

UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

RAYSSA EMILY MENDES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DO PERFIL ADMET E DO POTENCIAL DE
INIBIÇÃO DE DERIVADOS DE 2,5-ANIDRO-D-MANITOL FRENTE À ENZIMA
FOSFOFRUTOQUINASE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E
*TRYPANOSOMA BRUCEI***

Barreiras – BA

2023

RAYSSA EMILY MENDES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DO PERFIL ADMET E DO POTENCIAL DE
INIBIÇÃO DE DERIVADOS DE 2,5-ANIDRO-D-MANITOL FRENTE À
ENZIMA FOSFOFRUTOQUINASE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E
*TRYPANOSOMA BRUCEI***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal
do Oeste da Bahia, como requisito
parcial para obtenção do Diploma de
Graduação no Curso de Farmácia.

Orientadora: Prof. Stefânia Neiva Lavorato

Barreiras – BA

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

S231 Santos, Rayssa Emily Mendes dos.

Avaliação in silico do perfil ADMET e do potencial de inibição de derivados de 2,5-anidro-D-manitol frente à enzima fosfofrutoquinase de *staphylococcus aureus* e *trypanosoma brucei*. / Rayssa Emily Mendes dos Santos. – 2023.

70f.: il.

Orientador: Profa Dra Stefânia Neiva Lavorato.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) –. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2023.

1. Microbiologia médica. 2. Infecções microbianas. 3. Planejamento de fármacos. I. Lavorato, Stefânia Neiva. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 616.01

RAYSSA EMILY MENDES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DO PERFIL ADMET E DO POTENCIAL DE
INIBIÇÃO DE DERIVADOS DE 2,5-ANIDRO-D-MANITOL FRENTE À
ENZIMA FOSFOFRUTOQUINASE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E
*TRYPANOSOMA BRUCEI***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Oeste da Bahia, como requisito parcial para
obtenção do Diploma de Graduação no Curso
de Farmácia.

Aprovado em 08 de dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Stefania Neiva
Laborato:015352
24614

Assinado de forma digital
por Stefania Neiva
Laborato:01535224614
Dados: 2023.12.08 18:12:17
-03'00'

Prof.^a Dr.^a. STEFÂNIA NEIVA LAVORATO
(Orientador(a))



Documento assinado digitalmente
DALILA JUNQUEIRA ALVARENGA
Data: 09/12/2023 07:18:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr.^a. DALILA JUNQUEIRA ALVARENGA
(Membro)



Documento assinado digitalmente
MANOEL FERREIRA DE MAGALHÃES FILHO
Data: 08/12/2023 18:20:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Esp. MANOEL FERREIRA DE MAGALHÃES FILHO
(Membro)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, que esteve comigo, me guardando e dando forças em todo esse período de graduação. A Ele seja dada toda glória.

A minha família por todo apoio e cuidado dedicado a mim nesse período, por todos os sacrifícios feitos em conjunto, e principalmente por todas as orações.

A minha orientadora Professora Dra. Stefânia Neiva Lavorato, por toda disponibilidade e dedicação em ensinar, e principalmente por fazer tudo com excelência e dedicação, fazendo me apaixonar por essa área do conhecimento.

A todos os meu amigos, colegas e professores de graduação por todos os momentos vividos juntos em sala de aula e por todo o aprendizado nesse período

RESUMO

As infecções bacterianas e parasitárias são um problema de saúde global. Nesse contexto, bactérias como *Staphylococcus aureus*, que possui cepas resistentes a múltiplos fármacos, e parasitas como *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono, cujo tratamento é limitado e complexo, são de grande importância pública e causam doenças que necessitam de novos tratamentos. A enzima fosfofrutoquinase (PFK) catalisa a terceira etapa da via glicolítica, principal fonte de geração de energia em diferentes seres vivos, inclusive nas duas espécies citadas. Essa enzima possui diferenças estruturais quando se compara as isoformas presentes nesses microrganismos e a isoforma presente nas células humanas, o que garante uma maior seletividade de ação a um fármaco, tornando-a um alvo interessante para realização de estudos buscando novos agentes com atividade anti-*T. brucei* e anti-*S. aureus*. O 2,5-anidro-D-manitol (2,5-AM), um análogo da β -D-frutofuranose, foi modificado e avaliado em diferentes estudos, gerando derivados que tinham uma ação inibitória de PFK. Considerando-se os derivados já descritos na literatura, o presente trabalho objetivou realizar uma análise *in silico* do perfil de interação de catorze novos derivados de 2,5-anidro-D-manitol bis-substituídos com a enzima PFK de *T. brucei* e *S. aureus* e prever os perfis de absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (ADMET) desses compostos. Em geral, os compostos estudados apresentaram um bom perfil de interação com as enzimas e perfis ADMET aceitáveis, sendo observada a tendência de melhores propriedades farmacocinéticas e de toxicidade para os compostos com perfis de interação menos favoráveis ou vice-versa. As interações observadas entre as moléculas e alguns resíduos essenciais às atividades catalíticas das enzimas são um bom indicativo do seu potencial inibitório, apontando para a necessidade de se continuar o estudo desses compostos como potenciais candidatos a novos fármacos, destacando-se as moléculas 9 e 11 por apresentaram melhor perfil de interação e ADMET em conjunto.

Palavras-chave: Estudos *in silico*. Infecções microbianas. Modelagem molecular. Planejamento de fármacos.

ABSTRACT

Bacterial and parasitic infections are a global health problem. In this context, bacteria such as *Staphylococcus aureus*, which has already develop multiple drug-resistant strains, and parasites such as *Trypanosoma brucei*, which causes sleeping sickness, whose treatment is limited and complex, are of great public importance and are responsible for diseases that require new treatments. The enzyme phosphofructokinase (PFK) catalyzes the third step of the glycolytic pathway, the main source of energy generation in different living beings, including the two species mentioned. There are differences between the PFK isoforms present in these microorganisms and the isoform present in human cells, which allows selectivity of action for a drug, making it an interesting target for carrying out studies looking for new anti-*T. brucei* and anti-*S.aureus* agents. 2,5-Anhydro-D-mannitol (2,5-AM), an analogue of β -D-fructofuranose, was modified and evaluated in different studies, generating derivatives that had an PFK inhibitory action. Considering the derivatives already described in the literature, the present work aimed to carry out an *in silico* analysis of the interaction profile of fourteen new bis-substituted 2,5-anhydro-D-mannitol derivatives with the PFK enzyme from *T. brucei* and *S.aureus* and predict the absorption, distribution, metabolism, elimination and toxicity (ADMET) profiles of these compounds. In general, the compounds studied presented a good interaction profile with the enzymes and acceptable ADMET profiles, with a tendency towards better pharmacokinetic and toxicity properties for compounds with less favorable interaction profiles and vice-versa. The interactions observed between the molecules and some residues essential to the catalytic activities of the enzymes are a good indication of their inhibitory potential, pointing to the need to continue the study of these compounds as potential candidates for new drugs, highlighting molecules 9 and 11 that presented the better interaction profile and ADMET.

Key words: *In silico* studies. Microbial infections. Molecular modeling. Drug design.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção, Toxicidade
ADP	Difosfato de Adenosina
ATP	Trifosfato de Adenosina
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina adquirido na comunidade
EMA	<i>European Medicine Agency</i>
F16BP	Frutose-1,6-bifosfato
F6P	Frutose-6-fosfato
IC₅₀	Concentração Inibitória Média
MDR	Resistência Múltipla a Fármacos
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-sensíveis
NADPH	Dinucleotídeo de Nicotinamida Adenina Reduzido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFK	Fosfofrutoquinase
PVL	Leucocidina de Panton-Valentine
SaPFK	Fosfofrutoquinase de <i>S. aureus</i>
SA-SSTI	Infecções de pele e tecidos moles causadas por <i>S. aureus</i>
TbPFK	Fosfofrutoquinase de <i>T. brucei</i> .
USFDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>

2,5-AM

2,5-anidro-D-manitol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas cristalinas do dímero e do tetrâmero de SaPfk, respectivamente.....	23
Figura 2 - Possíveis sítios farmacológicos propostos por Ayyildiz e colaboradores (2020) para a PFK das espécies <i>S. aureus</i> (A) e <i>T. brucei</i> (B).....	24
Figura 3 - Subunidades PFK de <i>T. brucei</i> (azul) e mamífero (roxo) sobrepostas.....	26
Figura 4 - Estrutura química do 2,5-Anidro-D-manitol e β -D-frutofuranose.....	28
Figura 5 - Estruturas químicas dos catorze novos derivados de 2,5-anidro-D-manitol bis-substituídos avaliados nesse trabalho.....	31
Figura 6 - Poses assumidas pelos compostos definidos como primeiro grupo, frente à enzima TbPFK.....	36
Figura 7 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo os ligantes do primeiro grupo, compostos 1 (a), 5 (b), 9 (c), 10 (d) e 11 (e) (carbonos em branco), com a enzima TbPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ATP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas em verde e a interação do tipo cátion-pi como uma linha tracejada amarela.....	37
Figura 8 - Poses assumidas pelos compostos 2, 4, 8, 12, 13 e 14 (carbonos brancos), definidos como segundo grupo, frente à enzima TbPFK (representação em fitas verdes). O ligante F6P foi modelado em seu sítio de ligação para fins de comparação e é representado em carbonos rosas.....	38
Figura 9 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo os ligantes do segundo grupo, compostos 2 (a), 4 (b), 8 (c), 12 (d), 13 (e) e 14 (f) (carbonos em branco), com a enzima TbPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ATP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como uma linha tracejada em verde.....	39

Figura 10 - Poses assumidas pelos compostos 3 e 6 (carbonos brancos), definidos como terceiro grupo, frente à enzima TbPFK (representação em fitas verdes). O ligante F6P foi modelado em seu sítio de ligação para fins de comparação e é representado em carbonos rosas.....	40
Figura 11 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo os ligantes do terceiro grupo, compostos 3 (a) e 6 (b) (carbonos em branco), com a enzima TbPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ATP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como uma linha tracejada em verde, a interação do tipo cátion-pi é mostrada como uma linha tracejada amarela e a ligação de halogênio como uma linha tracejada de cor verde-clara.....	41
Figura 12 - Pose assumida pelo composto 7 (carbonos brancos), definidos como primeiro grupo, frente à enzima TbPFK (representação em fitas verdes). O ligante F6P foi modelado em seu sítio de ligação para fins de comparação e é representado em carbonos rosa.....	42
Figura 13 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo o composto 7 (carbonos em branco) com a enzima TbPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ATP (carbonos em roxo). A interação do tipo cátion-pi é mostrada como uma linha tracejada amarela, a ligação de halogênio como uma linha tracejada de cor verde-escura e as ligações de hidrogênio como uma linha tracejada de cor verde um pouco mais clara.....	43
Figura 14 - Pose assumida pelo composto 1 (carbonos brancos) frente à enzima SaPFK (representação em fitas verdes). O ligante cristalográfico F6P aparece com os carbonos em rosa.....	45
Figura 15 - Pose assumida pelo composto 2 (carbonos brancos) frente à enzima SaPFK (representação em fitas verdes). O ligante cristalográfico F6P aparece com os carbonos em rosa.....	45
Figura 16 - Pose assumida pelo composto 3 (carbonos brancos) frente à enzima SaPFK (representação em fitas verdes). O ligante cristalográfico F6P aparece com os carbonos em rosa.	46
Figura 17 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo o composto 1 (carbonos em branco) com a enzima SaPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ANP (carbonos em roxo). A interação do tipo	

cátion-pi é mostrada como uma linha tracejada amarela, a ligação de hidrogênio como uma linha tracejada de cor verde.....47

Figura 18 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo o composto 2 (carbonos em branco) com a enzima SaPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ANP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas de cor verde.....47

Figura 19 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo o composto 3 (carbonos em branco) com a enzima SaPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ANP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas de cor verde.....48

Figura 20 - Pose assumida pelos compostos 4, 10 e 14 (carbonos brancos), pertencentes ao grupo quatro, frente à enzima SaPFK (representação em fitas verdes). O ligante cristalográfico F6P aparece com os carbonos em rosa.....48

Figura 21 - Pose assumida pelos compostos 5, 6, 8 e 13 (carbonos brancos), pertencentes ao grupo cinco, frente à enzima SaPFK (representação em fitas verdes). O ligante cristalográfico F6P aparece com os carbonos em rosa.....49

