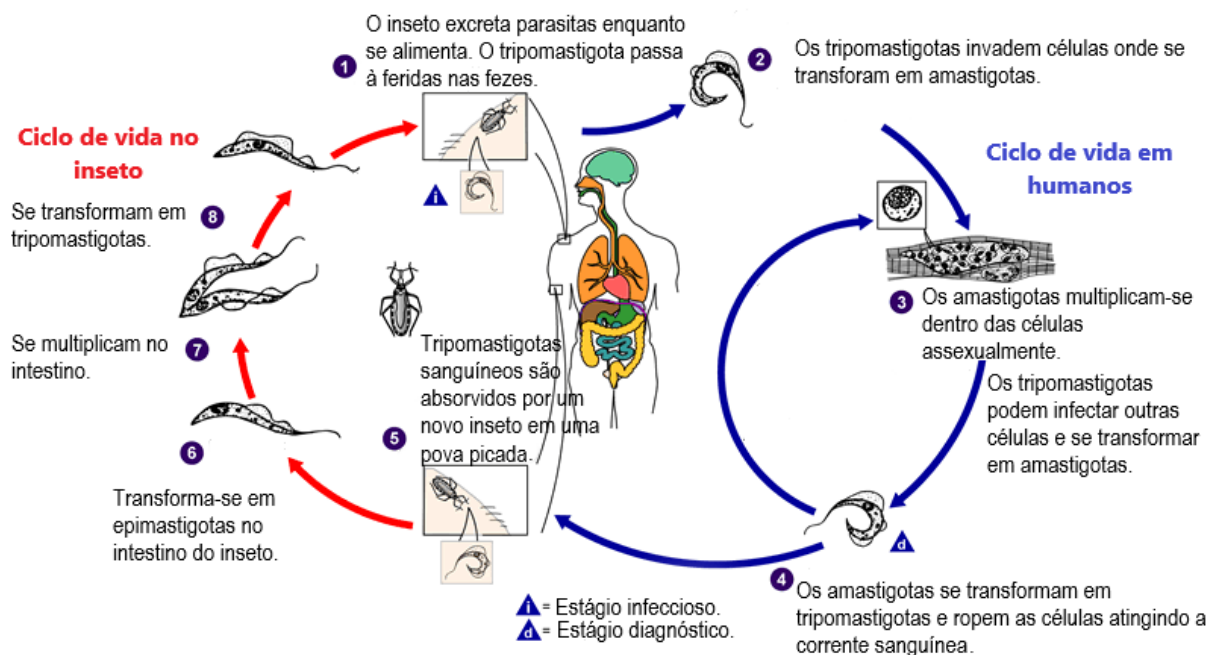
2.1.2 *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)

O protozoário flagelado *T. cruzi* da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* é o agente responsável pela doença de Chagas. Esse parasita apresenta um ciclo biológico complicado (Figura 1), o qual envolve um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado, e apresenta três formas distintas: (a) epimastigota, forma presente no vetor e em cultura axênica; (b) tripomastigota, forma sanguínea circulante e infectante; e (c) amastigota, forma de replicação intracelular (DIAS; et al, 2009). Conforme ilustrado na Figura 1, o parasita passa por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (ser humano e mamíferos) e extracelular no inseto vetor (triatomíneos).

Na forma epimastigota o parasita se transforma na forma tripomastigota ainda no intestino do inseto, sendo então excretado durante a alimentação com o sangue do indivíduo. Quando o vetor se alimenta do sangue do hospedeiro, simultaneamente ele elimina suas fezes

infectadas com tripomastigotas na região da ferida causada pela picada. Essa picada causa irritação na pele levando o indivíduo a coçar a área ferida, fazendo com que parte das fezes contaminadas entrem em contato com o ferimento, atingindo a corrente sanguínea, portanto, os tripomastigotas do *T. cruzi* são a fase infectante para os vertebrados. Dentro do corpo do hospedeiro vertebrado acontecem modificações para a fase amastigota que também pode ser ingerido pelo inseto novamente, fechando assim o ciclo (TYLER; ENGMAN, 2001).

Figura 1. Ciclo evolutivo do *T. cruzi*.



Fonte adaptada: FERREIRA, 2016.

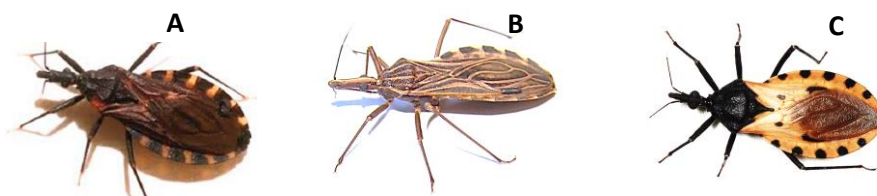
Existem muitas espécies de tripanossomas e esse é o grupo que infecta a maioria dos gêneros de vertebrados. Várias espécies de tripanossomas causam importantes doenças veterinárias, mas apenas duas causam doenças humanas expressivas. Na África Subsaariana, o *Trypanosoma brucei* causa a doença do sono ou a tripanossomíase africana humana, e na América o *Trypanosoma cruzi* causa a doença de Chagas. Ambas as doenças foram espantosamente negligenciadas, afetando de forma desproporcional as populações mais pobres e marginalizadas e apresentado grandes problemas de saúde pública (BARRETT; et al, 2003).

2.1.3 Hospedeiro intermediário e transmissão

A principal via de transmissão da tripanossomíase americana é vetorial, através dos insetos triatomíneos hematófagos, chamados popularmente de barbeiros. Apesar de mais de 100 espécies terem sido descobertas como potenciais transmissores, poucos são vetores importantes para o *T. cruzi*. Entre os vetores destaca-se o *Triatoma infestans*, principal vetor na região sul da América do Sul, o *Rhodnius prolixus* frequentemente encontrado no norte da América do sul e América Central e o *Triatoma dimidiata* (Figura 2) encontrado também na região norte da América do Sul, América Central e ainda no sul da América do Norte (GALVÃO; et al, 2003).

Todos os estágios evolutivos dos triatomíneos são capazes de transmitir o protozoário, porém sua capacidade de infecção aumenta de acordo com o número de repastos sanguíneos, ou seja, o quanto ele consegue se alimentar, sendo os insetos adultos os que apresentam as maiores taxas de infecção (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Figura 2. Principais vetores do *T. cruzi*. **A** -*Triatoma infestans*, **B**- *Rhodnius prolixus* e **C**-*Triatoma dimidiata*.



Fonte: GALVÃO, 2014.

A ingestão de alimentos e bebidas contaminadas com fezes dos insetos infectados, transfusão de sangue, transmissão vertical, ou seja, de mãe para o filho durante o parto ou durante a amamentação, transplantes de órgãos usando órgãos de doadores infectados e ainda acidentes de laboratório são outras formas menos convencionais de infecção dessa doença (DIAS; et al, 2009, OMS, 2018).

2.1.4 Sintomas

A doença de Chagas apresenta duas fases características e distintas: a fase aguda e a crônica. A fase aguda se inicia nas primeiras semanas ou meses de infecção. Comumente não é diagnosticada nessa fase ou apresentam apenas sintomas leves e sinais que não são exclusivos da doença de Chagas. O paciente pode apontar dores no corpo, dor de cabeça, febre, fadiga, erupção cutânea, palidez, dores musculares e dificuldade em respirar. No exame físico os sinais podem incluir um leve aumento do fígado ou baço, glândulas inchadas e inchaço local quando

a infecção ocorre por picada do barbeiro, pois surge um edema característico da infecção com endurecimento da pele, denominado chagoma (CDC, 2017; OMS, 2018).

O registro mais conhecido da doença de Chagas aguda é chamado de sinal de Romana, que inclui o inchaço das pálpebras perto de uma possível ferida ocasionada pela picada do inseto ou onde as fezes foram depositadas e/ou acidentalmente esfregadas no olho. Ainda que os sintomas se desenvolvam durante a fase aguda, na maioria das vezes eles desaparecem por conta própria, dentro de algumas semanas ou meses. Mesmo que os sintomas possam sumir, se não tratada, a infecção persiste. Raramente, cerca de 5-10 % de crianças morrem de inflamação grave do músculo cardíaco (miocardite) ou do cérebro (meningoencefalite). Para pessoas que apresentam sistema imunológico enfraquecido, a fase aguda também pode ser grave (COURA; DE CASTRO, 2002).

Durante a fase crônica, a infecção pode se manter em silêncio por décadas ou mesmo por toda a vida, equivalente a cerca de 60% de pacientes chagásicos crônicos. No entanto, algumas pessoas, por volta de 30%, desenvolvem complicações cardíacas, que podem incluir o aumento do coração (cardiomiopatia), insuficiência cardíaca, frequência ou ritmo cardíaco alterado e parada cardíaca, lesões mais graves da doença. Pode apresentar também complicações intestinais, que podem incluir o aumento do esôfago (megaesôfago) ou cólon (megacólon) e podem acarretar dificuldades com a alimentação ou passagem das fezes (CDC, 2017; OMS, 2018).

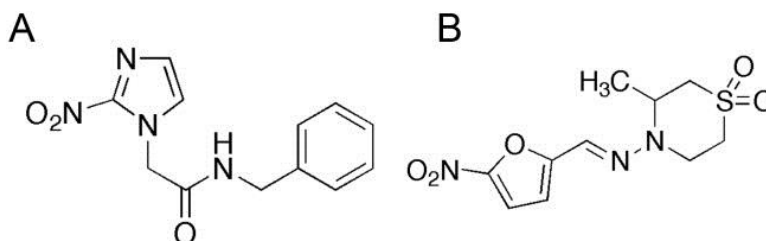
2.1.5 Quimioterapia antichagásica

A forma de tratamento da tripanossomíase americana utilizada logo após sua descoberta em 1909 consistia no uso medicamentos à base de arsênio e antimônio. Dentre os agentes quimioterápicos utilizados entre os anos de 1936 e 1960 se destacavam os derivados de quinoleínas, antimaláricos, arsenobenzóis e outros arsemicais, sendo todos pouco sucedidos para o tratamento (ANDRADE; et al, 1992; KIRCHHOFF, 2000).

Apenas por volta do final da década de 60 e início de 1970, dois compostos surgiram oferecendo novas perspectivas para o tratamento da doença, tanto pela eficácia na fase aguda quanto pela tolerância. O nifurtimox (Lampit®, comercializado pela Bayer), 3-metil-4-(5' nitrofurfurilidenoamino) tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1- dióxido (Figura 3); e o benznidazol (Rochagan®, comercializado pela Roche), N-benzil-2-nitroimidazol acetamida (Figura 3) (DE CASTRO, 1993). Ambas as drogas promovem um efeito que suprime a parasitemia em

indivíduos infectados durante a fase aguda, sendo benznidazol o que demonstra mais eficiência quando comparado com o nifurtimox (KIRCHHOFF, 2000).

Figura 3. Estruturas químicas dos fármacos **A** – benznidazol e **B**- nifurtimox



Fonte adaptada: PITA; PASCUTTI, 2012.

A ação destes fármacos é afetada diretamente por algumas condições devido: a resistência de algumas cepas de *T. cruzi* encontrada em determinadas áreas geográficas; a diferença de vulnerabilidade ao tratamento entre indivíduos e as reações adversas (anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, manifestações digestivas, sonolência ou excitação, náuseas, vômitos, diarreia, hipersensibilidade, dermatite e linfadenopatia), o que leva à descontinuidade do tratamento (COURA; DE CASTRO, 2002; PITA; PASCUTTI, 2012).

Devido à magnitude desses efeitos adversos, desde 1980, o nifurtimox teve sua comercialização descontinuada nos países do Cone Sul (Brasil, Argentina, Chile e Uruguai) visto que os benefícios do tratamento não eram superiores aos riscos associados a ele, enquanto que o benznidazol continua a ser usado (CASTRO; MECCA; BARTEL, 2006; PÉREZ-MOLINA; et al, 2009). Dado o pouco avanço na quimioterapia, associada a inexistência de vacinas eficazes, há uma constante necessidade de que novas formas de tratamento sejam desenvolvidas auxiliando no controle e prevenção da doença de Chagas.

2.2 CRUZAÍNA COMO ALVO TERAPÊUTICO PARA DOENÇA DE CHAGAS

A enzima cruzaina, principal cisteíno protease do *T. cruzi*, é considerada um alvo molecular terapêutico validado para doença de Chagas (MCKERROW, 1999; BRAK; et al, 2008; FRICKER; et al, 2008). Ela é expressa durante todos os estágios do ciclo evolutivo do parasita, e é fundamental para sua nutrição e desenvolvimento. Essa enzima confere ao parasita a habilidade de invadir células do hospedeiro, inclusive células do sistema imunológico, possibilitando o processo de proliferação e diferenciação das formas epimastigotas, tripomastigota e amastigota do *T. cruzi*. Isto é, a cruzaina é essencial na regulação da interação

entre o parasita e hospedeiro (MCKERROW, 1999; MARTINEZ-MAYORGA; et al. 2015; ROCHA; et 2018).