Figura 22 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo os ligantes do grupo quatro, compostos 4 (a), 10 (b) e 14 (c) (carbonos em branco), com a enzima SaPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ANP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como uma linha tracejada em verde e a interação do tipo pi-stacking como uma linha tracejada rosa.....50

Figura 23 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo os ligantes do grupo cinco, compostos 5 (a), 6 (b), 8 (c) e 13 (d) (carbonos em branco), com a enzima SaPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ANP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas em verde e a interação do tipo cátion-pi como uma linha tracejada amarela.....51

Figura 24 - Pose assumida pelos compostos 7, 9, 11 e 12 (carbonos brancos), pertencentes ao grupo seis, frente à enzima SaPFK (representação em fitas verdes). O ligante cristalográfico F6P aparece com os carbonos em rosa.....52

Figura 25 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo os ligantes do grupo cinco, compostos 7 (a), 9 (b), 11 (c) e 12 (d) (carbonos em branco), com a enzima SaPFK (carbonos em verde) e o ligante

cristalográfico ANP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas em verde e a interação do tipo cátion-pi como uma linha tracejada amarela.....53

Figura 26 - Interações encontradas da enzima TbPFK com a substância IV em estudos de *docking* molecular realizados por Lavorato e colaboradores (2012) (a) em comparação com as interações encontradas para o composto 11 (b). As ligações de hidrogênio são representadas por uma linha tracejada.....60

Figura 27 - Composto 11 (carbonos em branco) na presença dos principais resíduos envolvidos na atividade catalítica da enzima TbPFK (Carbonos em verde) e do ligante cristalográfico ATP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas em verde.....61

Figura 28 - Composto 9 (carbonos em branco) na presença dos principais resíduos envolvidos na regulação alostérica da atividade catalítica da enzima SaPFK (Carbonos em verde), do ligante cristalográfico ANP (carbonos em roxo) e da F6P (carbonos em rosa). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas em verde e a interação do tipo cátion-pi como uma linha tracejada amarela.63

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
%	Porcentagem

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura química e valores de IC ₅₀ dos principais inibidores encontrados por Claustre e colaboradores (2002).....	29
Tabela 2 – Estrutura química e valores de IC ₅₀ dos principais inibidores encontrados por Nowicki e colaboradores (2008).....	30
Tabela 3 - Resultados dos estudos de <i>docking</i> realizados para os complexos formados pelos ligantes em estudo e enzima TbPFK (PDB 3F5M) e principais interações observadas.....	35
Tabela 4 - Resultados dos estudos de <i>docking</i> realizados para os complexos formados pelos ligantes em estudo e enzima SaPFK (PDB 5XZ8) e principais interações observadas.....	44
Tabela 5 - Dados de propriedades físico-químicas e toxicológicas previstas para os 14 compostos.....	54
Tabela 6 - Dados de propriedades farmacocinéticas, <i>druglikeness</i> e relacionadas a química medicinal previstas para os 14 compostos.....	57

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1. Morbimortalidade das infecções causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> e a ameaça da resistência desse patógeno aos antibióticos e antibacterianos disponíveis.....	17
2.2. Morbimortalidade da infecção causada pelo <i>Trypanosoma brucei</i> , a doença do sono, e as problemáticas inerentes ao seu tratamento.....	19
2.3. A fosfofrutoquinase como alvo em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos anti-T. brucei e anti-S. aureus.....	22
2.4. Estratégias de análise <i>in silico</i> como aliadas na descoberta de novos fármacos.....	26
2.5. Os derivados do 2,5-anidro-D-manitol como inibidores potenciais da enzima fosfofrutoquinase.....	27
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. METODOLOGIA.....	33
4.1. Estudos de docking molecular.....	33
4.2. Estudos <i>in silico</i> de previsão de propriedades ADMET.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Estudos de Docking molecular dos compostos frente à enzima TbPFK.....	34
5.2. Estudos de Docking molecular dos compostos frente à enzima SaPFK.....	43
5.3. Estudos de previsão do perfil ADMET dos ligantes em estudo.....	53
5.4. Análise do perfil dos compostos estudados como potenciais candidatos a novos fármacos tripanocida e antibacteriano, considerando os resultados dos estudos <i>in silico</i>	58
6. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas, distúrbios causados por microrganismos patogênicos, são uma importante causa de morbimortalidade no mundo, representando um problema de saúde global (LOZANO *et al.*, 2012). Apesar dos avanços no desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos alcançados nas últimas décadas, o uso indiscriminado desses medicamentos resultou no desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos agentes infecciosos, uma situação preocupante, pois resulta na ineficácia das terapias farmacológicas (JUAN-IGNACIO, 2015).

Nesse ínterim, infecções bacterianas, especialmente as causadas por *Staphylococcus aureus*, são de grande importância, principalmente no âmbito hospitalar. Essa espécie possui cepas resistentes a múltiplos antibióticos, como meticilina, oxacilina e cefalosporinas de primeira geração, o que a torna um obstáculo no controle dessas infecções (TURNER *et al.*, 2019).

Além disso, no contexto das infecções parasitárias, a doença do sono, por exemplo, causada pelo protozoário *Trypanosoma brucei*, é uma endemia encontrada em países da África que causa transtornos à população (REY, 2008). Seu tratamento ainda é limitado, pois o arsenal de medicamentos é pequeno e estes, além de estarem associados a graves efeitos adversos, são administrados por vias que dificultam a adesão dos pacientes, o que resulta em falhas terapêuticas e pode contribuir para o aparecimento de cepas resistentes (BÜSCHER *et al.*, 2017).

Diante desse cenário, faz-se necessária a busca por novos agentes antimicrobianos e antiparasitários que combatam as doenças relacionadas.

Na procura por novos fármacos que combatam microrganismos patogênicos, as enzimas participantes da via glicolítica, principal fonte de geração de energia em diferentes seres vivos, se configuram como potenciais alvos moleculares (VITKO, SPAHICH E RICHARDISON, 2015; VERLINDE *et al.*, 2001). Nesse contexto, destaca-se a fosfofrutoquinase (PFK), que catalisa a conversão da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato por meio de uma reação irreversível e dependente de ATP (NELSON, 2019).

Essa enzima é interessante para realização de estudos por novos agentes com atividade anti-*T. brucei* e anti-*S. aureus*. Isso se deve ao fato de que a isoforma presente nas formas sanguíneas de *T. brucei* apresenta diferenças estruturais significativas quando comparada com a isoforma presente nas células mamíferas (MCNAE et al., 2021). Além disso, a PFK de *S. aureus* possui uma disposição estrutural diferente, inclusive quando comparada às PFKs de outras espécies de bactérias (TIAN et al., 2018). Tais atributos podem ser importantes no contexto do desenvolvimento de fármacos capazes de inibi-las, pois permite uma maior seletividade de ação, levando à agentes mais seletivos, e consequentemente, menos tóxicos.

O 2,5-anidro-D-manitol (2,5-AM), um análogo direto da β -D-frutofuranose, vem sendo usado como material de partida em propostas sintéticas de substâncias com possíveis propriedades antimicrobianas (HANSON et al., 1984). Em diferentes estudos, foram propostas e avaliadas diversas modificações moleculares, sendo constatado que os derivados propostos tinham uma ação inibitória de PFK (CLAUSTRE et al., 2002) (NOWICKI et al., 2008).

Considerando-se os derivados já descritos na literatura, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma análise *in silico* do perfil de interação com a enzima PFK e dos perfis de ADMET de catorze novos derivados de 2,5-anidro-D-manitol bis-substituídos, em busca de compostos com atividade e propriedades otimizadas em relação aos compostos já descritos, permitindo ainda, posteriormente, a proposição de melhorias estruturais que resultem na otimização desse perfil biológico. Os resultados obtidos podem contribuir com novas pesquisas que buscam inovações no tratamento dessas infecções.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Morbimortalidade das infecções causadas por *Staphylococcus aureus* e a ameaça da resistência desse patógeno aos antibióticos e antibacterianos disponíveis

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, considerada um dos mais importantes e comuns patógenos humanos, podendo ser classificado, quanto à resistência, em *Staphylococcus aureus* meticilina-sensíveis (MSSA) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (LEVINSON *et al.*, 2021; PROCOP *et al.*, 2018).

Apesar de colonizar naturalmente a região nasofaríngea, além de outras regiões do corpo humano, esse microrganismo é causador de uma série de doenças infecciosas, comunitárias e hospitalares, além de ser uma das causas mais comuns de pneumonia hospitalar, septicemia, infecções de feridas cirúrgicas e conjuntivite bacteriana, sendo também importante gerador de foliculite, celulite, infecções complicadas de tecidos moles e infecções da corrente sanguínea (LEVINSON *et al.*, 2021; PROCOP *et al.*, 2018).

Tong e colaboradores (2015) afirmam que nas duas últimas décadas, houve um crescimento do número de infecções por *S. aureus* associadas aos cuidados de saúde, principalmente no contexto da endocardite infecciosa, cuja a taxa de mortalidade geral foi consistentemente maior do que para outras causas da doença e variou de 22 a 66%, e das infecções de dispositivos protéticos. Ainda de acordo com os autores supracitados, pode haver uma epidemia de infecções de pele e tecidos moles associadas à comunidade causadas por certas cepas de MRSA.

Também foi destacado por Kourtis e colaboradores (2019) a ocorrência de quase 120.000 infecções da corrente sanguínea por *S. aureus*, com quase 20.000 mortes associadas, nos Estados Unidos em 2017, além do aumento veloz na taxa dessas infecções causadas por *S. aureus* sensíveis à meticilina (3,9% ao ano, no período de 2012 a 2017). Para mais, Boucher e Corey (2008) afirmam que os custos em saúde para pacientes com bacteremia na presença de dispositivos de demora, além de serem elevados, foram duas vezes maiores

entre pacientes com bacteremia por *S. aureus* adquirida no hospital, e que, em uma análise de pacientes internados nos EUA em 2003, quase 400.000 eram internações por infecções associadas ao *S. aureus*.

Nota-se que essas infecções se configuram como um importante problema de saúde pública, pois além de aumentarem substancialmente os gastos nesse setor, estão ligadas a altas taxas de morbidade e mortalidade em todo mundo.

Além disso, outro problema característico das infecções por *S. aureus* é o frequente desenvolvimento de resistência antibiótica em diferentes cepas, destacando-se as de MRSA, consideradas as mais importantes no contexto clínico (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021).

O advento da penicilina diminuiu consideravelmente o índice de mortalidade entre os pacientes infectados. No entanto, cepas resistentes começaram a ser identificadas já no início da década de 1940, e chegaram a cerca de 25% do total de cepas relacionadas ao hospital no final dessa mesma década. Apesar do desenvolvimento da meticilina e da oxacilina a fim de reagir a esse problema, cerca de um ano após sua introdução na prática clínica, surgiram as cepas MRSA, caracterizadas pela sua resistência a esses antibióticos, e se apresentando como um grave problema, principalmente no contexto hospitalar (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018).

Com o surgimento de novas cepas não relacionadas com a assistência à saúde, chamadas de MRSA adquiridas na comunidade (CA-MRSA), a partir de 1990, as taxas de infecção vêm aumentando e o tratamento se tornou cada vez mais difícil, pois novos mecanismos de resistência assomam-se constantemente, sendo amplamente disseminados entre os dois subtipos de MRSA (TURNER *et al.*, 2019).

Segundo Gajdács (2019), as diversas cepas de MRSA mostram resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, além de várias outras classes de antibióticos e antibacterianos, o que faz com que seja considerada um patógeno com resistência múltipla a fármacos (MDR) de primeira classe, além de estar incluído no grupo de bactérias "ESKAPE" (acrônimo para os nomes científicos de seis patógenos bacterianos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*), que

compreende os patógenos MDR, que são atualmente considerados como os de maior preocupação para a humanidade.

Devido a suscetibilidade de algumas cepas de MRSA, com resistência a todos os outros fármacos já citados, à vancomicina, esse antibiótico tem sido um dos medicamentos de primeira linha para tratar infecções por MRSA (GAJDÁCS, 2019). No entanto, apesar de ser um agente eficaz contra as infecções por MRSA, o uso da vancomicina também apresenta desvantagens pronunciadas relacionadas à sua via de administração e perfil de efeitos adversos. Além disso, a resistência intermediária e completa à vancomicina em alguns isolados clínicos de *S. aureus* tem sido detectada nas últimas décadas (CONG; YANG; RAO, 2019).