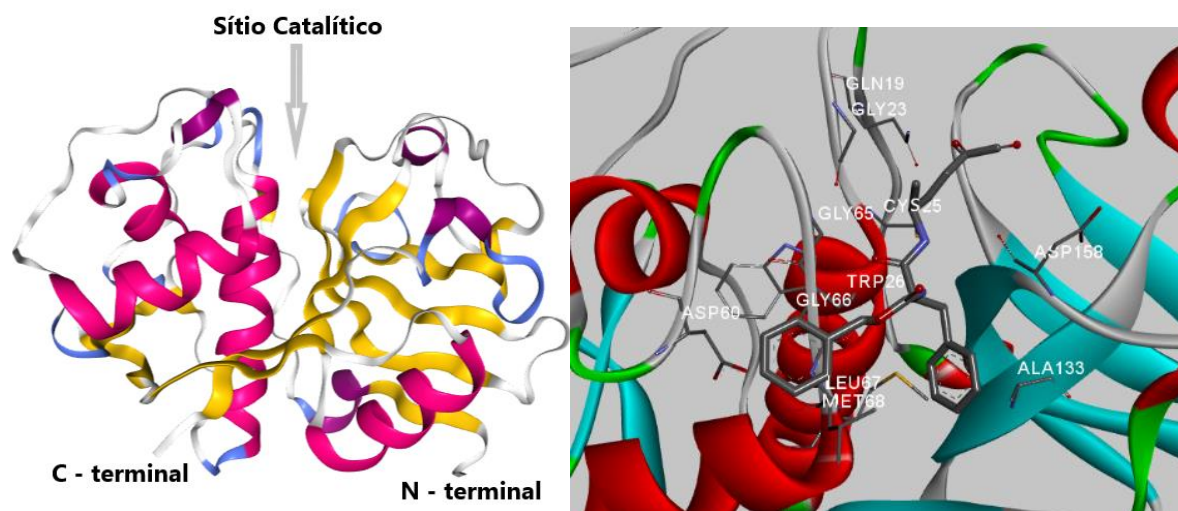
A localização da cruzaina no *T. cruzi* varia com funções específicas de cada estágio. Na forma epimastigota, a cruzaina é encontrada de forma expressiva em reservossomas, que são estruturas que se assemelham aos lisossomas. Na tripomastigota, é encontrada no bolso flagelar e nas amastigotas intracelulares está localizada na superfície da célula, onde provavelmente funciona no citoplasma da célula hospedeira (GEA, S.; et al, 2006)

A cruzaina é uma cisteína protease da família da papaína que catalisa reações de hidrólise de ligações peptídicas. De forma mais específica, ela é responsável pela degradação de proteínas da célula hospedeira e, portanto, contribui para o resultado da infecção (MOREIRA et al., 2014). Sua estrutura cristalográfica é composta por uma cadeia polipeptídica de 215 aminoácidos, dobrados em dois domínios, onde um deles é predominantemente α -hélice (C-terminal) e o outro consistem em extensas interações de folhas- β antiparalelas (N-terminal). Para as enzimas da família da papaína, existe uma extensa fenda entre os dois domínios, onde está localizado o sítio catalítico composto pelos resíduos Cys25, His159 e Asn175, que formam a chamada tríade catalítica (Figura 4) (FARADY; CRAIK 2010).

O sítio catalítico apresenta quatro subsítios de ligação, designados S1, S2, S3 e S1' (Figura 5). O subsítio S2 (roxo) é o principal responsável pela especificidade da enzima. Pouco exposto ao solvente, é delimitado pelas cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos, Met68, Ala133, Leu67, Leu157 e Gly160, o que confere preferência por grupos de substâncias insolúveis em água. Entretanto, a presença e a flexibilidade do resíduo de Glu205 na extremidade deste subsítio lhe atribui uma característica negativa, pois, permite também interações com grupos carregados positivamente (FARADY; CRAIK 2010).

A flexibilidade ao subsítio S2 conferida pelo resíduo Glu205, faz com que seja possível o arranjo de substratos mais ou menos volumosos. Quando o substrato exibe um fragmento hidrofóbico, o resíduo Glu205 rotaciona para fora do sítio de especificidade interagindo com algumas moléculas de solvente mantendo apenas resíduos hidrofóbicos no interior do sítio, porém, quando o substrato é positivamente carregado, a Glu205 se move para o interior do sítio e interage eletrostaticamente com a porção carregada do substrato. Além disso, esse resíduo é importante na distinção da cruzaina das demais proteases, inclusive as proteases humanas (GILLMOR; CRAIK; FLETTERICK, 1997; FARADY; CRAIK 2010).

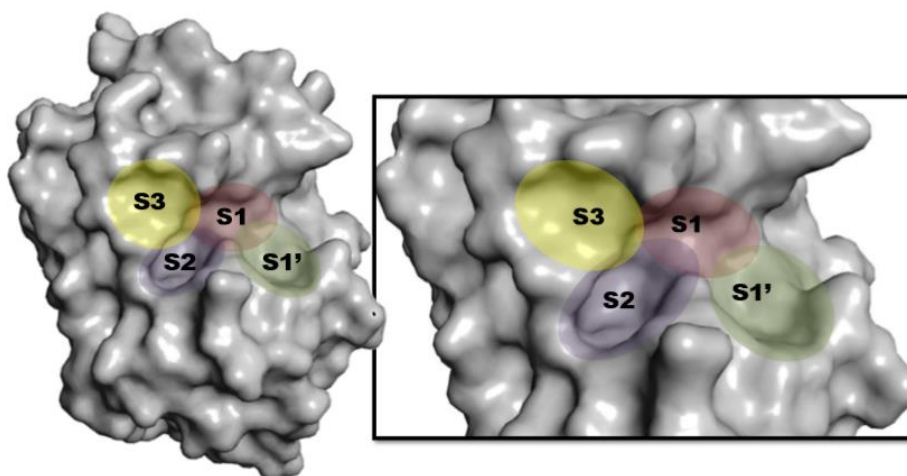
Figura 4. Estrutura cristalográfica da enzima cruzaína com destaque para os resíduos de aminoácidos interagindo com o ligante co-cristalizado.



Fonte adaptada: <https://www.rcsb.org/3d-view/1U9Q/1>;

Os subsítios S1 (vermelho), S3 (amarelo) e o subsítio S1' (verde) são menos definidos e mais expostos ao solvente, no entanto contém resíduos de aminoácidos fundamentais para a atividade catalítica. Um dos resíduos da tríade catalítica, o Cys25 está presente no subsítio S1, bem como os resíduos Gln19, Gly23, Ser64 e Leu67. Já no subsítio S3 estão os resíduos Ser61, Gly65, Gly66 e Leu67, enquanto no subsítio S1' estão os outros dois resíduos da tríade catalítica His159 e Asn175, juntamente com o Asp161 e Trp184 (GILLMOR; CRAIK; FLETTERICK, 1997).

Figura 5. Enzima cruzaína, com ênfase no sítio catalítico demonstrando os subsítios.



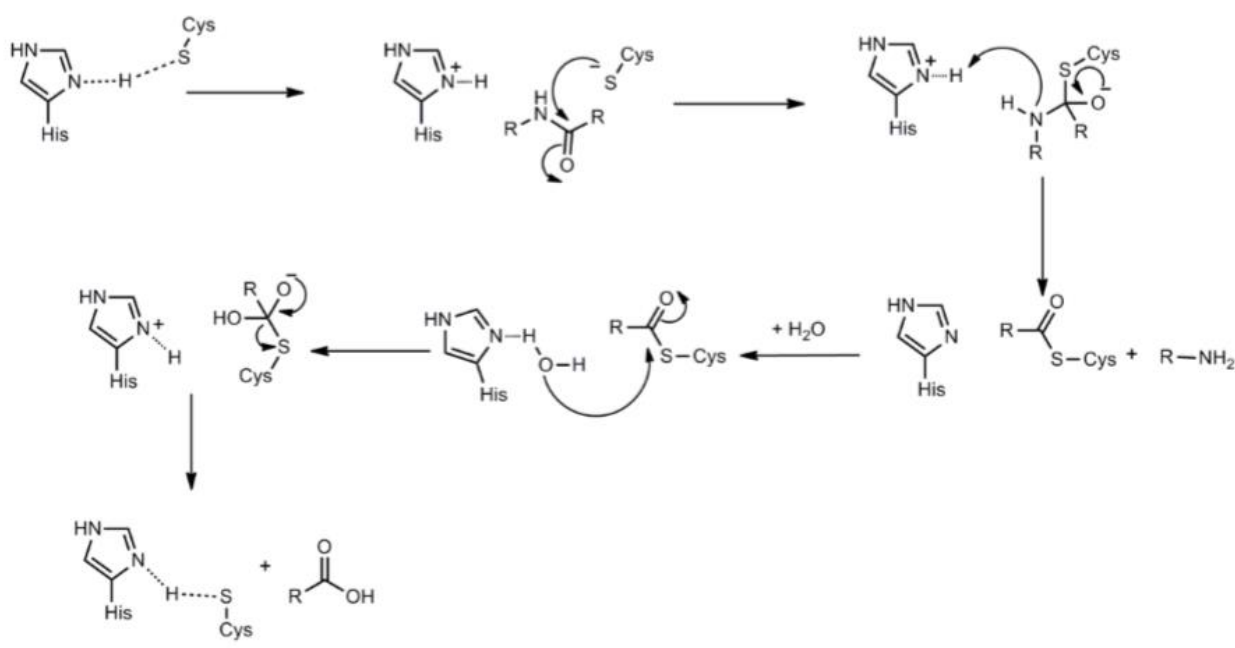
Fonte: FERREIRA, 2016.

2.2.1 Mecanismo de ação da tríade catalítica

O termo tríade catalítica refere-se aos três resíduos de aminoácidos que funcionam em conjunto no centro ativo de algumas enzimas, incluindo as proteases. Os resíduos de aminoácidos formam uma rede de cargas que polarizam e ativam o nucleófilo, que ataca o substrato, formando um intermediário covalente que é então hidrolisado para regenerar a enzima livre. O resíduo nucleofílico da enzima cruzaina é a Cys. Para ativar esse nucleófilo, essas enzimas orientam um resíduo básico e um ácido formando uma tríade catalítica (DODSON, 1998).

A tríade catalítica da cruzaina é constituída por um resíduo de cisteína na posição 25 (numeração da papaína), que se encontra no domínio α -hélice (C-terminal). Este resíduo tem um valor de pKa relativamente baixo, aproximadamente 4, sendo responsável pela formação de um par iônico, essencial para a atividade catalítica junto a outro membro desta tríade, a histidina-159 (pKa de aproximadamente 8,5) que se encontra posicionada na folhas- β , no lado oposto da fenda catalítica. O terceiro membro é a asparagina-175, que orienta a histidina para a posição correta para que esta possa desprotonar o resíduo de cisteína e ajuda a estabilizar o par cisteína-histidina, por ligações de hidrogênio. O mecanismo de catálise dessa tríade (Figura 6) é relativamente complexo (BERND; KLAUS, 2003).

Figura 6. Mecanismo de catálise da papaína e suas semelhantes



Para ocorrer a ativação da enzima, ou seja, a formação do par iônico cisteína-histidina, não é necessária a presença de substrato, o que torna estas proteases em enzimas ativadas. Esse fato acontece de forma contrária às proteases de serina, uma vez que só na presença de um substrato ficam com o seu centro ativo ionizado. Após a acomodação do substrato na zona de ligação da enzima, existe um ataque do tiolato da cisteína, ao carbono do grupo carbonila da ligação a ser clivada, formando-se um intermediário tetraédrico, originando a acilação da enzima com libertação da parte amina da ligação que se quebrou, desprotonando neste processo o anel imidazol da histidina. Para se obter a enzima “livre”, ocorre a desacilação da enzima, promovida pelo ataque de uma molécula de água que por sua vez, é desprotonada pelo anel imidazol da histidina. Concluído o processo, a enzima está pronta para interagir com uma nova molécula de substrato (BERND; KLAUS, 2003; THEODOROU; BIETH; PAPAMICHAEL, 2007).

2.2.2 Inibição da cruzaina

O uso de inibidores seletivos da cruzaina representa um alvo de interesse e com grande potencial para busca de novos fármacos antichagásicos, pois, bloqueiam a proliferação do parasito epimastigota extracelular e amastigota intracelular e suspendem a metaciclogênese, ou seja, impendem a transformação de epimastigotas para tripomastigotas, parasito característico do estágio infeccioso da doença. De forma geral, a inibição da cruzaina possibilita a erradicação das formas celulares do parasita do *T.cruzi* (URBINA; 2003; VITAL; ARRIBAS; TROSSINI, 2014; HOELZ et al., 2016).

As demais cisteíno-proteases, assim como a cruzaina, são efetivamente moduladas por várias classes de inibidores covalentes baseados no estado de transição da reação catalisada pela enzima. Nestes compostos estão presentes grupos contendo um átomo de carbono propenso ao ataque nucleofílico realizado pela cisteína ativada presente no sítio catalítico da enzima. O ataque nucleofílico irá depender da sua natureza, podendo tanto promover a ligação dos compostos de forma irreversível quanto de forma reversível. Comumente, a inibição reversível envolve a interação não covalente entre a enzima e o inibidor, no entanto, em alguns casos, a ligação covalente formada é instável o bastante para ser hidrolisada e liberar as duas moléculas envolvidas (URBINA, 2003).

Tendo em vista o importante papel da cruzaina durante a infecção pelo *T. cruzi*, a identificação de inibidores desta enzima tem recebido atenção considerável. As principais classes de inibidores incluem: (a) derivados peptídicos; (b) derivados não-peptídicos (tiazóis,

pirimidinas, chalconas e tiossemicarbazonas) que inibem a enzima reversível ou irreversivelmente. Os inibidores peptídicos na maioria das vezes exibem maior afinidade pela enzima, porém, são mais susceptíveis a hidrólises químicas e enzimáticas, além de possuírem geralmente baixa seletividade, podendo causar maior toxicidade (BRANQUINHA et al., 2017). Diante disso, derivados não-peptídicos se mostram como alvos promissores.

Alguns estudos apresentam evidências de que os inibidores da cruzaina ativos como tripanocidas apresentaram toxicidade insignificante para mamíferos (DOYLE et al., 2011). Classes de compostos como os das vinilsulfonas, sulfonatos, sulfonamidas, α -cetoamidas, α -cetoácidos e α -cetoésteres também apresentaram atividade inibitória com alta afinidade para esta enzima. Entretanto, muitos destes possíveis fármacos, não são permitidos para uso clínico por não possuir um perfil farmacológico apropriado e aqueles que são aprovados estão sujeitos a crescente resistência parasitária (ROGERS et al., 2012). Logo, se faz necessário a proposta de novos candidatos terapêuticos.

Uma forma de investigar as interações de potenciais candidatos a fármacos contra um tipo de proteína ou mesmo outros receptores biológicos consiste no uso de estudos de métodos computacionais, que acaba se tornando uma alternativa rápida e mais acessível para quem busca esse tipo de pesquisa. Esse trabalho será realizado a partir do método computacional de docking molecular, abordado a seguir.

2.3 DOCKING MOLECULAR

Os avanços nas pesquisas farmacêuticas introduziram com sucesso um grande número de métodos de modelagem molecular, dentro de uma ampla gama de programas de descoberta de medicamentos, para estudar sistemas biológicos e químicos complexos. O uso de estratégias computacionais e experimentais de forma integrada tem proporcionado a identificação e desenvolvimento de novos compostos promissores, além de que esse tipo de metodologia visa a redução do tempo de pesquisas à custos financeiros bem menores (FERREIRA; et al, 2015).