Conforme Turner e colaboradores (2019), essa é uma adaptação genética muito temida, em *S. aureus*, por conta da dependência desse antibiótico no tratamento de infecções por MRSA. Além disso, outros antibióticos e antibacterianos usados no tratamento também apresentam problemas, como seu elevado custo e geração de efeitos colaterais e de interações medicamentosas graves (GAJDÁCS, 2019).

Diante da importância das infecções por *S. aureus* no contexto da saúde pública e do constante surgimento de cepas resistentes, que desafiam as abordagens terapêuticas disponíveis, urge a necessidade da busca por novos compostos com ação antibacteriana capazes de controlá-las.

2.2. Morbimortalidade da infecção causada pelo *Trypanosoma brucei*, a doença do sono, e as problemáticas inerentes ao seu tratamento

A tripanossomíase humana africana, uma doença tropical negligenciada conhecida como doença do sono, é causada pelo parasita *Trypanosoma brucei*, uma espécie de protozoário flagelado da família Trypanosomatidae, transmitido por moscas tsé tsé, que apresenta duas subespécies, sendo primeira subespécie, *T. b. gambiense*, que causa a doença do sono na África Ocidental e a segunda, *T. b. rhodesiense*, que causa de uma forma aguda e mais grave da mesma doença na África Oriental (REY, 2008).

A doença passa por dois estágios. No primeiro, os parasitos são

encontrados no sangue e no sistema linfático, e o segundo, que sucede o primeiro, ocorre após os parasitos invadirem o sistema nervoso central (REY, 2008).

A apresentação clínica varia conforme a subespécie de *T. brucei*, a resposta do hospedeiro e o estágio da doença, sendo que ambos podem levar à morte se não houver tratamento. Alguns sintomas comuns no primeiro estágio são febre intermitente, dor de cabeça, prurido, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, edema e disfunção endócrina, enquanto que os distúrbios neurológicos, incluindo distúrbios do sono, são típicos da doença de segundo estágio (BÜSCHER et al., 2017).

Conforme Kennedy (2012), na época em que as principais descobertas sobre a doença estavam sendo feitas (1896-1906), ela causou a morte de centenas de milhares de pessoas nas regiões afetadas, e posteriormente, nos anos de 1998, 2006 e 2009, o número de casos foi de, respectivamente, 300.000; 50.000 a 70.000; e menos de 10.000, além dos casos documentados na Europa e nos EUA em viajantes regressando da África Ocidental.

Embora as epidemias de doença do sono tenham sido um problema significativo de saúde pública no passado, no contexto atual, os números indicam que ela está à beira da erradicação (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022).

Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde, 2023), a doença do sono da África Ocidental, causada por *T. b. gambiense*, responsável pela maioria dos casos notificados de doença do sono em 2022, teve uma queda de 97% no número de novos casos notificados no período de 1999 a 2022. Já a doença do sono da África Oriental, causada por *T. b. rhodesiense*, durante o mesmo período, teve uma queda de 94% no número de novos casos da forma aguda notificados. No entanto, é preciso ter cautela quanto a esses dados, pois desde a sua descrição, no início do século XX, a epidemiologia desse agravo é caracterizada por períodos em que a incidência é reduzida, seguidos por períodos de ressurgimento da doença, ou seja, ainda há uma ameaça de epidemias, afora o problema da subnotificação nas áreas rurais, que deve ser levado em conta (TIBERTI; SANCHEZ, 2018).

O tratamento ainda é complicado e exige a hospitalização para essa finalidade, por conta do perfil de toxicidade e da via de administração dos

medicamentos tripanocidas atualmente disponíveis, o que pode comprometer a adesão do paciente, resultando em falhas terapêuticas e possibilitando o desenvolvimento de resistência parasitária (KENNEDY, 2012).

As opções são bastante limitadas e os fármacos rotineiramente usados são pentamidina e suramina, para tratar a doença de primeiro estágio, e melarsoprol, eflornitina em combinação com nifurtimox, e o mais recente, fexinidazol, para a doença de segundo estágio (REY, 2008; IMRAN, 2022).

Conforme Büscher e colaboradores (2017), complicações potenciais do tratamento de primeiro estágio são, no caso da pentamidina, hipoglicemia, hipotensão, dor abdominal e problemas gastrointestinais e, no caso da suramina, pirexia, nefrotoxicidade, neuropatia periférica, agranulocitose e trombocitopenia. Já no tratamento de segunda etapa, a eflornitina, um medicamento citostático, tem como principais eventos adversos os mais comuns dessa classe, como febre, prurido, hipertensão, náusea, vômitos, diarreia, dor abdominal, cefaleias e mielossupressão.

Ainda segundo os autores, o melarsoprol, restrito ao tratamento da doença causada por *T. b. rhodesiense* em segundo estágio, é associado à uma alta incidência de eventos adversos graves e com risco de vida, pois causa uma síndrome encefalopática que ocorre em 5 a 18% de todos os casos tratados e é fatal em 10 a 70% dos pacientes afetados. Para o tratamento de primeira linha para a doença causada por *T. b. gambiense* em segundo estágio usa-se uma terapia combinada nifurtimox-eflornitina, que se mostrou eficaz e mais segura que as monoterapias com eflornitina ou melarsoprol (BÜSCHER et al., 2017).

Outra opção de tratamento mais recente é o fexinidazol, que foi aprovado pela European Medicine Agency (EMA) e pela United States Food and Drug Administration (USFDA) como a primeira terapia totalmente oral para tratar a doença nos dois estágios. O tratamento é feito exclusivamente por via oral, o que é uma vantagem, e os dados disponíveis mostram que sua eficácia e perfil de efeitos colaterais é semelhante à combinação nifurtimox-eflornitina (IMRAN, 2022).

Uma questão preocupante em relação à terapia é o surgimento da resistência aos fármacos disponíveis. Tiberti e Sanchez (2018) afirmam que a taxa de falha do tratamento após a administração de melarsoprol foi quantificada em até 30%. O desenvolvimento de resistência seria preocupante, pois poderia

contribuir para o ressurgimento de novas epidemias.

Diante desse cenário, em que as opções de tratamento são escassas, indisponíveis por via oral, associadas à toxicidade e passíveis de que os parasitos desenvolvam resistência aos fármacos disponíveis, o desenvolvimento de novos agentes tripanocidas seguros para tratar a doença do sono é uma prioridade, a fim de mantê-la sob controle.

2.3 A fosfofrutoquinase como alvo em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos anti-*T. brucei* e anti-*S. aureus*

A glicose é essencial para o metabolismo de diversas plantas, animais e microrganismos, e precisa ser quebrada em uma série de reações, catalisadas por diversas enzimas, que constituem a via glicolítica, onde parte da energia livre é conservada na forma de trifosfato de adenosina (ATP) e dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido (NADPH). Essa é uma via central e quase universal do catabolismo da glicose, que está presente em quase todas as células vivas e é essencial para a sobrevivência dos organismos biológicos (NELSON, 2019).

Segundo Mcnae e colaboradores (2021), em sua forma sanguínea, o parasita *T. brucei* depende exclusivamente da glicólise como fonte de ATP, sendo que uma diminuição de 50% no fluxo glicolítico já foi suficiente para matar o parasita *in vitro*. Além disso, Vitko e colaboradores (2015) concluíram que a glicólise é essencial para os mecanismos de resistência de *S. aureus* aos efeitos da resposta imune do hospedeiro, além de ser crucial para sua multiplicação. Considerando o nível de importância que essas reações têm para esses microrganismos, a inibição de enzimas participantes dessa via pode ser considerada como uma estratégia terapêutica no combate à Tripanossomíase humana africana e às infecções estafilocócicas.

Nesse sentido, a fosfofrutoquinase (PFK), enzima dependente de ATP que catalisa a terceira etapa da glicólise, ou seja, a fosforilação da frutose 6-fosfato (F6P) em frutose 1,6-bifosfato (F16BP) através da conversão de ATP em difosfato de adenosina (ADP), vem sendo estudada (AYYILDIZ et al., 2020;

MCNAE *et al.*, 2021; NELSON, 2019).

Ela é uma das enzimas-chave limitantes da taxa glicolítica e, portanto, reguladora crucial dessa reação que é tão importante na sobrevivência de diversos microrganismos (ZUO, TANG & LU, 2021). Por conta disso, se configura como possível alvo molecular para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos.

As fosfofrutoquinases de *T. brucei* (TbPFK) e de *S. aureus* (SaPFK) já foram amplamente estudadas e suas características particulares as colocam como possíveis alvos a serem explorados na terapia da doença do sono e das infecções causadas por *Staphylococcus aureus* (AYYILDIZ *et al.*, 2020; MCNAE *et al.*, 2021; TIAN *et al.*, 2018).

Nos estudos de Tian e colaboradores (2018), foi elucidado que a PFK de *Staphylococcus aureus* possui um mecanismo de regulação alostérica diferente, mesmo quando comparada a outras PFKs bacterianas. Ela existe como um tetrâmero ativo e como um dímero inativo (**Figura 1**), sendo que o equilíbrio tetrâmero-dímero pode ser regulado por múltiplos efetores, e por F6P, que desencadeia e estabiliza a formação do tetrâmero, de forma que a enzima assume a forma tetramérica ativa apenas após a sua ligação. Nesse sentido, a atividade da enzima, que depende da interconversão entre essas duas formas, pode ser regulada por diferentes substratos e efetores alostéricos.

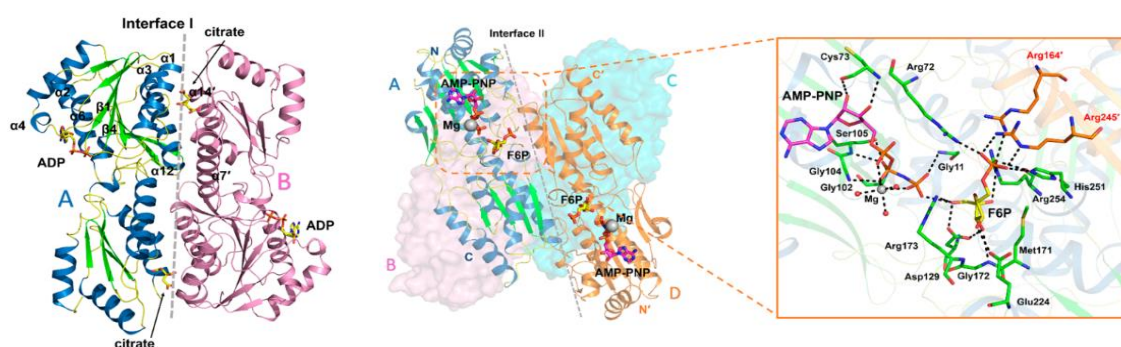


Figura 1- Estruturas cristalinas do dímero (a) e do tetrâmero (b) de SaPFK, respectivamente (extraído de TIAN e colaboradores (2018)).

Ainda de acordo com os autores supracitados, essa relevância do substrato F6P na formação do tetrâmero de SaPFK, se dá porque ele orienta dois dímeros da enzima próximos o suficiente, permitindo assim a formação da

interface dímero-dímero para estabilizar o tetrâmero. Além disso, o mecanismo molecular associado à essa conversão inclui a flexibilidade do motivo GL, permitindo uma mudança conformacional na hélice $\alpha 7$, mediando assim a montagem ou desmontagem do tetrâmero SaPFK, após a ligação de F6P (TIAN et al., 2018).

Ayyildiz e colaboradores (2020) buscaram identificar sítios alostéricos alternativos em enzimas glicolíticas, dentre elas a PFK, que possam ser usados como alvos moleculares na criação de inibidores mais específicos. Os autores investigaram os sítios alostéricos propostos com base na sequência e semelhança estrutural entre a enzima bacteriana SaPFK, a parasitária TbPFK e sua correspondente humana (Figura 2).

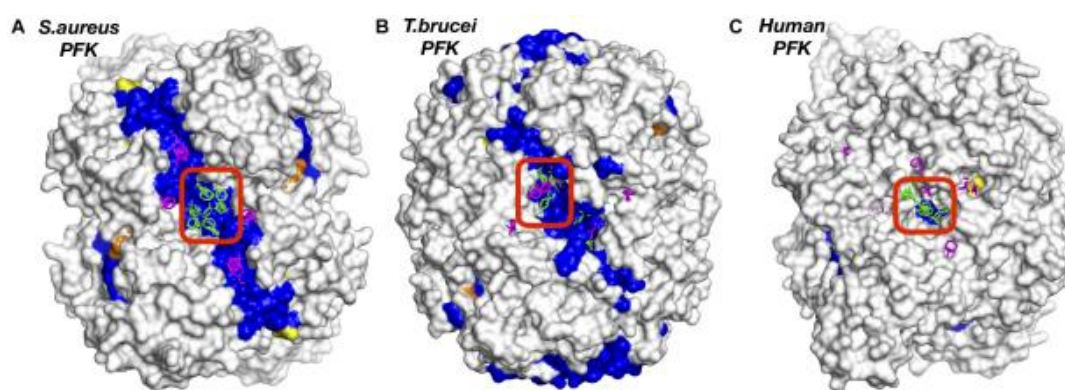


Figura 2- Possíveis sítios farmacológicos propostos para a PFK das espécies *S. aureus* (A) e *T. brucei* (B). As regiões de interface entre subunidades estão indicadas na cor azul e as regiões dos sítios alostéricos e catalíticos relacionados foram destacadas em amarelo e laranja, respectivamente (extraído de AYYILDIZ e colaboradores (2020)).

Os autores constataram que SaPFK apresenta possíveis sítios alostéricos localizados nas regiões de interface que podem ser usadas para o desenvolvimento de novos fármacos, pois a ligação nessas regiões provoca a alteração da dinâmica global da proteína impedindo o movimento de grandes subunidades dinâmicas necessárias para formar o sítio ativo. Devido à ausência de qualquer interface na área correspondente na PFK humana, na sua forma de dímero, inativo, há uma vantagem ao projetar inibidores de SaPFK seletivos.

Ademais, mesmo considerando a forma tetramérica ativa da PFK humana, que equivale a dois tetrâmeros bacterianos, essas regiões de interface podem ser uma região ideal para ser usada como alvo, já que a mesma região na forma humana ativa não acomodaria favoravelmente nenhuma substância ou, caso aconteça, a dinâmica global da enzima não seria afetada por sua ligação tanto quanto sua correspondente bacteriana, além de haver um baixo grau de conservação estrutural, ou de sequência dessa região proposta entre a SaPFK e sua equivalente humana (AYYILDIZ *et al.*, 2020).

No caso da fosfofrutoquinase de *T. brucei*, o conhecimento de que ela está localizada em organelas relacionadas ao peroxissomo chamadas glicossomos e possui baixa identidade de sequência com as isoformas humanas, apesar de compartilhar sítios ativos muito semelhantes, corrobora a sua escolha como um possível alvo (LAVORATO *et al.*, 2012; MCNAE *et al.*, 2009).

Além disso, alguns dos seus aspectos evolutivos podem ser explorados. Apesar da especificidade da *TbPFK* para ATP como doador de fosfato, enzima pertence à família Pirofosfato (PPi)-dependente por comparações de sequência. Essa característica pode estar relacionada com sua evolução, que aparentemente envolveu uma mudança do doador de fosfato de ATP para PPi, e de volta para ATP novamente fazendo com que seja diferente, em alguns aspectos, quando comparada com outras enzimas ATP-dependentes, podendo ser ativada alostericamente por AMP, mas não por efetores estruturalmente semelhantes que modulam a atividade de PFKs ATP-dependentes em outros organismos, além não ter nenhum inibidor alostérico conhecido, em contraste com a maioria das PFKs dependentes de ATP (MCNAE *et al.*, 2021).

Outrossim, sua atividade é regulada por mecanismos diferente do de outras PFKs, inclusive da de humanos, por conta das diferentes organizações das vias glicolíticas, que acarretam em diferentes disponibilidades do substrato ou de produtos do processo, e de forma geral, pode ser considerada uma junção de PFKs dependentes de PPi e dependentes de ATP, sendo, portanto, única entre os PFKs dependentes de ATP (MCNAE *et al.*, 2009).

Estruturalmente, também possui diferenças, pois contém uma estrutura de braço de alcance (**Figura 3**) que não foi visto em outras PFKs (LAVORATO *et al.*, 2012; MCNAE *et al.*, 2009).

Ademais, nos estudos de Ayyildiz e colaboradores (2020), foi encontrada uma área entre os sítios de ATP e F6P na *Tb*PFK que poderia ser proposta como possível sítio alostérico, pois além de ser uma região de interface, o que possibilitaria perturbar a dinâmica global da proteína, o local exibe um nível significativamente baixo de conservação de sequência entre as isoformas humana e do parasito.

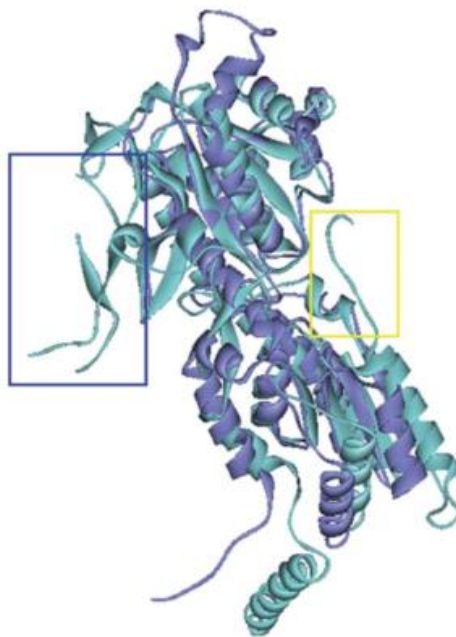


Figura 3: Subunidades da PFK de *T. brucei* (ciano) e da PFK mamífera (roxo) sobrepostas. Destaca-se a extensão N-terminal da PFK de mamíferos (quadrado azul) e o loop 329-348, exclusivo para tripanosomatídeos (quadrado amarelo) (extraído de LAVORATO *et al.*, 2012).

Nota-se que a fosfofrutoquinase tem potencial para ser explorada na pesquisa por novos fármacos tripanocidas e anti-estafilococos que sejam mais eficazes, pois essas enzimas são essenciais para sobrevivência dos microrganismos e seria possível alcançar toxicidade seletiva, pois as particularidades citadas podem permitir a inibição das isoformas bacteriana e parasitária sem afetar de maneira significativa a isoforma humana.

2.4 Estratégias de análise *in silico* como aliadas na descoberta de novos fármacos

Os métodos *in silico* vêm ganhando cada vez mais destaque no âmbito científico, especialmente como ferramenta de auxílio no desenvolvimento de novos fármacos. Essas metodologias são de grande valia, pois possibilitam a redução do tempo e dos custos implicados no projeto. Isso se deve ao fato de que, em função do poder de preditividade e confiabilidade dos métodos computacionais, o número de moléculas que precisam de fato ser sintetizadas e testadas experimentalmente é drasticamente reduzido (FERREIRA, 2017).

Tendo em vista a importância assumida pela interação entre ligantes e proteínas alvo na fisiopatologia das doenças, o conhecimento acerca de como essa interação se dá é essencial para o planejamento racional de fármacos. Nesse sentido, a técnica computacional denominada atracamento molecular (*molecular docking*, em inglês), que visa prever, detalhadamente, a forma de ligação e o reconhecimento molecular, se destaca cada vez mais no âmbito das pesquisas associadas à saúde e à biotecnologia (GUEDES, MAGALHÃES & DARDENNE, 2014).

Além disso, a elucidação do perfil de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET) por meio das análises computacionais pode ser de grande utilidade no processo, haja vista que propriedades farmacêuticas pobres, bem como problemas de toxicidade são considerados os principais motivos para encerrar o processo de desenvolvimento para candidatos a fármacos (ALQAHTANI, 2017). Assim, pode-se inferir que a previsão *in silico* das propriedades ADMET de compostos representa uma etapa fundamental no desenvolvimento e descoberta de fármacos

É notável a importância dessas metodologias, e o fato de que as análises *in silico* se constituem como um passo essencial no desenvolvimento de novos medicamentos, permitindo a otimização de tempo e recursos gastos no projeto, sendo, portanto, ferramentas ideais a serem aplicadas na busca por novos inibidores de PFK.

2.5 Os derivados do 2,5-anidro-D-manitol como inibidores potenciais da enzima fosfofrutoquinase

Na busca por novos fármacos antimicrobianos, o 2,5-anidro-D-manitol (2,5-AM), um análogo de β -D-frutofuranose (**Figura 4**) cuja estrutura é bloqueada na forma cíclica, vem sendo explorado, pois há relatos na literatura da capacidade inibitória de derivados desse composto, frente à enzima fosfofrutoquinase (CUNHA, 2008).

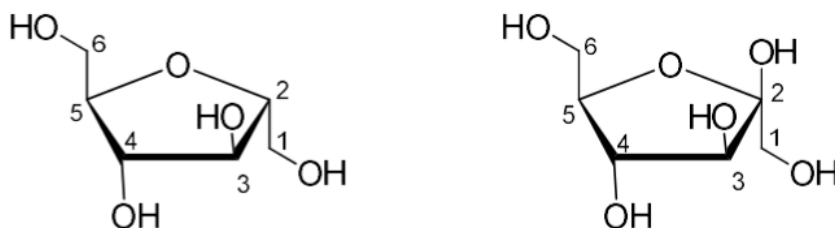


Figura 4: Estruturas químicas do 2,5-AM e da β -D-frutofuranose, respectivamente (CUNHA, 2008).

Riquelme e colaboradores (1983) trazem algumas semelhanças estruturais que possibilitam a utilização do 2,5-AM como ponto de partida na síntese de inibidores da PFK. Segundo os autores, o composto é simétrico, e seu produto monofosfatado pode ser tido como um análogo de frutose-1-fosfato e de frutose-6-fosfato, sendo, portanto, um substrato para a fosfofrutoquinase, gerando como produto o 2,5-AM-bisfosfato, que pode ser considerado um análogo de β -D-frutose 1,6-bisfosfato. Também, há relatos da capacidade do 2,5-AM em inibir a glicólise e a gliconeogênese no sangue de alguns animais testados (HANSON et al., 1984).

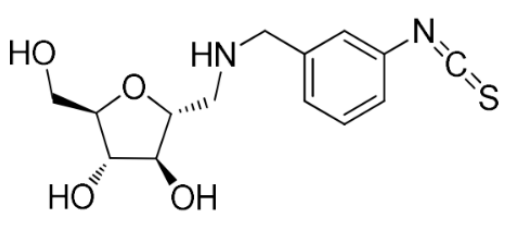
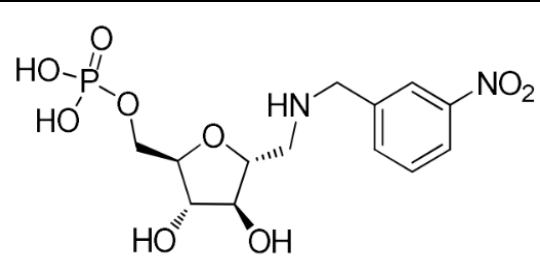
Diante disso, Claustre e colaboradores (2002) projetaram uma série de inibidores a partir da estrutura do 2,5-anidro-D-manitol. Os inibidores foram desenhados com a estratégia de explorar o sítio ativo da enzima com compostos semelhantes ao substrato (F6P) e determinar o tipo de inibidor que poderia ser proposto, além de explorar a possibilidade de ligação covalente entre um desses inibidores e a proteína. Os compostos foram testados quanto ao seu potencial de inibição frente à *Tb*PFK. A estrutura básica foi variada pela ligação de um anel aromático, diversamente substituído, à furanose, fosforilada ou não na

posição 6, através de um átomo de nitrogênio, o qual está ligado por meio da posição 1, e pela substituição na posição meta do anel aromático, que foi escolhida para explorar uma área maior do sítio ativo da enzima pela rotação do anel. Os derivados propostos demonstraram capacidade de inibição, competitiva ou não, da enzima.

Foi constatado que para todos os compostos (fosforilados ou não) nos quais uma contribuição hidrofóbica foi introduzida através de um anel aromático, foi observado um efeito inibitório, o que indicou que esse anel era essencial para a atividade inibitória da enzima. Além disso, as afinidades mais altas foram encontradas para compostos que carregam uma carga negativa ou um grupo retirador de elétrons no anel. (CLAUSTRE *et al.*, 2002).