O método de docking molecular tem sido utilizado amplamente no desenho moderno de drogas devido a sua capacidade de prever, com um grau substancial de precisão, as conformações e orientação de uma molécula pequena (ligante) dentro dos sítios de ligação de um alvo macromolecular (proteína), denominada como receptor. Esta abordagem também estima a quantificação da energia livre de ligação entre ligante-receptor avaliando fenômenos cruciais envolvidos no processo de reconhecimento intermolecular (FERREIRA; et al, 2015). A forma de ligação do ligante nas reações enzimáticas e, portanto, sua possível inibição é

considerada um passo essencial para o elucidar novas formas terapêuticas para uma variedade de patologias importantes (RUYCK; et al, 2016), como o caso da doença de Chagas, uma doença negligenciada e que não apresenta um tratamento adequado.

O processo de reconhecimento molecular realizado pelo docking é muito complexo sendo geralmente dividido em realizar a aplicação de um algoritmo, que tem por objetivo a busca dos possíveis modos de ligação entre o ligante e o receptor, e, realizar a previsão da afinidade de ligação de um ligante a um receptor, ou seja, o cálculo da energia de interação (função *score*) que é aplicada para selecionar os modos de ligação teoricamente mais próximos do modo de ligação “real”, classificando-os de acordo com as suas energias de interação. Atualmente, existem inúmeros programas de docking comerciais, tais como: *GOLD*, *AutoDock*, *FlexX* entre outros (VERDONK; et al, 2003).

Nesse estudo, foi utilizado o programa *AutoDock*, uma vez que ele apresenta bons resultados quando comparado os dados obtidos *in silico* com dados obtidos a partir de testes experimentais, além de ser de livre acesso. Esse programa utiliza grades de energia, denominadas de “*grid*”, geradas pelo programa *AutoGrid*, que tem a função de reduzir custos computacionais. Para a elaboração do *grid* é realizado um pré-cálculo da energia de interação entre os átomos do ligante e do receptor, para que depois sejam utilizadas pelo programa *AutoDock* e assim seja possível realizar a determinação da energia total de interação entre a macromolécula e o ligante. A diferença entre as energias do ligante e da proteína no estado isolado e a energia do complexo formado após realização do docking, correspondem a afinidade de ligação, calculada pelo *AutoDock* (HUEY, 2007). O programa ainda utiliza um algoritmo genético Lamarckiano (LGA), que é implementado como algoritmo de busca local (MORRIS, 1998).

2.4 FARMACOCINÉTICA

A farmacocinética é um dos principais ramos da farmacologia, atentando-se ao estudo do destino, metabolismo, caminho e impacto do fármaco no organismo e os pontos em que ocorre a absorção, distribuição, acúmulo, metabolização, excreção dos fármacos, a rota de biotransformação, aplicada também para determinação correta da posologia (indicação da dose adequada de um medicamento), reajuste e interpretação de resposta imprevista ou ausência de efeito. Isto é, estuda como acontece a passagem do fármaco através das membranas biológicas (transporte); passagem de uma substância desde o local em que foi administrada até a corrente sanguínea (absorção); dissolução no plasma e distribuição para os tecidos (distribuição); o

metabolismo de drogas (biotransformação) e como as drogas e seus metabólitos são excretados por diferentes vias, de acordo com suas características físico-químicas. Ex.: renal, biliar, pulmonar, secreções externas (LAMATTIANA; GOLAN, 2009; HELDT; LOSS, 2013).

Quando ingeridos, os fármacos devem atravessar a membrana celular para alcançar o sangue circulante, para isso, sua natureza química acaba influenciando fortemente nesse resultado. Sabendo que todo fármaco possui um grau de lipossolubilidade e que o sangue é um meio aquoso, espera-se que uma molécula lipossolúvel não se dissolva em um meio aquoso. De fato, para que as moléculas lipossolúveis e não ionizadas circulem no sangue, elas devem ligar-se as proteínas plasmáticas, como a albumina, globulinas, entre outras. As proteínas plasmáticas são moléculas grandes (maiores que 60 KDa) que não conseguem atravessar as paredes dos capilares, por isso, quanto mais lipossolúvel for um fármaco, maior será sua ligação as proteínas plasmáticas e menor quantidade dele conseguirá chegar ao tecido. Assim, menos fármaco será distribuído (LOPES, 2018).

É importante ressaltar que o fármaco tem que ser lipossolúvel e estar na forma não ionizada para ter um grau de ligação às proteínas plasmáticas e que o esse grau de ionização varia de acordo com pH do local, pois, caso grandes quantidades de fármacos ionizados cheguem a circulação, podem atingir órgãos não desejados e causar efeitos tóxicos ao paciente (LOPES, 2018). Em contraste, os fármacos hidrofílicos não penetram facilmente nas membranas celulares e devem passar através de junções com fendas (WHALEN, FINKEL e PANAVELIL, 2016).

2.5.1 Propriedades dos fármacos baseados na regra de Lipinski e Veber

Atualmente tecnologias de triagem virtual estão possibilitando a ampliação de análises sobre os problemas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) dos fármacos. Neste sentido, as propriedades físico-químicas dos compostos desse estudo, incluídas nas regras de Lipinski foram usadas como elementos para “filtrar” e selecionar compostos que possam ter características de fármacos (YUNES; CECHINEL-FILHO, 2007).

Também designada de regra dos 5, a regra de Lipinski tem como objetivo estimar a solubilidade e a permeabilidade de fármacos administrados por via oral, predizendo a influência da estrutura química na absorção do composto. Segundo Lipinski, a regra dos 5 propõe que a má absorção ou permeação é mais provável quando a moléculas possui: a massa molar maior do que 500 g/mol; sua lipofilicidade expressa como cLogP maior que 5 (ou o MLogP acima de 4.15); grupos doadores de ligação de hidrogênio (NH, OH) maior que 5 e mais que 10 aceptores

de ligação de hidrogênio (N, O), sendo todos os parâmetros múltiplos de 5. Essas são regras simples que diferenciam as propriedades se um fármaco de outras substâncias químicas (LIPINSKI, 2001).

Esses descritores farmacocinéticos foram reforçados por pesquisadores que identificaram outros parâmetros importantes para que um composto tenha uma biodisponibilidade oral ideal. A regra proposta por Veber e colaboradores (2002) sugere que, o número de ligações rotacionáveis deve ser menor ou igual que 10, pois a existência de uma flexibilidade é importante para a passagem através das membranas. Além disso, a literatura também indica que compostos com áreas de superfície polar (ASP) menor ou igual a 140 Å² apresentam melhor biodisponibilidade oral (CLARK & PICKETT, 2000).

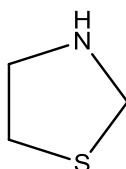
2.6 NÚCLEOS DE INTERESSE

Nesse estudo serão utilizados ligantes que possuem a tiazolidina como núcleo e a presença do substituinte indol, grupamentos químicos que apresentam atividade tripanocida conhecida.

2.6.1 Tiazolidina

As tiazolidinas constituem uma classe de moléculas caracterizadas quimicamente pela presença de um anel heterocíclico de cinco membros, contendo três átomos de carbono (C), um átomo de enxofre (S) na posição 1 e um átomo de nitrogênio (N) na posição 3 (Figura 6). São estruturas evidenciadas na literatura, por meio de estudos que as relacionam a uma série de atividades farmacológicas, como antidiabética, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras (ASATI; MAHAPATRA; BHARTI, 2014).

Figura 7. Anel tiazolidínico.



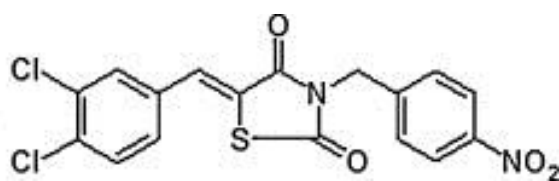
Fonte: Elaboração própria.

As tiazolidinas possuem propriedades que atuam inibindo o crescimento de epimastigotas, onde a enzima cruzaina é essencial para seu desenvolvimento. Há evidências de

que esses compostos têm a capacidade de interferir na biossíntese de poliamina no parasita e nas proteínas envolvidas na produção de tripanotona, molécula responsável por diminuir o estresse oxidativo que o hospedeiro deposita no parasita e também está envolvida no aumento da virulência da doença de Chagas (PIACENZA, 2013).

O trabalho realizado por Moreira et al. (2013), mostra que a 5- (3,4-dicloro-benzilideno) -3- (4-nitrobenzil) -tiazolidina-2,4-diona (LPSF SF29) em concentrações micromolares, inibiu o crescimento das formas epimastigota e amastigota e causou lise na forma tripomastigota do *T. cruzi*, levando à morte do protozoário. O tratamento da forma epimastigotas de *T. cruzi* com 5–12 μM de LPSF SF29 mostrou um efeito (dependente da dose e do tempo) no crescimento do parasita, com um IC_{50} de $8,7 \pm 0,83 \mu\text{M}$ após 72 h de tratamento, um valor menor que a IC_{50} do benznidazol, droga de referência.

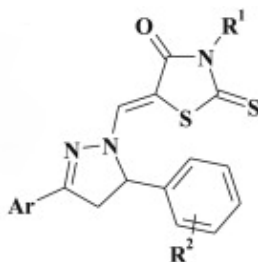
Figura 8. Estrutura química do composto tiazolidina LPSF SF29.



Fonte adaptada: MOREIRA, et al, 2013.

Uma série de derivados da 4-tiazolidinona-pirazolina foi sintetizada e testada para verificar sua atividade parasitária. Os dados de triagem permitiram identificar cinco híbridos tiazolidinona-pirazolina, que possuem atividade tripanocida promissora, com $\text{IC}_{50} \leq 1,2 \mu\text{M}$. Os maiores derivados ativos de tiazolidinona-pirazolina 3c e 6b (IC_{50} de $0,6 \mu\text{M}$ e $0,7 \mu\text{M}$, respectivamente) foram 6 vezes mais potentes que o nifurtimox (HAVRYLYUK; et al., 2014).

Figura 9. Resultado da concepção de novos híbridos de tiazolidinona-pirazolina.

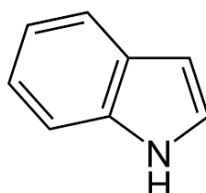


Fonte adaptada: HAVRYLYUK et al., 2014.

2.6.2 Indol

O Indol, também chamado de indole, é um composto orgânico aromático heterocíclo (Figura 9) e apresenta grande importância na estrutura molecular de seus compostos análogos, pois demonstra várias propriedades biológicas como: anti-inflamatória, anticonvulsivante, antibacteriana, antifúngica, entre outras (KALARI, 2007).

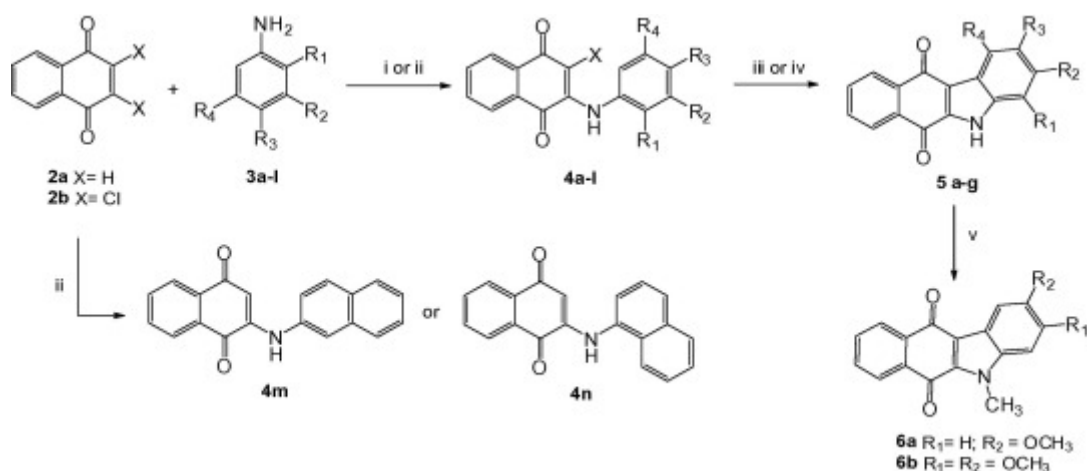
Figura 10. Anel indol



Fonte: Elaboração própria.

Sieveking et al (2014) sintetizaram a 2-aminonaftoquinonas e compostos relacionados que apresentam um núcleo indólico e avaliaram sua atividade tripanocida e citotóxica *in vitro*. Alguns compostos testados inibiram o crescimento epimastigota e a viabilidade do tripomastigota. Vários compostos mostraram atividade ou seletividade similar ou superior em comparação ao nirfutimox, droga utilizada para o tratamento

Figura 11. 2-aminofenilnaftoquinonas e compostos relacionados utilizados no crescimento de cultura de *T. cruzi*.

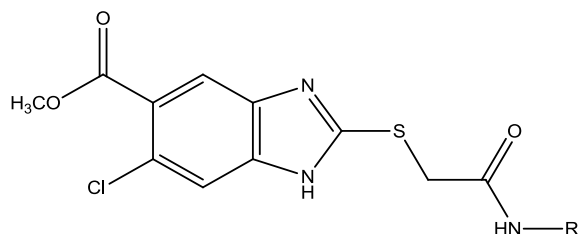


Fonte: SIEVEKING, et al (2014).

Um estudo realizado por um grupo de pesquisa do México, relata a síntese e atividade biológica de uma série de 14 derivados do benznidazol que possuem atividade parasitária. Estudos *in vitro* contra epimastigotas de *T. cruzi* mostraram que dois compostos foram mais

ativos que o medicamento de referência nifurtimox, apresentando uma taxa de inibição de 52% e 48% em uma concentração de 200 μM e estes apresentaram baixo efeito citotóxico em macrófagos de camundongos (VELÁZQUEZ-LÓPEZ; et al., 2016).

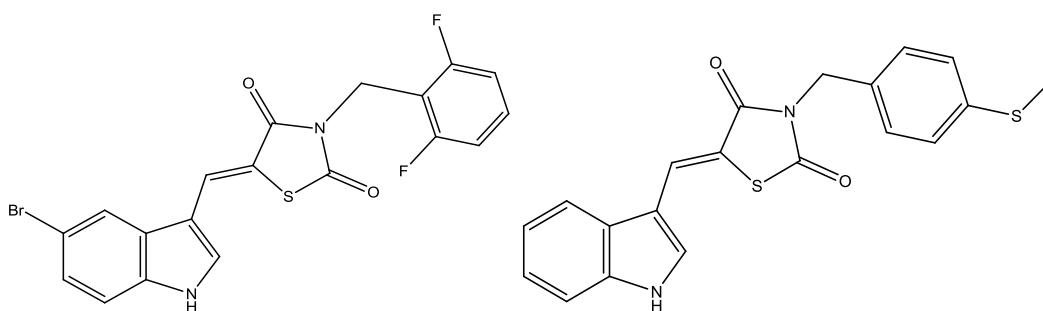
Figura 12. Estrutura química base dos derivados do benzimidazol.