Na **Tabela 1**, são apresentadas as estruturas e valores de concentração inibitória média (IC_{50}) dos dois principais inibidores encontrados por Claustre e colaboradores (2002).

Tabela 1 - Estruturas químicas e valores de IC_{50} dos principais inibidores encontrados por Claustre e colaboradores (2002)

Estrutura Química	IC_{50}
 I	0,5 mM
 II	0,45 mM

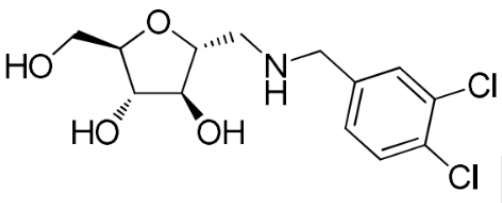
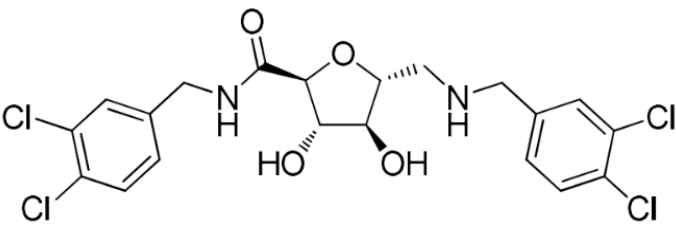
Nowicki e colaboradores (2008) continuaram trabalhando com o desenho, síntese e o teste biológico de novos inibidores e obtiveram resultados promissores. O ponto de partida para o desenho dessas novas substâncias teve como base o núcleo 1-amino-2,5-anidro-1-desoxi-D-manitol *N*-substituído. Na

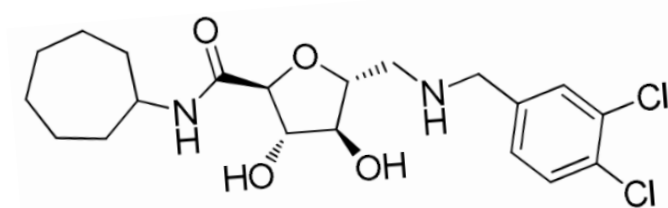
síntese de uma ampla gama de compostos, duas séries foram trabalhadas, sendo que, na série I, a principal modificação explorada foram as diferentes substituições no anel aromático, enquanto que na série II se observou o efeito da funcionalização da posição 6, por meio de oxidação seletiva, seguida de acoplamento de amida.

Os ensaios enzimáticos evidenciaram que os compostos oxidados na posição 6 tiveram maior atividade, o que pode indicar que a presença de um grupo amida nessa posição é importante para a ação inibitória. Com relação aos diferentes sistemas aromáticos avaliados, aqueles que levaram a compostos com maior potencial de inibição eram formados por grupos naftila ou diclorossustituídos. Ademais, os resultados da triagem *in vitro* mostram que todos os inibidores testados mostram alguma forma de atividade contra o parasita cultivado, embora os inibidores da série II sejam bem mais potentes que os da série I (NOWICKI *et al.*, 2008).

A estrutura dos compostos com maior capacidade de inibição, e seus valores de IC₅₀ encontrados pelos autores são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Estruturas químicas e valores de IC₅₀ dos principais inibidores encontrados por Nowicki e colaboradores (2008).

Estrutura Química	IC ₅₀
 III	0,041 mM
 IV	0,023 mM



0,080 mM

V

Ao se considerar as contribuições de ambos os trabalhos, ou seja, a conexão do sistema aromático em C-1 sendo benéfica para a atividade e a presença de um grupo amida em C-6 sendo importante para a atividade das substâncias avaliadas, e ainda, que a conexão do sistema aromático em C-1 sendo realizada por um grupo amino de forma benéfica também para a atividade, a troca do grupo amida por um grupo amino em C-6 poderia levar à manutenção de atividade, mas com a vantagem de se permitir que derivados 1,6-bis-substituídos pudessem ser obtidos, facilitando o acesso sintético.

Diante disso, catorze novos derivados de 2,5-anidro-D-manitol bis-substituídos, sendo sete deles do tipo diaminas e sete do tipo diamidas (**Figura 5**) com substituintes inéditos nas posições C-1 e C-6, aqui propostos foram analisados *in silico* a fim de avaliar o impacto dos novos sistemas aromáticos propostos e o efeito de se manter conectores do tipo amino ou amida em ambas as posições de substituição.

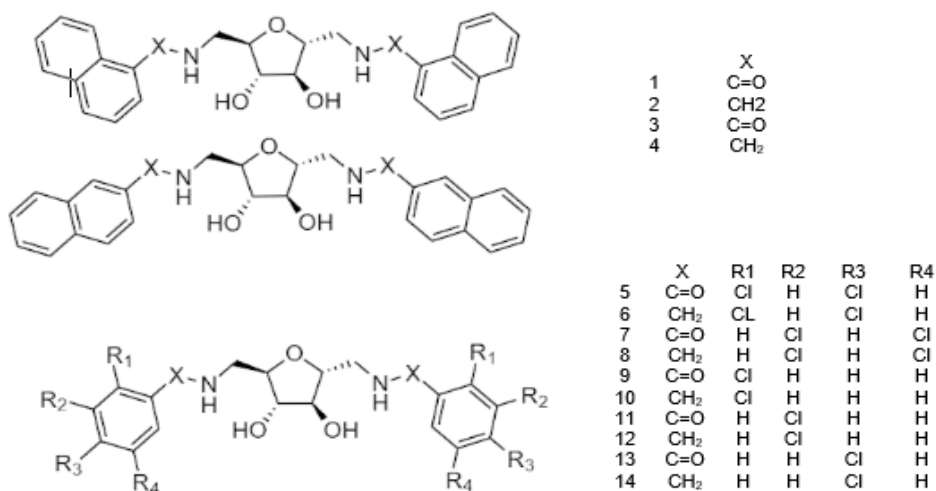


Figura 5 - Estruturas químicas dos catorze novos derivados de 2,5-anidro-D-manitol bis-substituídos avaliados nesse trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar, por meio de estudos *in silico*, a capacidade de inibição de novos derivados do 2,5-anidro-D-manitol, frente às enzimas fosfofrutoquinases de *Staphylococcus aureus* e *Trypanosoma brucei*, bem como suas propriedades ADMET, de forma a avaliar o perfil desses compostos como potenciais candidatos a fármacos tripanocida e antibacteriano.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar simulações de *docking* molecular de derivados planejados do 2,5-anidro-D-manitol em estruturas cristalográficas da enzima PFK de *S. aureus* e *T. brucei*;
- Estabelecer aspectos estruturais que impactam nas energias dos modelos de interação ligante-macromolécula obtidos;
- Realizar avaliações *in silico* das propriedades ADMET dos compostos planejados;
- Propor alterações estruturais que melhorem as propriedades ADMET e a interação dos compostos planejados.

4 METODOLOGIA

4.1 Estudos de *docking* molecular

A estratégia de *docking* molecular foi usada para a análise *in silico* da interação dos compostos com os modelos tridimensionais de PFK. Os desenhos e otimizações dos ligantes em estudo foram feitos utilizando o programa BIOVIA Discovery Studio 2020 (<https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio/>). Para otimização da geometria destes compostos, o campo de força tipo Dreiding foi utilizado. Os arquivos contendo a estrutura tridimensional das enzimas foram extraídos do banco de dados Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>).

A adição de cargas Gasteiger e tipo atômico AD4 para o preparo das macromoléculas, bem como a definição de aspectos torcionais para o preparo dos ligantes foi feito no programa AutoDockTools 1.5.7 (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>), permitindo assim a obtenção dos respectivos arquivos PDBQT referentes às estruturas citadas. Os estudos de docking foram realizados utilizando o programa AutoDock Vina 1.1.1 (<http://vina.scripps.edu/>). As análises dos resultados foram realizadas, levando em conta apenas as conformações dos ligantes que geraram os complexos de menor energia, e por meio do programa BIOVIA Discovery Studio 2020.

4.2. Estudos *in silico* de previsão de propriedades ADMET

A previsão dos perfis de toxicidade e drugability das diamidas e diaminas planejadas foi realizada utilizando o software Osiris Property Explorer (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>). Demais parâmetros preditivos de perfis de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação dos compostos em estudo foram determinados utilizando o servidor web SwissADME.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos de *docking* molecular dos compostos frente à enzima TbPFK

Os resultados obtidos para os estudos de *docking* molecular de cada um dos compostos frente à TbPFK, em termos de energia de ligação foram compilados na **Tabela 3**.

As conformações de cada composto que geraram os complexos enzima-ligante de mais baixa energia foram selecionadas para análise e subdivididas em grupos, de acordo com as semelhanças nas posições assumidas no sítio ativo da enzima, a fim de se avaliar melhor os aspectos das interações. Nesse sentido, para a PFK do *T. brucei*, foram divididas em quatro grupos.

O primeiro grupo foi formado pelas conformações referentes aos compostos 1, 5, 9, 10 e 11 (**Figura 6**).

Nota-se que nesse primeiro grupo os compostos tendem a se posicionar de forma estendida e na mesma região, porém os anéis ficam em posições diferentes quando comparados ao anel da F6P. Analisando a **Tabela 3**, constata-se que esses compostos são os que interagem mais fortemente com a enzima, pois seus valores de energia de ligação são os mais baixos, ou seja, eles formam complexos mais estáveis com o alvo. Com base nisso, pode-se inferir que essa conformação mais aberta e nessa posição pode ser a forma preferida de interação para a classe. Além disso, com exceção do composto 10, todas moléculas deste grupo são amidas e apresentaram uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio carbonílico e o resíduo de Arg383. Já o composto 10, uma amina, que não apresenta essa interação, possui a energia de ligação mais elevada entre esse grupo. Essa tendência foi observada inclusive nas moléculas dos demais grupos, o que pode indicar que a presença do oxigênio carbonílico das amidas permite essa ligação em específico, que por sua vez parece ser importante para estabilizar o complexo com o alvo.

Tabela 3 - Resultados dos estudos de *docking* realizados para os complexos formados pelos ligantes em estudo e enzima TbPFK (PDB 3F5M) e principais interações observadas

Composto	Energia de ligação (Kcal/mol)	Tipos de interação com a enzima TbPFK
1	-9,5	C=O:ARG383; C=O:ATP; C=O':LEU346 (LH*) THR227, ILE228, GLU325, LYS270, ASP348, GLY107, LYS344, ASN343 (VdW**)
2	-7,2	OH':ATP; NH:GLU325; HN:LEU346 (LH) ASP348, LYS344, ASP339, GLY107, ARG274, LYS270, ARG383, MET272, SER379, TYR380 (VdW)
3	-7,7	HO:ATP; C=O:ARG274 (LH) ASP348, LYS270, GLU325, GLY107, TYR380, ARG173, LEU346 (VdW)
4	-7,4	NH: GLU325; OH:ATP; OH':ATP (LH) ASP348, ASN343, ARG274, ARG383, MET272 , LYS270, SER379 (VdW)
5	-8,3	C=O:ARG383; OH:ASP339 (LH) Ar:LYS270 (Cátion-pi) ILE349, GLY350, GLN329, ILE347, ASP348, LYS345, GLU325, ASN343, THR227, ASP231, ASP229, ILE228 (VdW)
6	-6,8	Ar:LYS270 (Cátion-pi) Cl:ASP348 (Ligação de halogênio) ILE349, GLN329, ILE347, SER379, MET272, ARG274, GLU325, TYR380, ARG173, ASP339 (VdW)
7	-8,0	C=O: ILE108; C=O: ARG383; C=O': SER379; C=O': LYS270; CO: TYR380 (LH) Ar:LYS270 (Cátion-pi) Cl:GLU325 (Ligação de halogênio) ALA384, GLY107, ARG173, GLN329, ILE349, ILE347, ASP348, MET272 (VdW)
8	-6,5	NH: GLU325; OH: ATP; OH': ATP (LH) LYS270, ARG383, MET272, ARG274, GLY107, ASP339, ASN343, LYS344 (VdW)
9	-8,4	C=O: ARG383; C=O':LEU346; OH:ATP; OH:ASP339 (LH) ASP231, THR227, ASN343, ASP348, LYS270, GLU325 (VdW)
10	-7,6	CO: ARG274; CO': ARG173; (LH) ASP231, GLY107, ASN343, ARG383,THR227, LYS345, GLU325, LYS270, ASP348 (VdW)
11	-8,5	C=O: ARG383; C=O: ATP; CO: ARG173; CO: ATP; C=O': LEU346 (LH) GLY107, ILE228, THR227, ASP231, ASP275, ASP339, ASN343, GLU325, LYS345, ILE347, ILE349 (VdW)
12	-6,4	NH: GLU325; OH: ASP339; CO: ARG173; CO: ASN343 (LH) LYS344, ARG274, LYS270, ARG383, MET272, GLY107 (VdW)
13	-6,4	NH: GLU325; OH: ATP; CO: ARG173; CO: ATP (LH) LYS344, ASN343, ASP339, LYS270, ARG274, ARG383, MET272, TYR380 (VdW)
14	-6,4	HO:ATP; OH':ATP; NH:GLU325 (LH) LYS270, ARG274, LYS344, MET272, ARG383, ASN343, ASP339, ASP348 (VdW)

* LH: Ligação de hidrogênio; ** VdW: interação de Van der Waals.

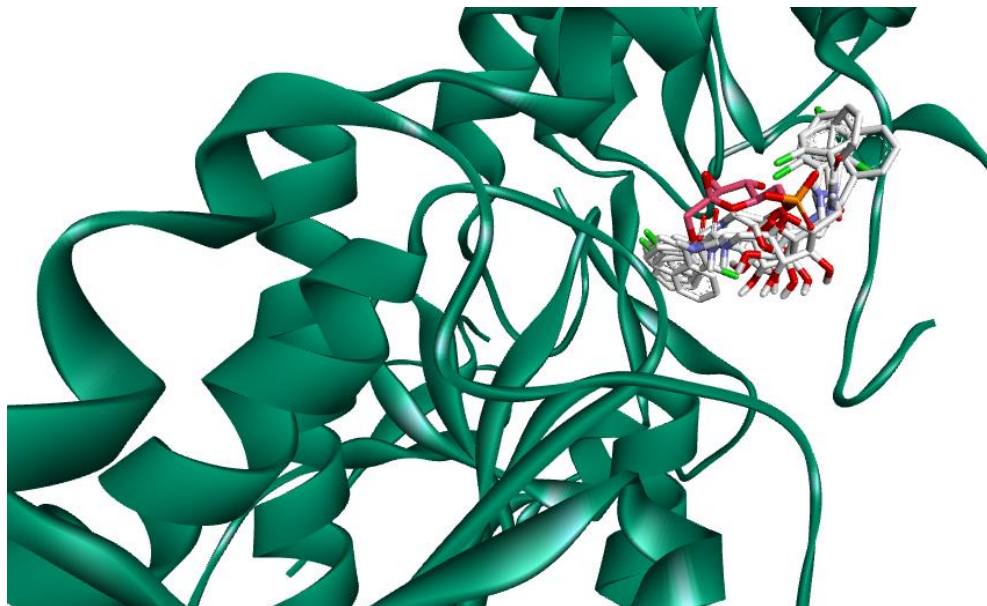


Figura 6 - Poses assumidas pelos compostos 1, 5, 9, 10 e 11 (carbonos brancos), definidos como primeiro grupo, frente à enzima TbPFK (representação em fitas verdes). O ligante F6P foi modelado em seu sítio de ligação para fins de comparação e é representado em carbonos rosas.

Na **Figura 7** são apresentadas as principais interações previstas para as conformações mais estáveis desse primeiro grupo.

O complexo enzima-ligante mais estável dentre os analisados teve o composto 1 como ligante, o que é notável pela sua baixa energia de ligação (- 9,5 kcal/mol). Suas principais interações (**Figura 7a**) compreendem ligações de hidrogênio envolvendo os dois oxigênios carbonílicos, em que um deles interage com Leu346 e o outro com Arg383. Já o complexo menos estável é formado pelo composto 10, que apresentou o maior valor de energia de ligação (- 7,6 kcal/mol). Na **Figura 7d** são apresentadas suas principais interações, que incluem ligações de hidrogênio entre os oxigênios das duas hidroxilas da furanose, um interagindo com Arg173 e o outro com Arg274. A demais, outra característica marcante desse grupo de moléculas é a interação de quase todas, excetuando-se o composto 5, com o grupo fosfato do ATP, por meio das hidroxilas da furanose. No entanto, essa ligação não tem uma contribuição tão grande na estabilização dos complexos, considerando que não há grandes variações de energia entre os complexos envolvendo compostos que se ligam e que não se ligam ao ligante cristalográfico.

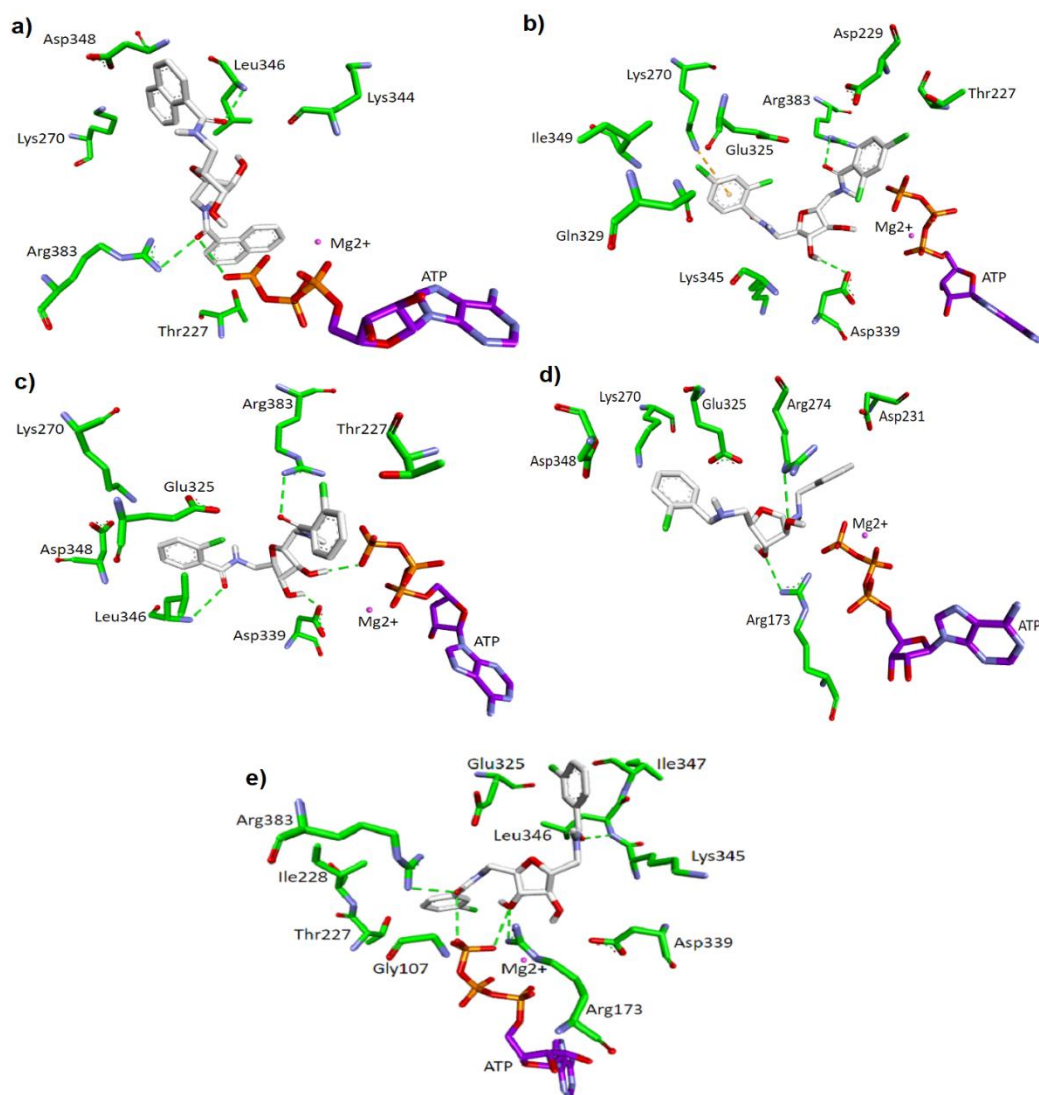


Figura 7 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo os ligantes do primeiro grupo, compostos 1 (a), 5 (b), 9 (c), 10 (d) e 11 (e) (carbonos em branco), com a enzima TbPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ATP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas em verde e a interação do tipo cátion-pi como uma linha tracejada amarela.

O segundo grupo é formado pelas conformações referentes aos compostos 2, 4, 8, 12, 13 e 14 (**Figura 8**).

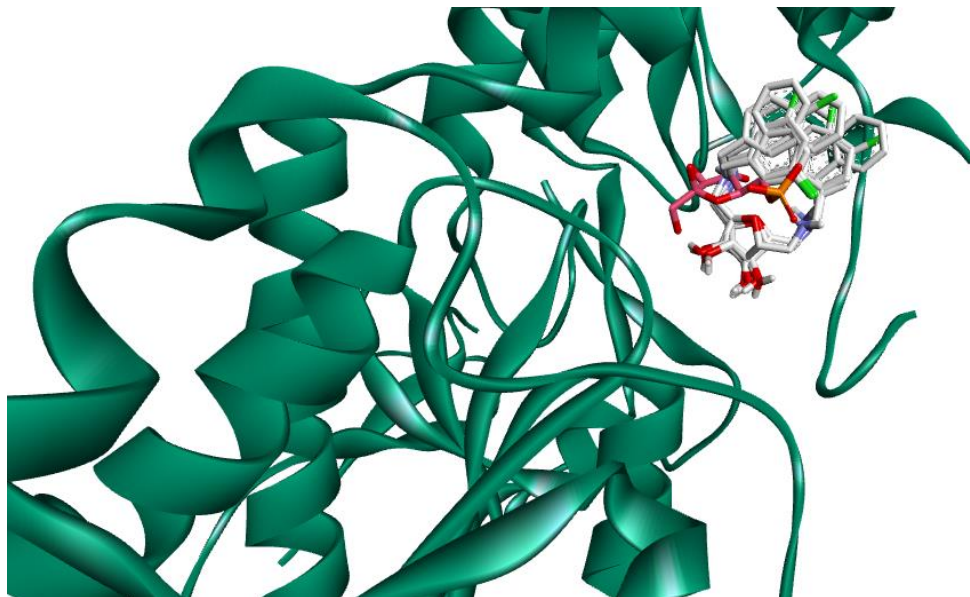


Figura 8 - Poses assumidas pelos compostos 2, 4, 8, 12, 13 e 14 (carbonos brancos), definidos como segundo grupo, frente à enzima TbPFK (representação em fitas verdes). O ligante F6P foi modelado em seu sítio de ligação para fins de comparação e é representado em carbonos rosas.

Nesse caso, as moléculas se posicionaram na mesma região do primeiro grupo, só que agora estão em uma conformação mais fechada, com os dois anéis mais próximos diferindo, novamente, em relação à posição do anel da F6P. Para esse grupo, os valores de energia de ligação são um pouco maiores, ou seja, os complexos formados entre essas moléculas e a enzima são menos estáveis que o do grupo anterior.

Dessa vez, a maioria dos compostos que compõem o grupo são aminas, exceto por 12. As moléculas 2 e 4, que tiveram uma força de interação maior que as demais, têm um sistema naftila em vez de clorofenila, o que parece otimizar essa interação. Além disso, dois pontos em comum de interação observados para todos desse grupo são as ligações de hidrogênio entre o grupo NH da cadeia lateral e o resíduo de Glu325 e entre as hidroxilas dos carbonos C2 e C3 da furanose com o ATP. Dessa forma, essas interações parecem ser muito importantes para esse grupo. As principais interações previstas para cada molécula desse grupo estão destacadas na **Figura 9**.