Fonte: VELÁZQUEZ-LÓPEZ; et al., 2016.

Oliveira e colaboradores (2015) realizaram a síntese de uma série de compostos derivados da tiazolidina-2-4-diona, que foram devidamente caracterizados por meio de ensaios de citotoxicidade com células esplênicas (referente ao baço), responsável pela defesa do organismo, e, com formas parasitárias do *T. cruzi*, a fim de obter compostos candidatos ao tratamento da doença de Chagas. Dentre todos os compostos sintetizados, os compostos 5f (bromo-indole, 2-6- diflurano) e 5h (indol-metilsulfanil) exibiram atividades muito promissoras contra as formas epimastigotas e tripomastigotas quando comparados ao benznidazol (utilizado como controle), com valores de IC_{50} menores que 12,7 $\mu\text{g/mL}$ para a forma epimastigotas e 1,63 $\mu\text{g/mL}$ para a tripomastigotas. Diante disso, por essa pesquisa exibir compostos que apresentam em sua estrutura um núcleo indolico e tiazolidínico e por ambos apresentarem resultados promissores para o tratamento parasitário da doença de Chagas, as estruturas dessa pesquisa foram escolhidas como modelo para o estudo teórico deste trabalho.

Figura 13. Compostos 5f (bromo-indole, 2-6- diflurano) e 5h (indol-metilsulfanil).



Fonte: OLIVEIRA; et al (2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Realizar o estudo computacional da relação estrutura atividade de compostos com potencial atividade tripanocida e avaliar sua interação contra a cruzaina e suas propriedades farmacocinéticas.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar o docking molecular dos compostos em estudo para estimar sua afinidade com a cruzaina;
- Avaliar a interação da classe de ligantes tiazolidina contra a enzima cruzaina;
- Analisar as principais interações intermoleculares para formação do complexo proteína-ligante;
- Estudar as propriedades físico-químicas que afetam as características farmacocinéticas dos compostos.
- Prever propriedades farmacocinéticas das moléculas relacionadas com as etapas de absorção e distribuição.

4. METODOLOGIA

A estrutura cristalográfica da cruzaina, receptor biológico utilizado nesse estudo, foi retirada do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB, ou banco de dados de proteínas). Foi utilizada a estrutura cristalina da cruzaina ligada a um α -cetoéster, ID: 1U9Q (MARTINEZ-MAYORGA; et al, 2015), com resolução de 2,3 Å.

A escolha dos oito ligantes utilizados nesse estudo foi apoiada no trabalho de Oliveira e colaboradores (2015) onde realizaram a síntese e avaliação das propriedades tripanocida de compostos derivados da tiazolidina-2,4-diones. Os compostos tiazolidina (5A-H) foram obtidos no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica – LQIT, da Universidade Federal de Pernambuco. Suas estruturas químicas foram elucidadas utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho e de absorção atômica.

4.1 Re-docking

Antes da realização do docking na série de compostos estudadas nesta pesquisa para o alvo biológico selecionado, foi preciso realizar uma validação dos protocolos de docking através do chamado processo de re-docking. Nessa validação, o próprio ligante co-cristalizado da estrutura do complexo, foi submetido ao processo de docking para tentar reproduzir o “encaixe” original no sítio ativo em estudo. Para isso, o ligante não recebeu nenhum tipo de pré-otimização. Como usual, nesse trabalho foi aceito como metodologia validada o resultado que apresentar valores de $\text{RMSD} \leq 2,0$ Å em relação a estrutura co-cristalizada experimental (MORGON; COUTINHO, 2007).

4.2 Tratamento do Receptor

- i. No programa *Discovery Studio 2017* (BIOVIA, 2017), foi removido o ligante alfa-cetoéster da cruzaina e após a remoção do ligante da estrutura cristalizada, foram removidas as moléculas de água.
- ii. No programa *AutoDockTools* (MORRIS, 2009) foram removidos os átomos de hidrogênio apolares e adicionado átomos de hidrogênio polares. Por fim, a carga de Kollman foi computada e a estrutura cristalográfica foi salva em formato *pdbqt*.

4.3 Tratamento dos Ligantes

- i. As oito estruturas dos ligantes da classe tiazolidina foram desenhadas no programa *ChemDraw Ultra 12.0* e salvos no formato adequado para pré-otimização no programa *Avogadro* (HANWELL, 2012).
- ii. Em seguida, foi criado um input *mop* para otimização no programa *Mopac2016* no nível PM6.
- iii. Foi gerado um arquivo *out* após a otimização que foi aberto novamente no programa *Avogadro* (HANWELL, 2012) e salvo no formato *pdb*.
- iv. Os ligantes *pdb* foram abertos no programa *AutoDockTools* (MORRIS, 2009) para a remoção dos hidrogênios apolares e avaliação das cargas de Gasteiger. Em seguida todos os ligantes foram salvos no formato *pdbqt*.

4.4 Cálculo do Grid e Docking

- i. Para realização do cálculo de docking o tamanho do *grid* foi ajustado a partir da estrutura do ligante co-cristalizado, de modo a incluir todo sítio de ativo da proteína.
- ii. Desta forma, o docking foi processado com as dimensões do *grid* nos eixos X, Y e Z de: 56x56x56 Å, com espaçamento de 0,375 Å (valor padrão) e o centro da grade dos eixos X, Y e Z, foram definidos como 1.709, 10.7, 5.942, respectivamente.
- iii. Foram criados arquivos *dpf* para as análises de docking do algoritmo genético Lamarckiano. Cada cálculo de docking foi processado com 100 conformações e foram realizados no Laboratório de Simulação Computacional (LaSC) na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST).

4.5 Análise das principais interações intermoleculares e das Propriedades Farmacocinéticas

- i. A análise das principais interações dos compostos tiazolidínicos em estudo com os resíduos da cruzaina foi feita através do programa *Discovery Studio 2017* (BIOVIA, 2017).
- ii. Para avaliação das propriedades físico-químicas e das propriedades farmacocinéticas a estrutura tridimensional dos 8 ligantes analisados neste estudo foi traduzido para o formato SMILES. O formato SMILES desses compostos foi processado usando as ferramentas online pkCSM e SwissADME. Disponível respectivamente em:
 - http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/prediction/adme_1531024248.18/;
 - <http://www.swissadme.ch/index.php>

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cruzaina possui quatro sítios de ligação, favorecendo assim as possibilidades de ligações com fármacos. Nesse estudo foram previstas 100 conformações possíveis para cada ligante da série de compostos analisada com a proteína alvo, sendo selecionado o complexo com energia de interação mais negativa. Os compostos analisados nesta pesquisa possuem atividade tripanocida para as formas epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi* comprovada nos estudos realizados por Oliveira et al (2015) realizado no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

As propriedades físico-químicas dos ligantes, bem como suas interações com as proteínas plasmáticas são alguns dos fatores que influencia na velocidade com que um determinado composto atinge o local de ação. Deste modo, realizar o estudo desses fatores é extremamente importante para se estimar o potencial farmacocinético dos compostos.

5.1 Análise do re-docking

O re-docking do ligante co-cristalizado α -cetoéster no sítio ativo da proteína, foi realizado de acordo com o protocolo mencionado no item 3.4 da metodologia. O resultado mostrou um RMSD de 1,29 Å e energia de ligação -6,61 kcal.mol⁻¹. A comparação por sobreposição estrutural com o complexo original revelou um modo de ligação similar à conformação original. A Figura 13 mostra a pose cristalográfica original (cinza) e após o re-docking (amarelo) do α -cetoéster no sítio de ligação, para o grid 56x56x56 Å.

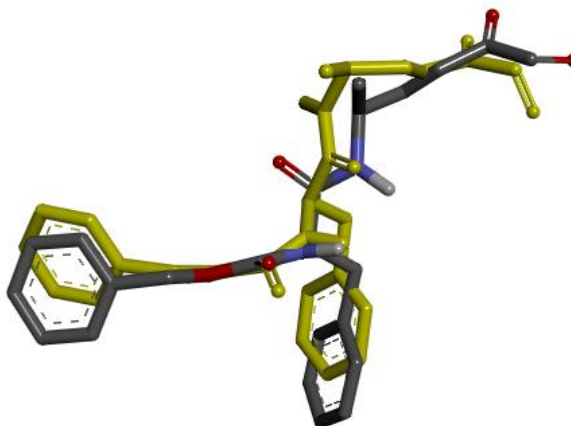
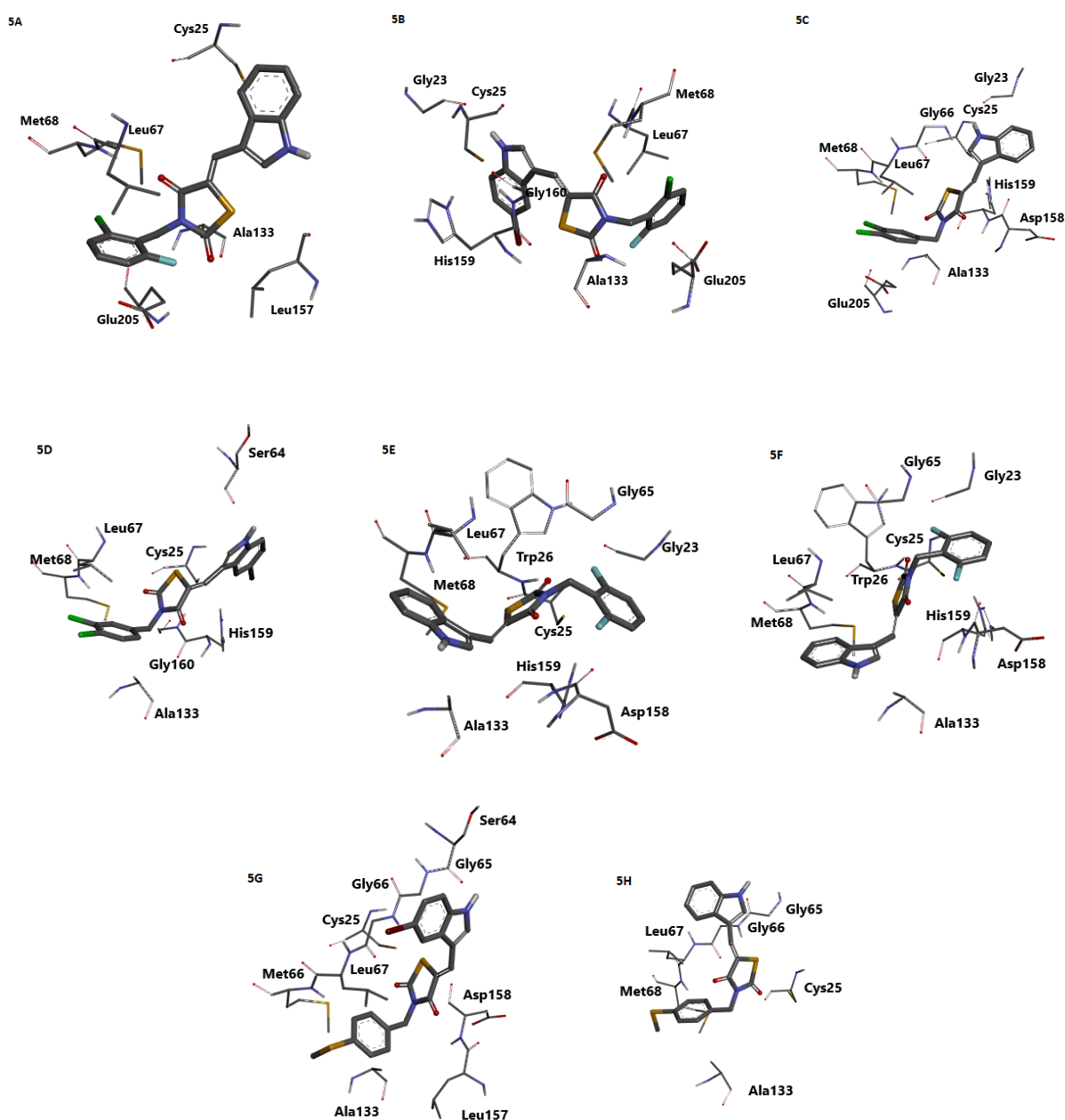


Figura 14. Sobreposição do α -cetoéster original (cinza) e da melhor pose de docking (amarelo), com RMSD=1,29Å.

5.2 Análise de docking para a classe de compostos derivados da tiazolidina-2,4-diones

Os resultados obtidos para o docking desses derivados indicaram que todos os compostos ficaram localizados no sítio ativo da proteína. Isso pode ser observado na ilustração abaixo (Figura 14), onde são mostrados os derivados 5A-5H interagindo com alguns resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da cruzaina.

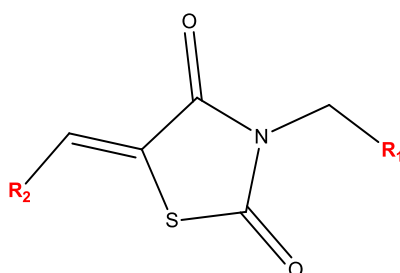
Figura 15. Ilustração dos resíduos do sítio ativo da proteína cruzaina com os derivados de tiazolidina.



Fonte: Elaboração própria.

A partir dos estudos de docking, foi possível avaliar a afinidade de ligação para formação do complexo proteína-ligante. Na tabela 1 abaixo estão descritos os valores com energia de interação mais negativa das 100 conformações geradas de cada complexo proteína-ligante e as principais interações entre os ligantes e o receptor.