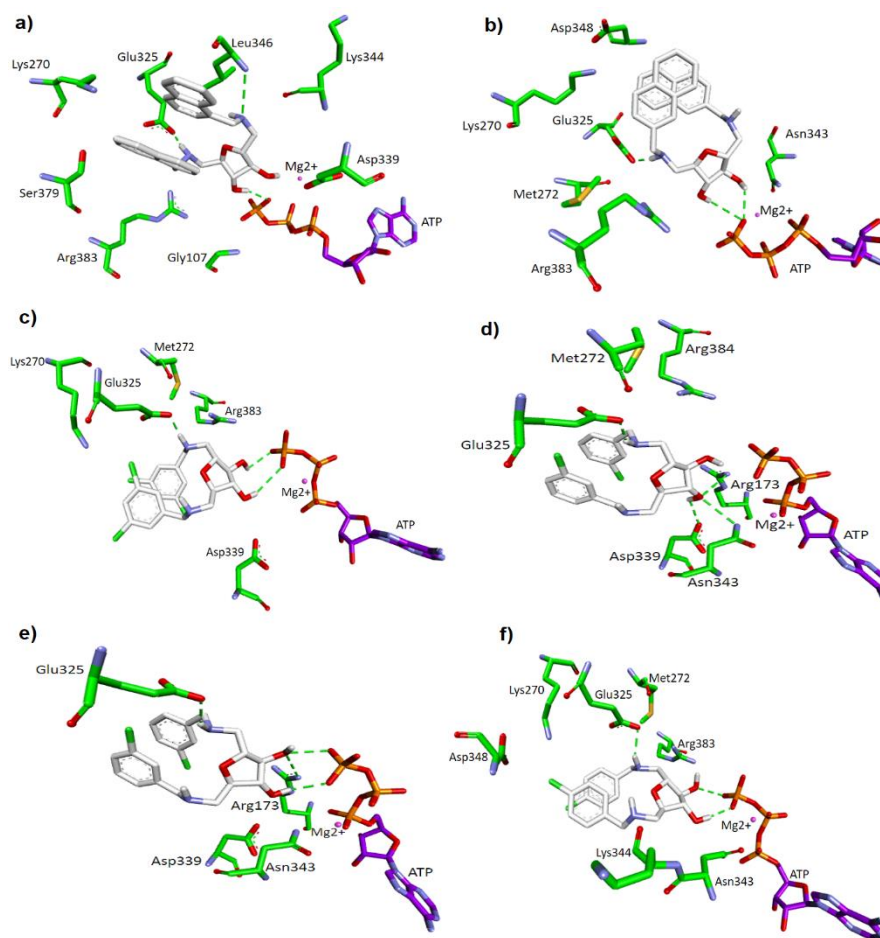


Figura 9 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo os ligantes do segundo grupo, compostos 2 (**a**), 4 (**b**), 8 (**c**), 12 (**d**), 13 (**e**) e 14 (**f**) (carbonos em branco), com a enzima TbPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ATP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como uma linha tracejada em verde.

Dessas moléculas, a que formou o complexo mais estável com a enzima foi a 4, pois sua energia de ligação foi a menor dentre todas (-7,4 kcal/mol). Esse composto interage principalmente por meio de três ligações de hidrogênio, envolvendo as duas hidroxilas da furanose interagindo com o ATP e o nitrogênio do grupo amino da cadeia lateral interagindo com o resíduo de Glu325 (**Figura 8b**). Já os compostos formadores dos complexos menos estáveis, com a mesma energia de ligação (-6,4 kcal/mol) são o 12, o 13 e o 14. As interações dessas moléculas são bem parecidas (**Figura 9d, 9e e 9f**, respectivamente), com exceção de 12 que difere um pouco das demais. Observa-se para os compostos 13 e 14 duas ligações de hidrogênio entre as hidroxilas da furanose e grupo

fosfato do ATP. Além disso, eles interagem por meio de ligação de hidrogênio com o resíduo de Glu325, enquanto que para o composto 13 há uma interação extra com o resíduo de Arg173. Quanto às ligações do composto 12, também envolvem ligações de hidrogênio, mas dessa vez as hidroxilas interagem com Arg173, Asn343 e Asp339. Também há a interação entre o grupo NH da cadeia lateral e o resíduo de Glu325.

O terceiro grupo é formado pelas moléculas 3 e 6 (**Figura 10**).

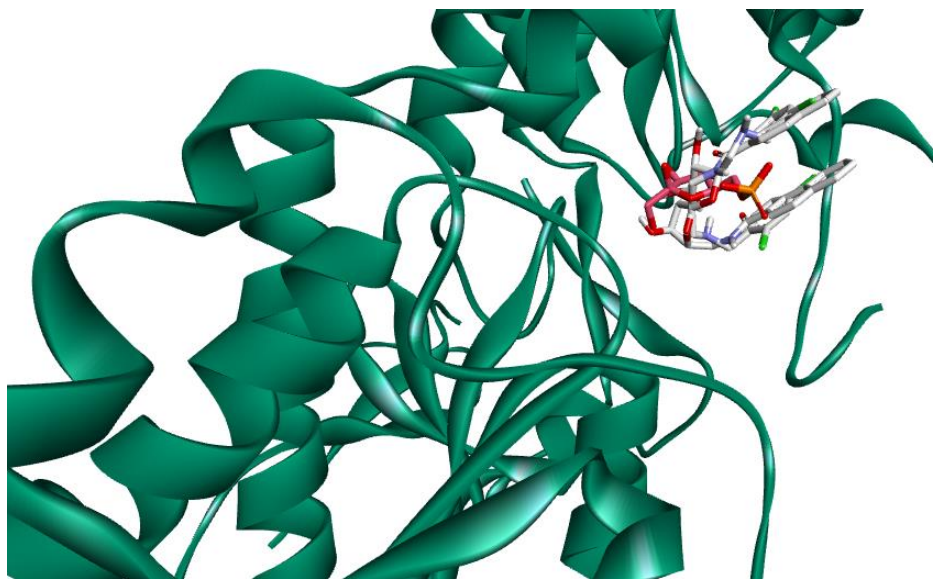


Figura 10 - Poses assumidas pelos compostos 3 e 6 (carbonos brancos), definidos como terceiro grupo, frente à enzima TbPFK (representação em fitas verdes). O ligante F6P foi modelado em seu sítio de ligação para fins de comparação e é representado em carbonos rosas.

Para as duas moléculas do terceiro grupo as posições das cadeias laterais foram um pouco diferentes, porém os anéis furanosídicos das duas ficaram em posições bem semelhantes em relação ao anel da F6P. Apesar das semelhanças na pose assumida, as duas diferem quanto aos tipos de interações e aos valores de energia de ligação, sendo que a molécula 3 (uma amida) forma um complexo mais estável (-7,7 kcal/mol) do que o da amina 6 (-6,8 kcal/mol), seguindo também a tendência observada de melhores interações para amidas que para aminas. As principais interações previstas nos estudos para as duas moléculas desse grupo estão destacadas na **Figura 11**.

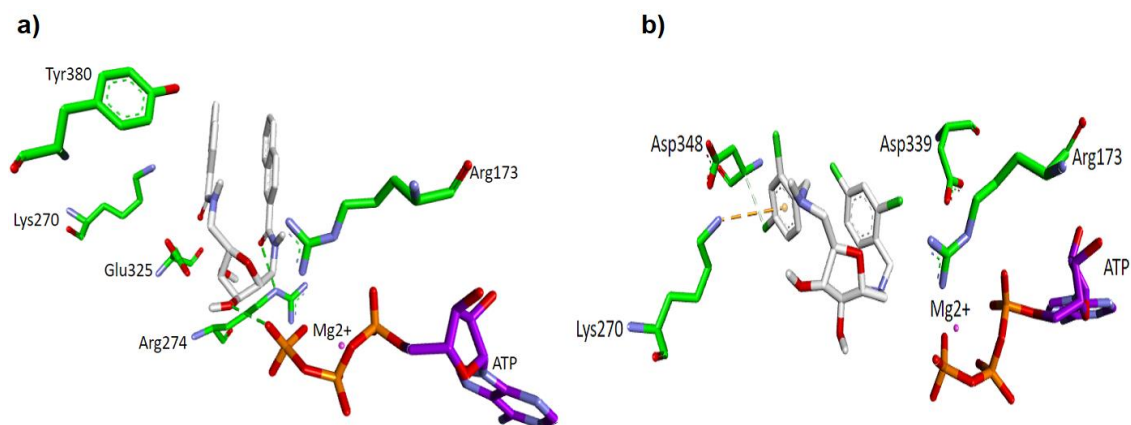


Figura 11 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo os ligantes do terceiro grupo, compostos 3 **(a)** e 6 **(b)** (carbonos em branco), com a enzima TbPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ATP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como uma linha tracejada em verde, a interação do tipo cátion-pi é mostrada como uma linha tracejada amarela e a ligação de halogênio como uma linha tracejada de cor verde-clara.

Nota-se, para o composto 3, a possibilidade de ligações de hidrogênio entre o oxigênio da furanose e o ATP e entre o oxigênio carbonílico e o resíduo de Arg274 (**Figura 11a**). Já para o composto 6, nota-se uma interação do tipo cátion-pi entre o anel aromático e um resíduo de Lys270 e uma ligação de halogênio entre um dos átomos de cloro do anel aromático e o resíduo de Asp348 (**Figura 11b**).

A melhor conformação encontrada para a molécula 7, por ser diferente de todas as demais, foi considerada separadamente (**Figura 12**).

Esse composto se posicionou em conformação bem estendida no sítio ativo da enzima e sua furanose ficou posicionada de forma semelhante ao anel da F6P. É interessante notar que a ligação de halogênio envolvendo o anel clorado acontece nessa molécula também. O anel assume a mesma posição que a observada na conformação do composto 6, porém as interações envolvem dois resíduos de aminoácidos diferentes, Asp348 no caso do composto 6 e Glu325 no caso do 7. Apesar de serem diferentes, nota-se que são aminoácidos ácidos. Outra interação em comum para essas duas moléculas é do tipo cátion-pi, que ocorre entre o anel aromático e o resíduo de Lys270. Entretanto, ambas

possuem energias de ligação bem discrepantes, sendo que para a molécula 7 o valor é bem menor, ou seja, a interação é melhor. Isso pode acontecer por conta das cinco ligações de hidrogênio observadas com essa molécula que não são observadas para a molécula 6, a qual por sua vez faz mais interações de Van der Waals, consideradas interações mais fracas. Além disso, a interação com o resíduo de arginina já comentada anteriormente também foi observada para 7, que, além disso, também é uma amida, enquanto 6 é uma amina.

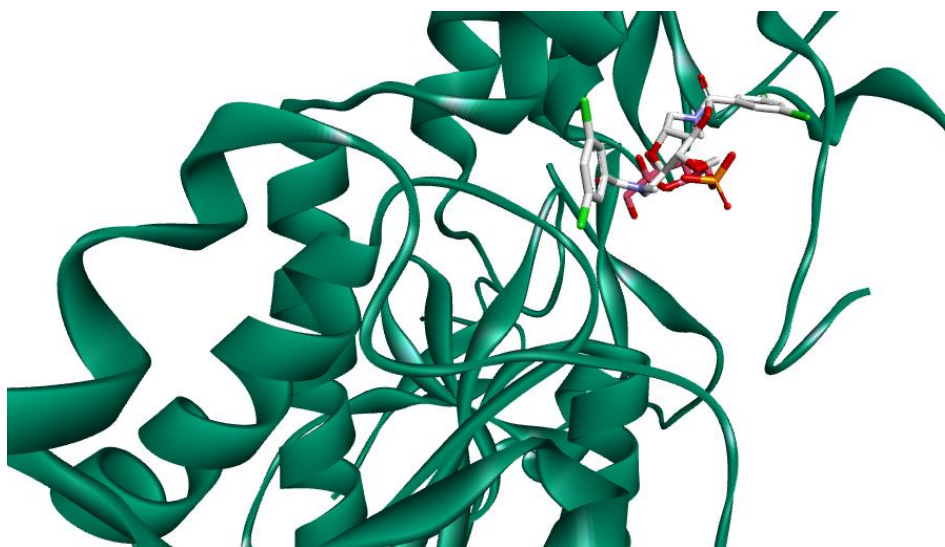


Figura 12 - Pose assumida pelo composto 7 (carbonos brancos), definidos como primeiro grupo, frente à enzima TbPFK (representação em fitas verdes). O ligante F6P foi modelado em seu sítio de ligação para fins de comparação e é representado em carbonos rosas.