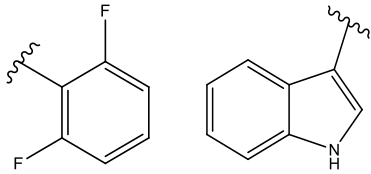
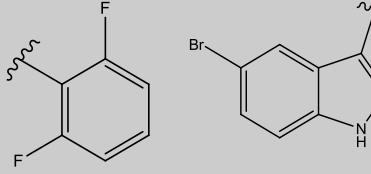
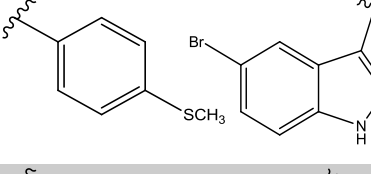
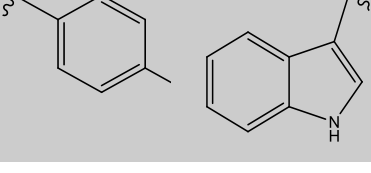
Figura 16. Estrutura básica dos ligantes



Fonte adaptada: OLIVEIRA; et al, 2015.

Tabela 1. Energias de ligação e tipo de interação para cada complexo (proteína-ligante), após o estudo de docking.

Composto	Energia de ligação do re-docking (-6, 61 kcal.mol ⁻¹) Energia de ligação (kcal.mol ⁻¹)	R ₁	R ₂	Ligação de hidrogênio	Interações hidrofóbicas		
					π -alquila/alquila	π - σ	π - π Stacked
5A	-7,71			Met68	Leu67 Leu157 Met68 Cys25	Leu67 Ala133	—
5B	-7,79			Met68 Gly23	Cys25 Met68 Leu67	Ala133 Leu67	His159
5C	-8,02			Gly23	Ala133 Leu67 Cys25 Met68	Leu67	Asp158
5D	-8,24			Cys25 Ser64	Leu67 Cys25 Met68 His159	Leu67 Ala133	His159

5E	-6,93		Cys25 Trp26	Ala133 Cys25	Leu67	—
5F	-7,27		Cys25 Gly66	Ala133 Met68 Cys25	Leu67	Leu157
5G	-8,16		Cys25 Ser64	Leu67 Met68	Gly65 Met68 Ala133 Leu67	Leu157 Gly65
5H	-7,63		Cys25	Leu67 Met68	Met68 Ala133 Leu67	Gly65 Gly66

Fonte adaptada: OLIVEIRA; et al, 2015.

Avaliando a afinidade de ligação para a formação do complexo proteína-ligante, os resultados de docking mostraram que os ligantes possuem boa afinidade de ligação com a cruzaina, uma vez que o complexo que apresentou energia de ligação menos negativa foi a do composto 5E, equivalente a $-6,93 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Os outros ligantes da série formaram complexos de menor energia sendo os mais estáveis aqueles complexos formados pela interação com os ligantes 5D com energia de interação de $-8,24 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e 5G com $-8,16 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

É possível observar que a presença do bromo ligado ao substituinte indol das estruturas R_2 favorecem a estabilidade do complexo pois os ligantes 5B, 5D, 5F e 5G apresentam melhor afinidade de ligação com a proteína quando comparado as estruturas semelhantes sem o bromo. Deste modo, pode-se dizer que as interações com o bromo, por possuir um raio atômico maior que o hidrogênio, possibilita mais interações com o subsítio de ligação da proteína. Foi notado também que a posição dos anéis que estão *para* substituídos com o grupo metanotiol (SCH_3) e os que apresentam isomeria *cis* com átomos de cloro, contribuam para a estabilização do complexo, pois foi observado que os substituintes que apresentam essas características apresentaram melhor afinidade com o receptor segundo o resultado do docking.

É importante ressaltar que todos os compostos tiazolidina utilizados nesse estudo apresentaram melhor energia de interação para a formação do complexo, do que o ligante original após o cálculo do re-docking.

5.3 Análise das interações receptor-ligante

Após a realização das simulações de docking molecular, as interações entre a cruzaina e os ligantes derivados dos compostos tiazolidínicos, foram avaliados com o auxílio do programa *Discovery Studio 2017* (BIOVIA, 2017). Esse programa tem como uma de suas funções avaliar o comportamento entre o receptor e o ligante, identificando as interações intermoleculares que ocorreram na formação do complexo, gerando mapas 2D que mostram o tipo de interação que foi realizada entre a proteína e o ligante.

Na Tabela 1 foram destacadas as principais interações intermoleculares entre os ligantes e o resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da proteína alvo desse estudo. Foram evidenciadas as ligações de hidrogênio, pois, em termos de energia, elas são as interações mais importantes depois das ligações covalentes existentes nos sistemas biológicos. E também as interações hidrofóbicas, que são individualmente fracas e ocorrem em função da interação entre cadeias ou subunidades pouco polares. Em vista do grande número de subunidades hidrofóbicas presentes nas estruturas de peptídeos e fármacos, essa interação pode ser considerada importante para o reconhecimento de uma molécula pequena (ligante) pela proteína (BARREIRA; FRAGA, 2015).

Entre as interações hidrofóbicas destacam-se as interações π - π stacking que se refere a uma atração, não covalente entre anéis aromáticos. Essas interações são importantes na organização das moléculas de DNA e de RNA, tais como a dobra das proteínas e reconhecimento molecular (BROW, 2005). E, as interações ou conjugação α - π , que pode ser entendida como uma sobreposição de um orbital α de uma ligação C-H e o orbital π da ligação C-C (BRUICE, 2006).

A partir dos dados descritos na tabela acima é possível observar que a formação do complexo proteína-ligante ocorre preferencialmente por meio de interações hidrofóbicas, uma vez que é o tipo de interação que se sobressai, um resultado esperado visto que a cruzaina possui um subsítio (S2) que é delimitado pelas cadeias laterais de resíduos hidrofóbicos Met68, Ala133, Leu67, Leu157 e Gly160, sendo este essencial para a especificidade da enzima (BOURGUIGNON et al., 2011), além de que, todos os ligantes possuem anéis aromático, que apresentam alta hidrofobicidade. Os complexos que apresentaram maior estabilidade foram aqueles formados com os ligantes 5D e 5G, sendo esses complexos caracterizados pelo grande número de interações hidrofóbicas o que pode ser explicado pela presença do átomo de bromo em sua estrutura e pela posição *cis* e *para* dos átomos envolvidos nas estruturas dos substituintes. Além disso, são os compostos com o maior número interações com os resíduos

do sítio ativo, nove para o 5 D e dez para o 5G. Nas figuras 16 e 17 abaixo estão representados os diagramas 2D de todas as interações intermoleculares realizadas por esses complexos (ver apêndice com as ilustrações das interações dos outros complexos).

É observado também que todos os ligantes interagem por meio de ligações hidrofóbicas com o resíduo Leu67, presente nos subsítios S1, S2 e S3. E que todos os compostos interagem com pelo menos um dos resíduos que formar a tríade catalítica da cruzaina (Cys25, His159 e Asn175). Com destaque para o ligante 5D, que realiza importante ligação de hidrogênio com a Cys25 e interações hidrofóbicas com a His159 e também com a Cys 25, evidenciando a boa afinidade de ligação, devido ao seu valor de menor energia.

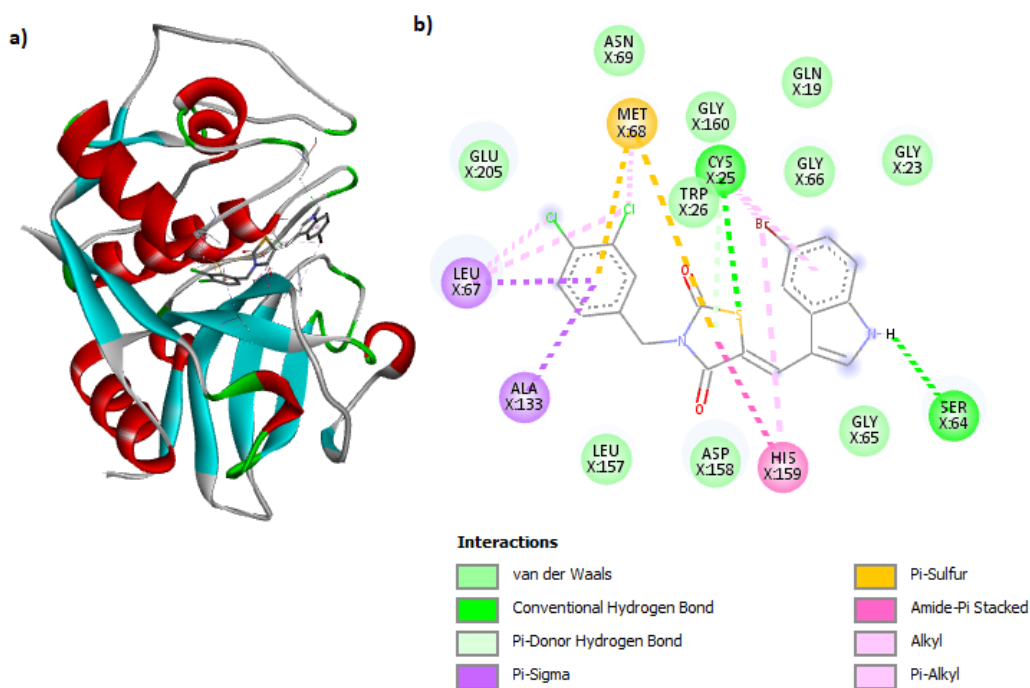


Figura 17. (a) Docking da conformação do ligante 5D com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5D com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.

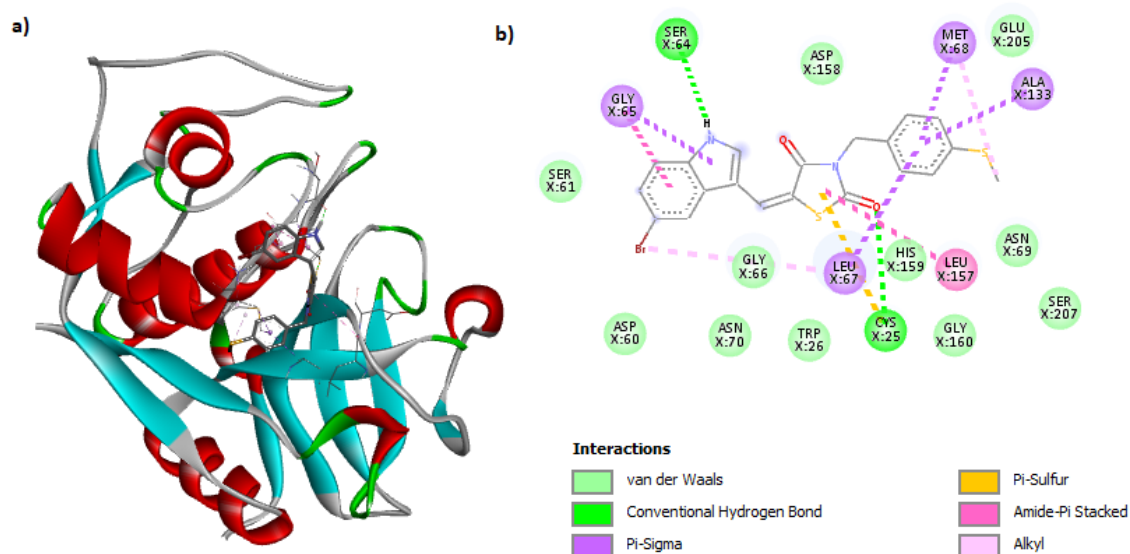


Figura 18. (a) Docking da conformação do ligante 5G com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5G com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.

É importante ressaltar que todos os compostos fazem interação com o resíduo Cys25. O ligante 5D, 5E e 5F, realizam tanto interações hidrofóbicas, como ligações de hidrogênio com a Cys25, já os compostos 5A, 5B, 5C, 5G e 5H apenas interações hidrofóbicas. Silva-Junior et al (2018) sugerem que a interação com esse aminoácido é um dos mais importantes para um potencial inibidor.

Oliveira et al (2015) determinaram a atividade antiparasitária contando o número de parasitas em uma câmara de Neubauer e calculando a concentração do composto necessária para inibir 50 % da fase epimastigota e tripomastigota, IC_{50} (concentração de inibição). O benznidazol foi utilizado como droga antiparasitária de referência e exibiu IC_{50} de 12,7 e 1,63 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra tripomastigotas e epimastigotas, respectivamente.

Diante disso, esse estudo pretende fazer uma comparação entre os resultados teóricos de docking e os resultados experimentais encontrados na pesquisa de Oliveira et al (2015). Na tabela 2 estão expressos os resultados da pesquisa experimental, onde foi observado que os compostos derivados de tiazolidina 5A (indole; 2-cloro, 6-fluoro), 5C (indole; 3,4-dicloro), 5D (bromo-indole; 3,4-dicloro), 5E (indole; 2,6difluoro) e 5G (bromo-indole, metilsulfanil) não apresentaram atividade tripanocida satisfatória contra formas epimastigotas e tripomastigotas, comparada ao composto de referência benznidazol. Entretanto, o derivado 5B (bromoindol; 2-cloro, 6-fluoro) produziu um bom resultado, porém, somente contra as formas epimastigotas, com um IC_{50} de 2,89 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Os compostos 5F (bromo-indole, 2,6-difluoro) e 5H (indol; metilsulfanil) exibiram atividade muito promissora e um desempenho mais eficiente contra as

formas epimastigotas e tripomastigotas do *T.cruzi* do que o benznidazol, com valores de IC_{50} menores que $12,7 \mu\text{g} / \text{mL}$ (epimastigotas) e $1,63 \mu\text{g} / \text{mL}$ (tripomastigotas).

Tabela 2. Atividade tripanocida de compostos tiazolidínicos contra formas epimastigotas e tripomastigotas comparadas a energia de ligação para a formação do complexo com a proteína cruzaina.

Composto	Atividade tripanocida IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		Energia de ligação (kcal mol^{-1})
	Epimastigota	Tripomastigota	
5A	21,15	7,0	-7,71
5B	2,89	7,3	-7,79
5C	27,7	5,0	-8,02
5D	27,7	5,96	-8,24
5E	ND**	6,0	-6,93
5F	0,98	0,43	-7,27
5G	6,65	ND**	-8,16
5H	1,36	1,58	-7,63

* IC_{50} : Representa a concentração necessária para se obter 50% de inibição; ** ND: significa não determinado, devido a falta de atividade nas concentrações testadas que impossibilitou calcular os valores de IC_{50} .

Quando comparado ao estudo experimental, o estudo teórico realizado com o alvo da cruzaina exibiu energias de ligação que não são coincidentes com os valores de melhor inibição *in vitro*. Contudo, pode-se afirmar que a inibição da cruzaina é um mecanismo possível, uma vez que a energia de ligação para formação do complexo proteína-ligante das estruturas em estudo foram todas negativas, sendo a maior energia de $-6,93 \text{ kcal. mol}^{-1}$, além de que, as interações intermoleculares aconteceram com os resíduos do sítio ativo da proteína. Logo, é perceptível que esse não é necessariamente o principal mecanismo de ação destas drogas e que, portanto, a realização de testes de inibição de forma específica na proteína cruzaina seria necessária para confirmar essa hipótese.

Algo importante a ser considerado é que o ligante 5F que apresentou melhor potencial de inibição nos testes experimentais, também realiza interações com o resíduo catalítico Cys25, tanto de forma hidrofóbica, como também por meio de ligações de hidrogênio.

5.3 Análise das propriedades farmacocinéticas

Além da modelagem do complexo proteína-ligante, foi verificada a capacidade de absorção *in vivo* das moléculas utilizadas nesse estudo, na tentativa de avaliar por meio de cálculos teóricos, o composto que terá boa biodisponibilidade quando administrado oralmente, seguindo as regras de Lipinski e Veber, desta forma, as moléculas promissoras a fármacos

devem possuir: doadores de hidrogênio ≤ 5 (grupos OH e NH); aceitadores de ligação de hidrogênio ≤ 10 (átomos N e O); peso molecular $< 500 \text{ g.mol}^{-1}$; ClogP < 5 (ou o MLogP < 4.15); N° de ligações rotacionáveis ≤ 10 ; 0 e área de superfície polar (PSA) $\leq 140 \text{ Å}^2$ (LIPINSKI, 2001; VEBER et 2002).

Verificar esses parâmetros é muito importante durante o desenvolvimento de novas moléculas bioativas, pois, é considerada a relevância da disponibilidade das drogas durante os ensaios clínicos, bem como as vantagens da via oral para a administração de fármacos (SANTOS; GONSALVES; ARAÚJO, 2017).

Tabela 3. Parâmetros computacionais de biodisponibilidade dos compostos.

Composto	5A	5B	5C	5D	5E	5F	5G	5H
MW (g mol ⁻¹)	386,83	465,72	403,28	482,18	370,37	449,27	459,38	380,48
N° de LR	3	3	3	3	3	3	4	4
HBA	3	3	2	2	4	4	2	2
HBD	1	1	1	1	1	1	1	1
Ali LogS	-6,11	-6,82	-6,65	-7,37	-5,56	-5,92	-7,31	-6,41
MlogP	3,08	4,09	3,20	4,20	3,38	3,98	3,71	3,11
PSA (Å²)	78,47	78,47	78,47	78,47	78,47	78,47	103,77	103,77
Per. Caco2 (log Papp;log cm/s)	1,506	1,234	1,223	1,199	1,341	1,297	1,204	1,219
Abs. Int (%)	88,123	84,795	87,108	83,551	88,406	85,524	85,179	88,891
VDss (log L / kg)	0,407	0,174	0,462	0,233	-0,092	0,04	0,241	0,274
Per. BHE (log BB)	-0,097	-0,022	0,023	0,286	-0,145	-0,108	0,295	-0,058
Per. SNC (log PS)	-1,665	-1,501	-1,504	-1,361	-1,815	-1,645	-1,554	-1,724

MW: Peso molecular, **N° de LR:** Número de ligações rotativas, **HBD:** Grupos doadores de hidrogênio, **HBA:** Grupos receptores de hidrogênio, **LogS:** Solubilidade aquosa, **MlogP:** Lipofilicidade, **PSA:** Área de superfície polar, **Abs. Int:** Absorção intestinal humana, **Per. Caco2:** Permeabilidade nas células Caco-2, **VDss:** Volume de distribuição, **Per. BHE:** Permeação da barreira hematoencefálica, **Per. SNC:** Permeação no sistema nervoso central.

Os descritores farmacocinéticos da regra de Lipinski e Veber foram analisadas a partir dos dados obtidos na plataforma SwissADME, onde é possível perceber que apenas o ligante 5D viola um dos parâmetros da regra dos 5, assumindo MlogP maior que 4,15. Todos os

compostos obedecem aos parâmetros propostos por Veber, assumindo o número de ligações rotacionáveis menor que 10 e área de superfície polar menor que $140 \text{ \AA}^2$, o que confere a esses compostos uma flexibilidade que é uma importante característica para a passagem de fármacos através das membranas (CLARK & PICKETT, 2000; VEBER, et al, 2002).

A lipofilicidade é expressa por meio do coeficiente de partição entre o n-octanol e a água (DAINA, MICHIELIN & ZOETE, 2017). Dentre os compostos estudados neste trabalho, o ligante 5D é o mais lipofílico (4,20) da série de ligantes, o que pode ser explicado pelo grande número de interações hidrofóbicas realizada por ele. Consequentemente, esse composto é o que apresenta menor valor de solubilidade aquosa (-7,35). É importante ressaltar que, o ligante com maior lipofilicidade (5D) é o que apresenta menor energia de interação ($-8,30 \text{ kcal.mol}^{-1}$) para a formação do complexo com a cruzaina quando comparado os resultados do docking, evidenciando a boa afinidade da proteína com ligantes lipofílicos.

A solubilidade aquosa é o inverso da lipofilicidade, ela é explicada numericamente pelo método Ali LogS. Quando se tem uma molécula solúvel isso facilita imensamente muitas atividades de desenvolvimento de medicamentos, especialmente a facilidade de manuseio e formulação. E, além disso, a solubilidade é uma das principais propriedades que influênciam as características de absorção e distribuição de fármacos, de modo geral, um composto com baixa solubilidade aquosa não é bem absorvido pelo organismo. Uma estimativa qualitativa da classe de solubilidade é dada de acordo com a seguinte escala logS: insolúvel <-10 <pouco solúvel <-6 <moderadamente solúvel <-4 <solúvel <-2 <muito <0 <altamente (DAINA, MICHIELIN & ZOETE, 2017).

Os ligantes 5E (LogS = -5,56) e 5F (LogS=-5,92), são classificados com solubilidade moderada com valor de LogS > -6 , sendo o composto 5F o que apresentou melhor atividade triponocida (ver tabela 2) com as menores concentrações para inibição das formas tripomastigotas e epimastigotas. Todos os outros ligantes apresentaram LogS < -6 , sendo considerados poucos solúveis.

Outras propriedades importantes para compostos com potencialidade farmacêutica foram investigadas por meio da plataforma pkCSM, como a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano, Caco-2, que recebeu popularidade na indústria farmacêutica, pois, permite avaliar a capacidade potencial de absorção intestinal *in vivo* de drogas e fármacos além de permitir a determinação de mecanismos de transportes de um vasto número de candidatos a fármacos (CHONG; DANDO; MORRISON, 1997). Considera-se que um composto tem elevada permeabilidade ao Caco-2 se o logaritmo do coeficiente de permeabilidade aparente (log Papp: log cm/s) tiver valores previstos $> 0,90$ (PIRES;

BLUNDELL; ASCHER, 2015). Todos os ligantes da série em estudo apresentaram valores de permeabilidade das células Caco-2 maior que 0,90, logo, é possível prever que todos os compostos estudados neste trabalho apresentam alta permeabilidade, com destaque para o ligante 5A, que exibiu maior resultado (1,506).

O percentual de absorção intestinal é um método construído para prever a proporção de compostos que foram absorvidos pelo intestino delgado humano. Sendo normalmente o intestino o primeiro local para a absorção de um fármaco a partir de uma solução administrada oralmente. Os compostos em análise nesse trabalho mostraram bom percentual de absorção através do intestino delgado, chegando a quase 90%. É considerado pouco absorvida a molécula que apresentar absorção inferior a 30% (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

Um outro fator observado foi o volume de distribuição (VDss), que é o volume teórico que a dose total de um medicamento precisaria para ser uniformemente distribuída para que dê a mesma concentração que no plasma sanguíneo. Quanto maior o VDss, mais droga é distribuída no tecido e não no plasma, o que pode acarretar em insuficiência renal e desidratação. O VDss é considerado baixo se o $\log VDss < -0,15$ e alto de o $\log VDss > 0,45$ (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). O ligante 5C apresenta o maior valor de VDss (0,462) quando comparado aos outros compostos, por ser um valor maior que 0,45, isso indica que ele possui mais chances de ser absorvido pelo tecido do que pelo plasma. O ligante 5E, apresentou menor valor de VDss (-0,092) e os outros compostos, apresentaram valores intermediários.

O cérebro usa a barreira hematoencefálica (BHE) como proteção para compostos exógenos. A possibilidade de uma droga atravessar o cérebro é um parâmetro importante a se considerar para auxiliar a diminuir os efeitos colaterais e toxicidade ou melhorar a eficácia de drogas cuja a ação farmacológica está dentro do cérebro. Um determinado composto com $\log BB > 0,3$ é considerado para atravessar facilmente a BHE, enquanto moléculas com $\log BB < -1$ são mal distribuídos para o cérebro (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). Os compostos 5E e 5F, com valores de $\log BB$ de -0,145 e -0,108 respectivamente, são os únicos compostos que não apresentam potencialidades de atravessar a BHE, segundo estudo teórico. Os demais ligantes apresentam uma probabilidade moderada, com valores que variam de -0,097 a 0,295.

Por fim, o último parâmetro analisado foi a permeabilidade no sistema nervo central (SNC). O SNC é uma zona privilegiada protegida pela BHE (ROJAS; RITTER; PIZZOL, 2011). Considera-se que os compostos com $\log PS > -2$ penetram no sistema nervoso central, enquanto aqueles com $\log PS < -3$ são considerados como incapazes de penetrar no SNC (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). Foi observado que todos os ligantes da classe tiazolidina são capazes de penetrar o SNC, pois apresentam $\log BB$ maior que -2, variando de -1,361 a -1,815.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Partindo do pressuposto que os compostos são inibidores competitivos ou agem sobre o mesmo sítio de ligação, os resultados teóricos do docking molecular mostraram que a classe de ligantes tiazolidina podem apresentar boa afinidade de ligação com a proteína cruzaina, uma vez que a formação do complexo menos estável exibiu energia de ligação de $-6,93 \text{ kcal. mol}^{-1}$. Um outro fator observado a essa afinidade está relacionado a valor de lipofilicidade, sendo o ligante mais estável (com energia de ligação de $-8,24 \text{ kcal. mol}^{-1}$) o que apresentou maior valor de lipofilicidade (4,20), evidenciando a afinidade da cruzaina com compostos lipofílicos.

A partir das análises das interações intermoleculares, notou-se que todos ligantes realizaram importantes interações hidrofóbicas e de hidrogênio com o resíduo Cys25, principal da tríade catalítica e importante para a inibição da proteína. Foi indicado também, que o maior número de interações aconteceu com os resíduos hidrofóbicos do subsítio S2, responsável pela especificidade da enzima.

Foi possível concluir para esse teste *in silico*, que o resultado de docking não coincide com o resultado experimental, mas que testes futuros de inibição da proteína devem ser realizados, pois os ligantes favoreceram a formação de complexos estáveis e apresentam bons potenciais de inibição.

Na análise do perfil farmacocinéticos dos compostos em estudo, foi possível determinar a partir de suas propriedades físico-químicas que, apenas o ligante 5D viola um dos parâmetros propostos por Lipinski assumindo um valor de logP maior que o desejado. A solubilidade aquosa manteve se na faixa de “pouco solúvel” à “solubilidade moderada”. Foi observado também que todos os ligantes possuem alta probabilidade de permeação nas células Caco-2, e também apresentaram bom percentual de absorção através do intestino. A análise do VDss indicou que apenas o ligante 5C possui maior probabilidade de se distribuir nos tecidos no que no plasma. Verificando a possibilidade desses compostos em atravessas a BHE, apenas os ligantes 5E e 5F possuem o menor valor de logBB, os demais apresentam probabilidade moderada, como consequência há uma boa probabilidade desses compostos apresentarem potencial para penetrar no sistema nervoso central.

Com a relação à estrutura química dos compostos, foi possível observar que os ligantes que apresentam o átomo de Br em sua estrutura exibiram maior energia de interação, assim como os que estão *para* substituídos com o grupo metanotiol e isomeria *cis* com os átomos de cloro.

De um modo geral, existem boas possibilidades desses compostos se transformarem em

fármacos com atividade antichagásica, pois apresentaram atividade promissora para a inibição cruzaina e muitos destes demostram boas possibilidades para administração de oral.

7. PERSPECTIVAS

- Realizar testes de inibição da proteína cruzaina *in vitro* nos estágios amastigota, epimastigota e tripomastigota, afim de buscar uma correlação mais específica dos testes teóricos com os experimentais.
- Buscar informações sobre a quantização da cruzaina nos três estágios evolutivos do *T. cruzi*, afim de encontrar um alvo mais específico para o tratamento.

REFERÊNCIAS

AERTS, C. et al. **Are public-private partnerships the solution to tackle neglected tropical disease? A systema review of the literature.** Health Policy, v.7, p. 745-54, 2017.

ANDRADE, S. G. et al. **Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 86, p. 624-626, 1992.

ASATI, V.; MAHAPATRA, D.K.; BHARTI, S.K. **Thiazolidine-2,4-diones as multi-targeted scaffold in medicinal chemistry:** Potential anticancer agents. European Journal of Medicinal Chemistry, 87, p. 814-833, 2014.

BARREIRO, E.J; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal:** As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. 3ª Edição, Editora ArtMed, Porto Alegre, 2015.

BARRETT, M. P; et al. **The trypanosomiasis.** The LANCET, v. 362, p. 1469-1480, 2003.

BERND, W. G.K., KLAUS, S. **Functions of propeptide parts in cysteine proteases.** Current Protein and Peptide Science, p. 309-326, 2003.

BOURGUIGNON, Saulo C. et al. **Trypanosoma cruzi:** Insights into naphthoquinone effects on growth and proteinase activity. Experimental Parasitology, [s.l.], v. 127, n. 1, p.160-166, jan. 2011.

BRAK, Katrien; et al. **Identification of a New Class of Nonpeptidic Inhibitors of Cruzain.** Journal of the American Chemical Society. p. 1-42, 2008.

BRANQUINHA, M. et al. **The widespread anti-protozoal action of HIV aspartic peptidaseinhibitors:** focus on plasmodium spp., Leishmania spp. and Trypanosoma cruzi. CurrentTopics in Medicinal Chemistry, v. 17, n. 11, p. 1303 - 1317, 2017.

BROW, T. L, et al. **Química, a ciência central** - São Paulo: Pearson Prentice Hall, ed. 9, 2005.

BRUICE, P. Y. **Química orgânica.** São Paulo : Pearson Prentice Hall, ed. 4, v. 1, 2006.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. **Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis).** Human and Experimental Toxicology, Basingstoke, v. 25, p. 471-9, 2006.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html> Acessado em 02/01/2019.

CHAGAS C. **Nova tripanozomíase humana.** Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Memórias de Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 1, p. 159–218, 1909.

CHONG, S.; DANDO, S.; MARRISON, R. **A evaluation of biocoat ® intestinal epithelium differentiation environment (3-day cultured Caco-2 cells) as na absorption screening model with improved productivity.** Pharmaceutical Research, v.14, n. 12, p. 1835-1837, 1997).

CLARK D. E. AND PICKETT S. P. **Computational methods for the prediction of „drug-likeness“**DDT, v.5, n.2, 2000.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. **A critical review on Chagas disease chemotherapy.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 97, p.3-24, 2002.

COURA, J. R; VINÃS, P. A; JUNQUEIRA, A. CV. **Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol. 109(7): 856-862, 2014.

DAINA, A., MICHIELIN, O. & ZOETE, V. **SwissADME:** a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci. Rep. 7, 42717 (2017).

Dassault Systèmes BIOVIA, **Discovery Studio Visualizer**, version 16.1.0.15350, San Diego: Dassault Systèmes, 2017.

DE CASTRO, S. I. **The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*.** Acta Tropica. v.53, Issue 2, p. 83-98, 1993.

DIAS, Luiz C. et al. **Quimioterapia da doença de Chagas:** estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. Quím. Nova [online]. vol.32, n.9, pp.2444-2457, 2009.

DODSON, G. Catalytic triads and their relatives. **Trends In Biochemical Sciences**, [s.l.], v. 23, n. 9, p.347-352, 1 set. 1998. Elsevier BV.

DOS SANTOS, F. L. A.; et al. **Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas**. Rev Ciênc Farm Básica Apl. v.33, n.1, p. 37-47, 2012.

FARADY, C. J.; CRAIK, C. S. **Mechanisms of macromolecule protease inhibitors**. ChemBioChem [S.I.], v. 11, n. 17, p. 2341-2346, 2010.

FERREIRA, L. G; et al. **Molecular docking and structure-based drug design strategies**. Molecules, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

FERREIRA, Rafael Augusto Alves. **Desenvolvimento de novos inibidores da enzima cruzaina de T. cruzi, alvo terapêutico validado para a doença de Chagas**. Dissertação de mestrado– UNICAMP - Campinas, SP : [s.n.], 2016.

FRICKER, S. P.; et al. **Metal compounds for the treatment of parasitic diseases**. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n.10, p. 1839–1845, 2008.

GALVÃO, C. e et al. **A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) and their geographical distribution with nomenclatural and taxonomic notes**. Zootaxa. V. 202. Pg. 1-36, 2003.

GALVÃO, Cleber. **Vetores da doença de Chagas no Brasil**. Editora SciELO - Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014.

GEA, S.; et al. **Cruzipain, a major Trypanosoma cruzi cystein protease in the host-parasite interplay**. Imunologia, v.25, p.225-238, 2006.

GILLMOR, S. A.; CRAIK, C.S.; FLETTERICK, R. J. **Strutural determination os specificity in the cysteine protease cruzain**. Protein Science, v. 6, n. 8, p. 1603-1611, 1997.

GUIDO, Rafael V. C.; OLIVA, Glaucius; ANDRICOPULO, Adriano D.. **Structure- and ligand-based drug design approaches for neglected tropical diseases**. Pure And Applied Chemistry, [s.l.], v. 84, n. 9, p.1857-1866, 2012.

HANWELL, M. D, et al. **Avogadro**: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. J Cheminform, p.4-17, 2012.

HAVRYLYUK, Dmytro et al. **Synthesis of pyrazoline–thiazolidinone hybrids with trypanocidal activity**. European Journal Of Medicinal Chemistry, [s.l.], v. 85, p.245-254, out. 2014.

HELDT, T.; LOSS, S. H. **Interação fármaco-nutriente em unidade de terapia intensiva: uma revisão da literatura e recomendações atuais**. Rev. Bras. Ter. Intensiva, v. 25, n.2 p. 163- 167, 2013.

HOELZ, L.V.B.; et al. **Molecular dynamics simulations of the free and inhibitor-bound cruzain systems in aqueous solvent: insights on the inhibition mechanism in acidic pH**. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, v. 34, n. 9, p. 1969–1978, 2016.

HUEY, R.; et al. **A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation**, v. 28, n.6, p. 1145-1152, 2007.

KARALI, N.; et al. **Synthesis and structure– antituberculosis activity relationship of 1H-indole-2,3-dione derivatives**. Bioorg Med Chem, v.15, n.17, p.888-904, 2007.

KIRCHHOFF, L. V. **American trypanosomiasis (Chagas' disease)**. In: R.E. Rakel, Editor, Conn's Current Therapy, New York. p. 101–102, 2000.

LA-MATTIANA, J. C.; GOLAN, D.E. **Farmacocinética**. In: Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2 ed. Guanabara Koogan, 2009.

LEITE, Ana Cristina Lima, et al. **Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against Trypanosoma cruzi**. Bioorganic & Medicinal Chemistry, [s.l.], v. 14, n. 11, p.3749-3757, jun. 2006.

LEITE, Ana cristina lima et al. **Synthesis, Cruzain Docking, and in vitro Studies of Aryl-4-Oxothiazolylyhydrazones Against Trypanosoma cruzi**. Chemmedchem, [s.l.], v. 2, n. 9, p.1339-1345, 10 set. 2007.

LIPINSKI, C.A.; et al. **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings**. Adv. Drug Del. Rew. v. 46, p. 3-26, 2001.

LOPES, D. V. de S. **Farmacocinética** (fatores que determinam a concentração sanguínea de um fármaco em dado momento. UNIGRANRIO, RJ, 2018.

MARTINEZ-MAYORGA, K.; et al. **Cruzain inhibitors: efforts made, current leads and a structural outlook of new hits**. Drug Discovery Today, v. 20, n. 7, 2015, p. 890 - 898, 2015.

MCKERROW, J. H. **Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action**. International Journal for Parasitology, v. 29, n. 6, p.833–837, 1999.

MOREIRA, Diogo Rodrigo Magalhaes et al. **Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death**. European Journal Of Medicinal Chemistry, [s.l.], v. 75, p.467-478, mar. 2014.

MOREIRA, Thiago Luiz de B. et al. **Effect of thiazolidine LPSF SF29 on the growth and morphology of Trypanosoma cruzi**. International Journal Of Antimicrobial Agents, [s.l.], v. 41, n. 2, p.183-187, 2013.

MORGON, N. H; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. Livraria de Física, São Paulo, 2007.

MORRIS, Garrett M.; et al. **Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function**. Journal Of Computational Chemistry, [s.l.], v. 19, n. 14, p.1639-1662, 1998.

MORRIS GM, et al. **AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility**. J Comput Chem, v. 30, p.2785–2791, 2009.

OLIVEIRA, J. F; et al. **Synthesis and evaluation of the schistosomicidal and trypanocidal properties of thioxoimidazolidines and thiazolidin-2, 4-diones**.BJPR, v.7, n.6, p.386-400, 2015.

PEDRIQUE, Belen et al. **The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment**. The Lancet Global Health, [s.l.], v. 1, n. 6, p.371-379, dez. 2013.

PÉREZ-MOLINA, J. A. et al. **Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. London, v.64, p.1139-47, 2009.

PIACENZA, L; et al. **Trypanosoma cruzi antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease**. Antioxid Redox Signal, v. 19, n.9, p. 723-34, 2013.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. **pkCSM**: predição de propriedades farmacocinéticas de pequenas moléculas usando assinaturas baseadas em grafos. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.58, n.9, p. 4066–4072, 2015.

PITA, S.S.R; PASCUTTI, P.G. **Análise farmacofórica da tripanotona redutase (TR) de trypanosoma cruzi complexada com inibidores peptídeo miméticos**. *Rev. Virtual Quim.* vol 4. No. 6, p. 788-804, 2012.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; LITTER, J.M. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. **Chagas Disease**. *Lancet*. V. 375, Pg. 1388–402, 2010.

ROCHA, Débora A. et al. **Synthesis and structure-activity relationship studies of cruzain and rhodesain inhibitors**. *European. Journal Of Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 157, p.1426-1459, set. 2018.

ROJAS, H.; RITTER, C.; PIZZOL, F. Dal. **Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz**. *Rev Bras Ter Intensiva*, v.23, n. 2, p.222-227, 2011.

RUYCK, J.; et al. **Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel**, v.9, p1-11, 2016.

SANTOS FILHO, José Mauricio dos et al. **Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4-substituted-aryl)-1,2,4-oxadiazole-N-acylhydrazones as anti-Trypanosoma cruzi agents**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 17, n. 18, p.6682-6691, set. 2009.

SANTOS, V.; GONSALVES, A.; ARAÚJO, C. **Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de lipinski e preparação de heterociclo 1,3,4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico**. *Química Nova*, [s.l.], p.110-115, 2017.

SIEVEKING, Ivan et al. **2-Phenylaminonaphthoquinones and related compounds: Synthesis, trypanocidal and cytotoxic activities**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 22, n. 17, p.4609-4620, 2014.

SILVA-JUNIOR, Edeildo Ferreira da; et al. **Molecular Docking Studies Applied to a Dataset of Cruzain Inhibitors**. *Current Computer-aided Drug Design*, [s.l.], v. 14, n. 1, p.68-78, 21, 2018.

THEODOROU, L.G., J.G. BIETH, and E.M. PAPAMICHAEL. **The catalytic mode of cysteine proteinases of papain (C1) family**. Bioresource Technology, 98(10): p. 1931-1939, 2007.

TOLEDO, D. A. M. **Lipid body organelles within the parasite Trypanosoma cruzi: a role for intracellular arachidonic acid metabolism**. PLOS ONE, v. 11, n. 8, 2016.

TROSSINI, Gustavo H.g. et al. **Quantitative structure–activity relationships for a series of inhibitors of cruzain from Trypanosoma cruzi: Molecular modeling, CoMFA and CoMSIA studies**. Journal Of Molecular Graphics And Modelling, [s.l.], v. 28, n. 1, p.3-11, ago. 2009.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. **The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited**. Int. J. Parasitol 31, p. 472 – 481, 2001.

URBINA, J. A. **New chemotherapeutic approaches for the treatment of Chagas disease (American Trypanosomiasis)**. Expert Opinion on Therapeutic Patents, v. 13, n. 5, p. 661–669, 2003.

VEBER, D.F.; et al. **Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates**. J. Med. Chem., v.45, p.2615-2623, 2002.

VELÁZQUEZ-LÓPEZ, José Miguel et al. **Synthesis and trypanocidal activity of novel benzimidazole derivatives**. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, [s.l.], v. 26, n. 17, p.4377-4381, set. 2016.

VERDONK, M. L.; et al. **Improved protein-ligand docking using GOLD**, v. 52, n. 4, p.609-623, 2003.

VITAL, D. G.; ARRIBAS, M.; TROSSINI, G.. **Molecular Modeling and Docking Application to Evaluate Cruzain Inhibitory Activity by Chalcones and Hydrazides**, 2014.

WHALEN, K.; FINKEL, R.; PANAVELIL, T. A. **Farmacologia ilustrada**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

World Health Organization (Organização Mundial da Saúde – OMS). Chagas disease (American trypanosomiasis) <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)#](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)#)> Acessado em 02/01/2019.

World Health Organization (WHO). **Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates**. Wkly Epidemiol Rec. Geneva: WHO, v. 90, n.6, p.33-44, 2017.

YUNES, R. A CECHINEL-FILHO, V. (Org.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**, Itajaí: UNIVALI, 2007.

APÊNDICE

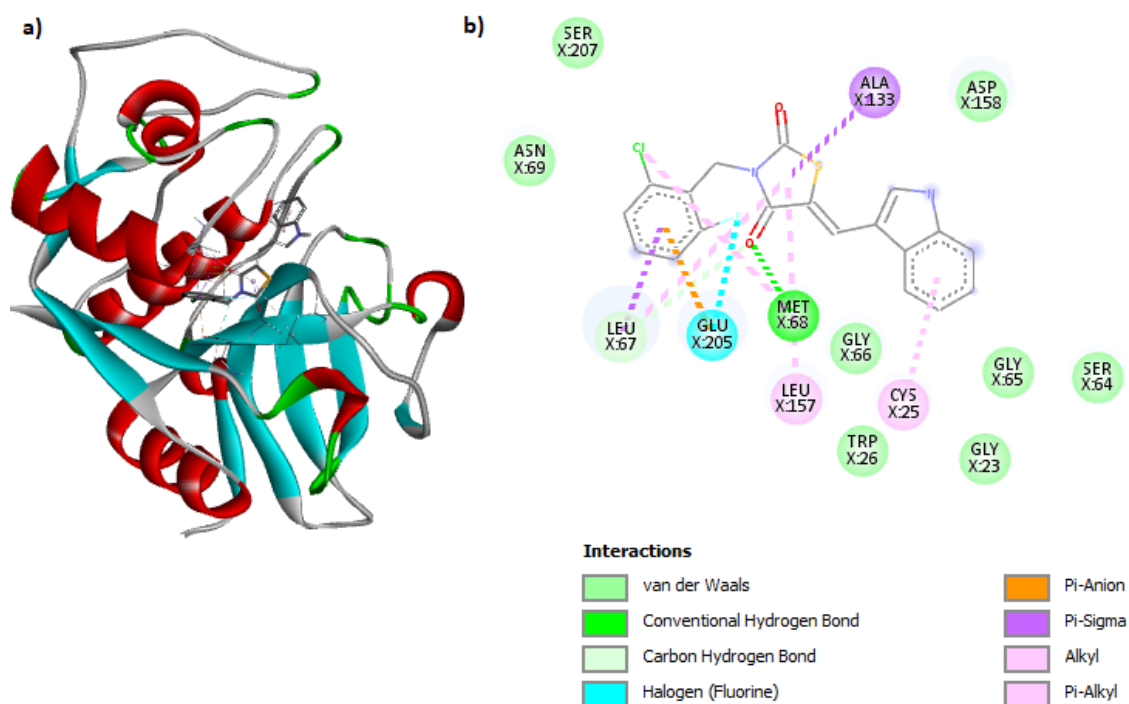


Figura 19. (a) Docking da conformação do ligante 5A com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5A com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.

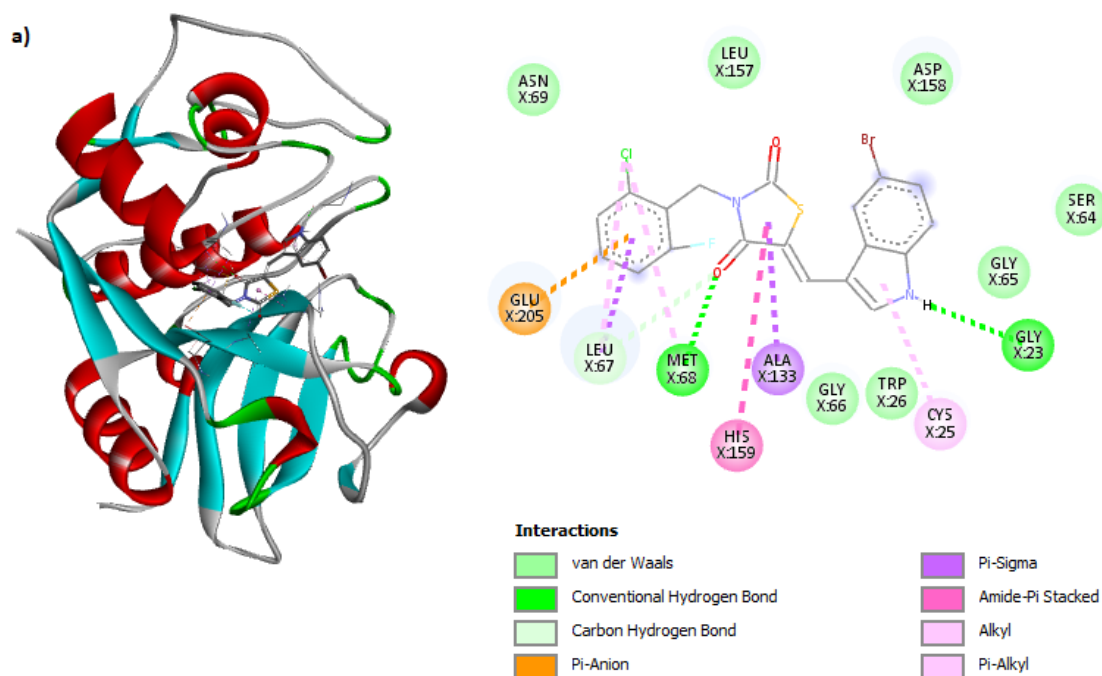


Figura 20. (a) Docking da conformação do ligante 5B com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5B com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.

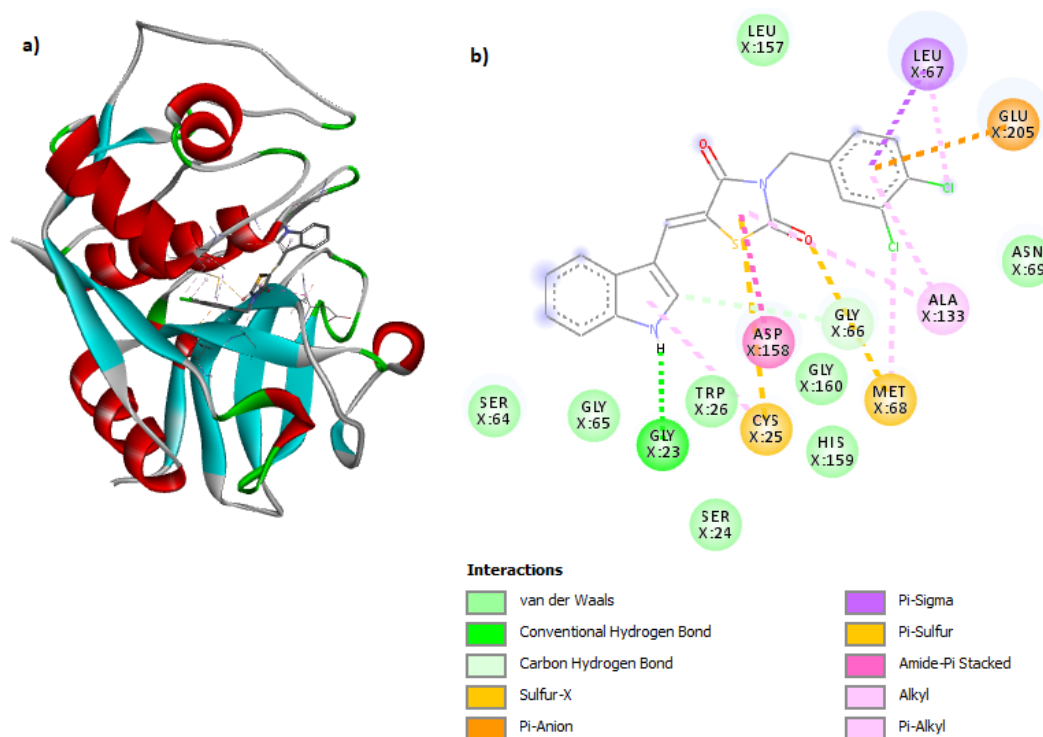


Figura 21. (a) Docking da conformação do ligante 5C com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5C com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.

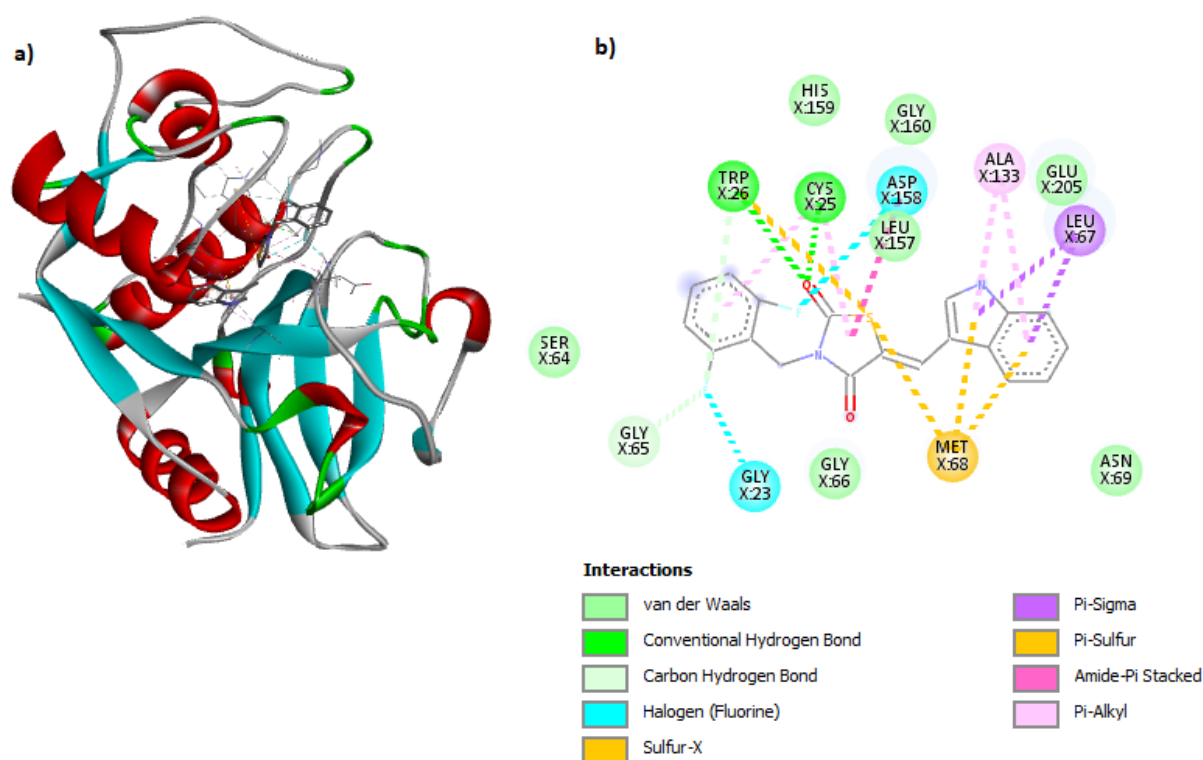


Figura 22. (a) Docking da conformação do ligante 5E com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5E com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.

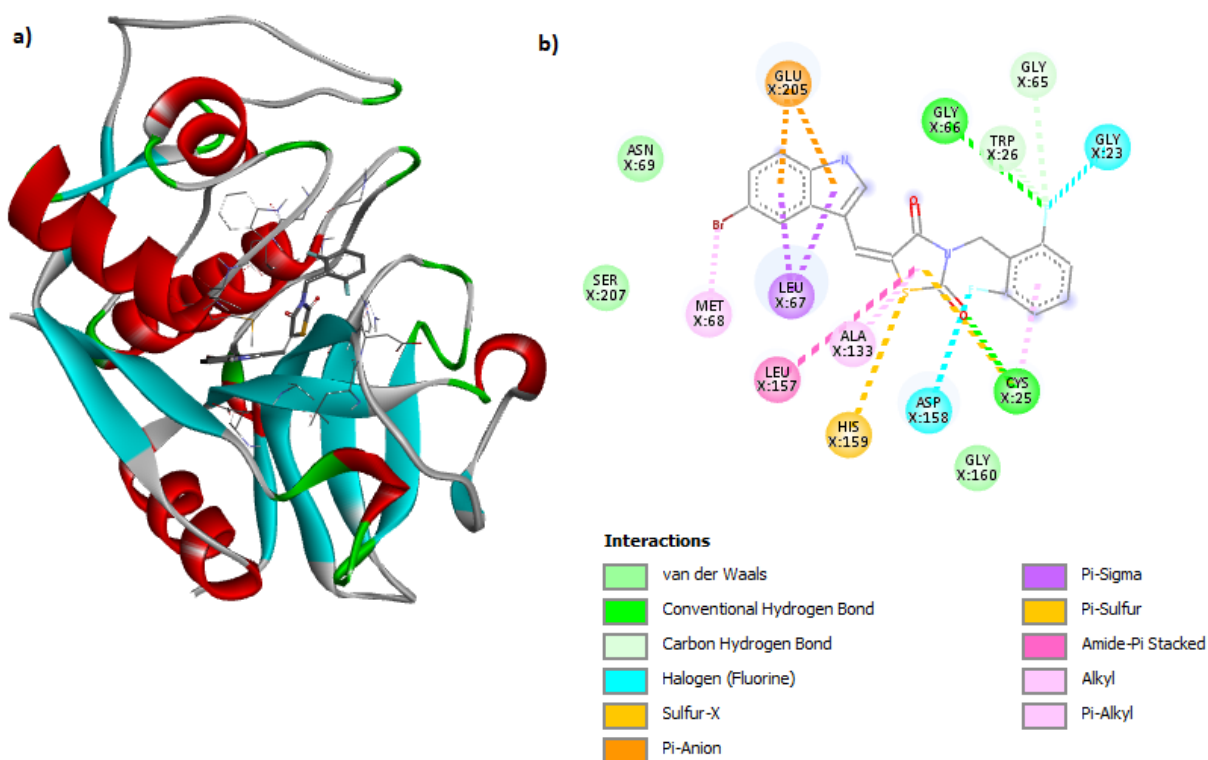


Figura 23. (a) Docking da conformação do ligante 5F com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5F com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.

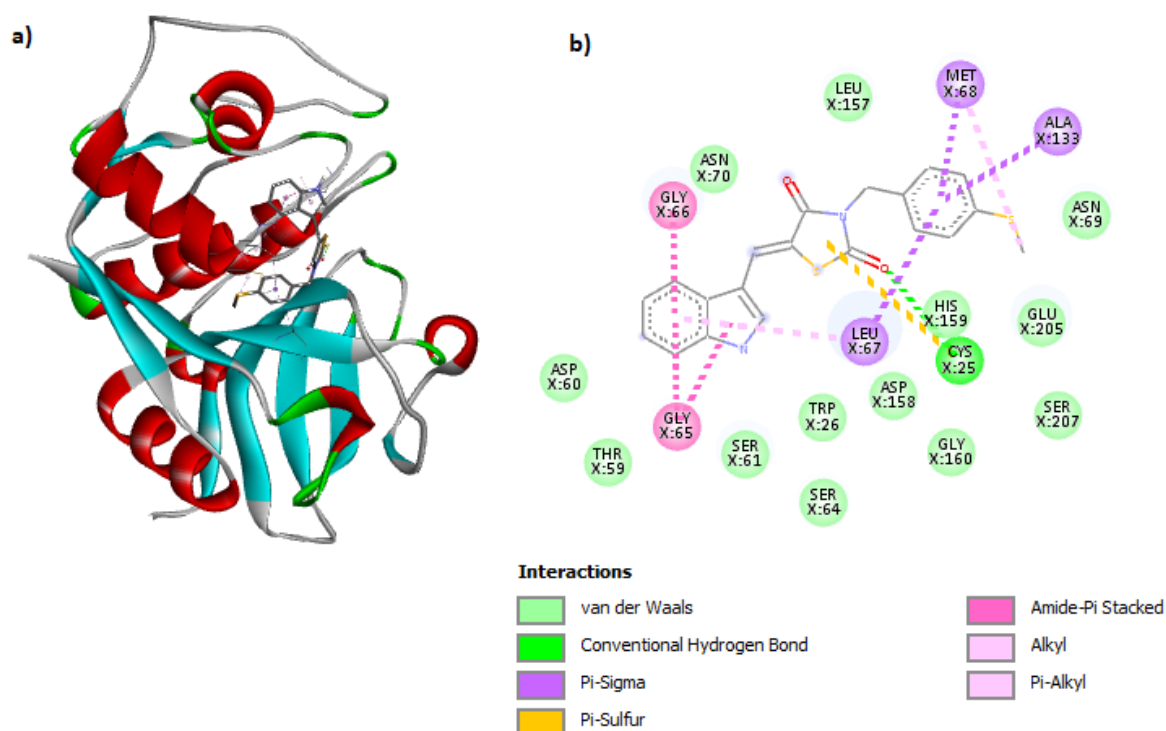


Figura 24. (a) Docking da conformação do ligante 5H com a estrutura da cruzaina. (b) Interações da ligação do composto 5H com os resíduos de aminoácidos circundantes do sítio ativo da proteína.