As cinco ligações de hidrogênio entre 7 e TbPFK mencionadas estão descritas na **Figura 13**, e envolvem os dois oxigênios carbonílicos, de forma que um deles interage com Lys270 e Ser379 e o outro com Arg383 e Ile108. Além disso, um dos oxigênios de uma das hidroxilas da furanose interage com um resíduo de Tyr380. Essas interações parecem ter um papel fundamental na estabilização do complexo.

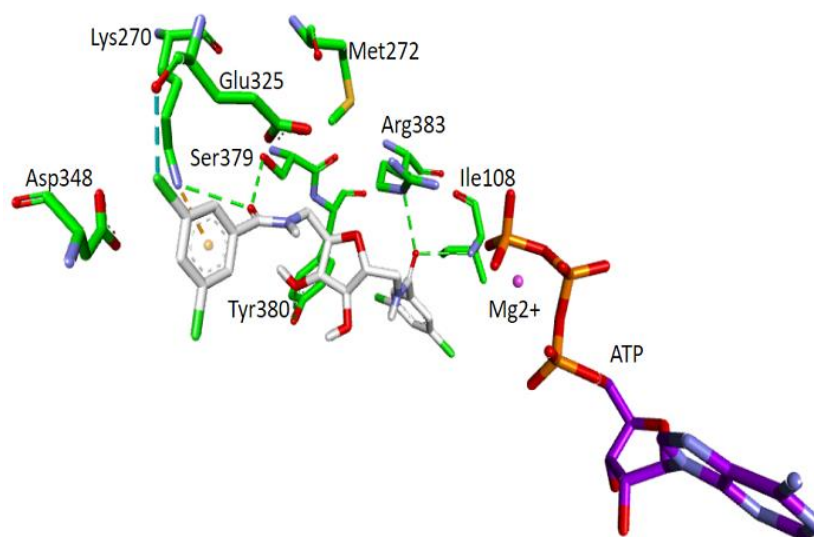


Figura 13 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo o composto 7 (carbonos em branco) com a enzima TbPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ATP (carbonos em roxo). A interação do tipo cátion-pi é mostrada como uma linha tracejada amarela, a ligação de halogênio como uma linha tracejada de cor verde-escura e as ligações de hidrogênio como uma linha tracejada de cor verde um pouco mais clara.

5.2 Estudos de *docking* molecular dos compostos frente à enzima SaPFK

Os resultados obtidos para os estudos de *docking* molecular de cada um dos compostos frente à SaPFK, em termos de energia de ligação foram compilados na **Tabela 4**.

De maneira geral, os complexos formados entre as moléculas em estudo e a enzima SaPFK foram bem menos estáveis que os observados envolvendo a TbPFK, o que é demonstrado pelos valores de energia de ligação mais elevados. Isso pode ocorrer por diversas causas, mas um fato destacável é a diferença na conformação do sítio ativo das enzimas, uma vez que a estrutura cristalina de SaPFK usada no estudo estava complexada ao ligante (F6P), diferentemente da estrutura de TbPFK, que precisou ser alinhada. Nesse sentido, a presença do ligante pode ter induzido uma mudança de conformação da enzima, que por sua vez interferiu na interação dos compostos.

Tabela 4 - Resultados dos estudos de *docking* realizados para os complexos formados pelos ligantes em estudo e enzima SaPFK (PDB 5XZ8) e principais interações observadas

Composto	Energia de ligação (Kcal/mol)	Tipos de interação com a enzima SaPFK
1	-6,5	C=O:ARG173 (LH*) Ar:ARG173 (Cátion-pi) ASP129, GLY172, GLY225, THR228, ARG254, HIS251 (VdW**)
2	-4,5	NH:GLU224; HO':ARG72 (LH) GLY11, MET171, GLY172, GLY225 (VdW)
3	-5,6	NH:GLU224; C=O: ARG173; C=O: ARG254 (LH) THR228, GLY225, MET171, ARG72, HIS251 (VdW)
4	-6,0	C=O: SER70 (LH) Ar: HIS251 (Pi-stacking) GLY255, GLY65, THR66, TYR69, GLY11, GLY10, ALA71, ARG72 (VdW)
5	-6,4	NH: GLU224; C=O: ARG173; C=O: ARG72 (LH) Ar: ARG254 (Cátion-pi) GLY225, ASP174, HIS251, GLY10, MET171, GLY11 (VdW)
6	-5,8	NH: GLU224; HO: ARG72 (LH) Ar: ARG254(Cátion-pi) MET171, GLY225, ASP174, HIS251, GLY11, GLY10 (VdW)
7	-6,1	C=O: ASP12; C=O: ARG254; C=O: ARG72 (LH) Ar: ARG173 (Cátion-pi) TYR69, THR66, SER70, GLY11, GLY10, GLU224, ASP129, HIS251 (VdW)
8	-5,9	HN: ARG254 (LH) Ar: ARG254 (Cátion-pi) GLY225, THR228, ASP174, HIS251, MET171, GLY11, ALA71, GLY10, SER70, ASP12 (VdW)
9	-6,6	OH: HIS251; C=O: ARG72; C=O: ARG254; C=O: ASP12 (LH) Ar: ARG173 (Cátion-pi) ASP129, GLY172, GLY11, GLY10, SER70, THR66, TYR69 (VdW)
10	-4,6	OH: SER70 (LH) GLY65, THR66, TYR69, ARG72, ALA71, GLY11, HIS251 (VdW)
11	-6,5	C=O:ASP12; C=O: ARG72; C=O': ARG72; NH: HIS251 (LH) Ar: ARG173 (Cátion-pi) THR66, TYR69, SER70, GLY10, GLY11, ASP129, GLY172, GLU224 (VdW)
12	-5,7	C=O: ARG72 (LH) Ar: ARG173 (Cátion-pi) THR66, TYR69, SER70, GLY11, ASP129, GLY172, GLU224, HIS251 (VdW)
13	-6,2	NH: GLU224; C=O: ARG72 (LH) Ar: ARG254 (Cátion-pi) GLY225, ASP174, MET171, HIS251, GLY11, GLY10 (VdW)
14	-5,3	OH: GLY10 (LH) GLY255, HIS251, ARG72, GLY11, ALA71, SER70, TYR69, THR66, GLY65 (VdW)

* LH: Ligação de hidrogênio; ** VdW: interação de Van der Waals.

Para a análise das interações com a enzima de *S. aureus*, o processo de agrupar as conformações de menor energia assumidas por cada composto, de

acordo com suas semelhanças, também foi parecido. Dessa forma, resultaram seis grupos.

O primeiro, segundo e terceiro grupos são formados pelas conformações referentes aos compostos 1 (**Figura 14**), 2 (**Figura 15**) e 3 (**Figura 16**), respectivamente.

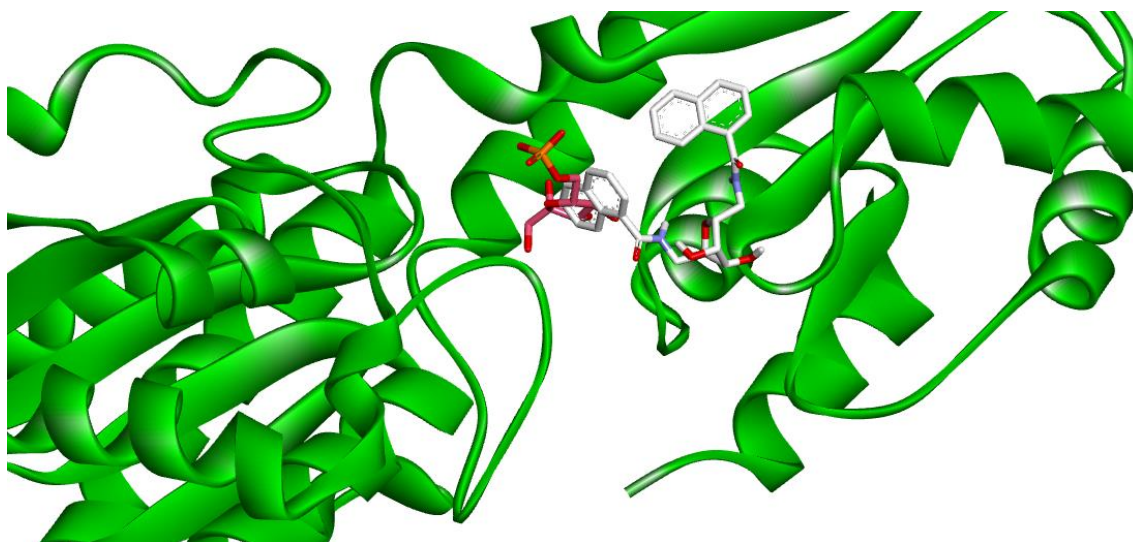


Figura 14 - Pose assumida pelo composto 1 (carbonos brancos) frente à enzima SaPFK (representação em fitas verdes). O ligante cristalográfico F6P aparece com os carbonos em rosa.

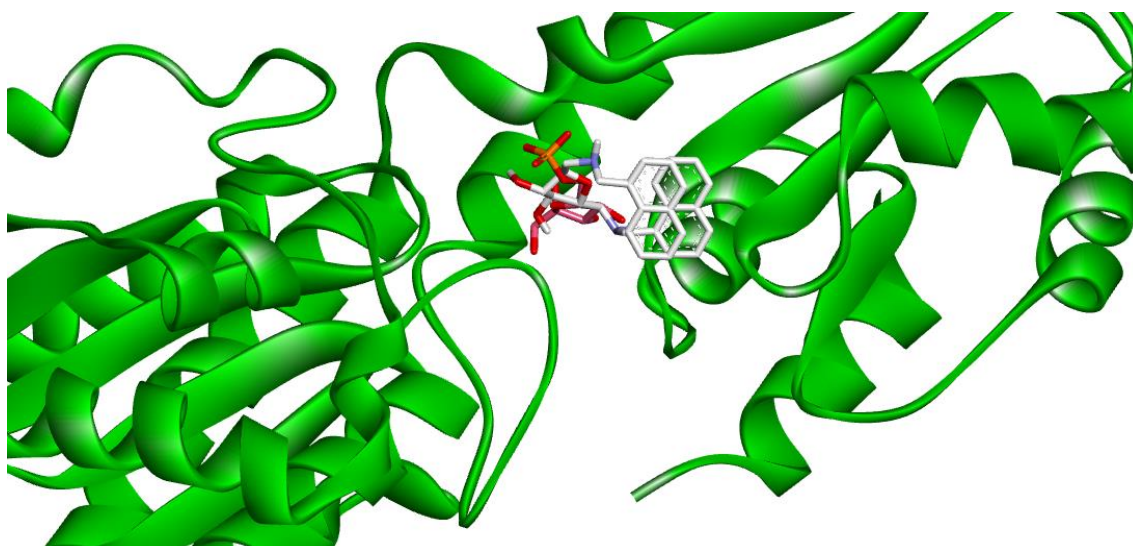


Figura 15 - Pose assumida pelo composto 2 (carbonos brancos) frente à enzima SaPFK (representação em fitas verdes). O ligante cristalográfico F6P aparece com os carbonos em rosa.



Figura 16 - Pose assumida pelo composto 3 (carbonos brancos) frente à enzima SaPFK (representação em fitas verdes). O ligante cristalográfico F6P aparece com os carbonos em rosa.

Essas conformações são um pouco parecidas mas variam principalmente em relação a posição do anel aromático, além de também terem energias de ligação mais altas e bem discrepantes entre si.

Acerca das interações, o composto 1 forma o complexo de mais baixa energia de ligação (-6,5 kcal/mol), ou seja, o mais estável dentre os três. Suas principais interações envolvem uma ligação do tipo cátion-pi entre um dos anéis do grupo naftila e o resíduo de Arg173, que também faz uma ligação de hidrogênio com um dos oxigênios do grupo carbonila (**Figura 17**).

O composto 2 forma o complexo de mais alta energia de interação (-4,5 kcal/mol) dentre os três e dentre todos os outros compostos, o que indica menor estabilidade. Ele interage, principalmente, por meio de uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio de uma das hidroxilas da furanose e o resíduo de Arg72 (**Figura 18**).

Já o composto 3 apresentou uma energia de ligação intermediária entre 1 e 2 (-5,6 kcal/mol) e participa de ligações de hidrogênio com o resíduo de Arg254, por meio do oxigênio de uma das hidroxilas da furanose, com o resíduo de Arg173, por meio de um dos oxigênios carbonílicos, e com o resíduo de Glu224, por meio do grupo amino da cadeia lateral (**Figura 19**).

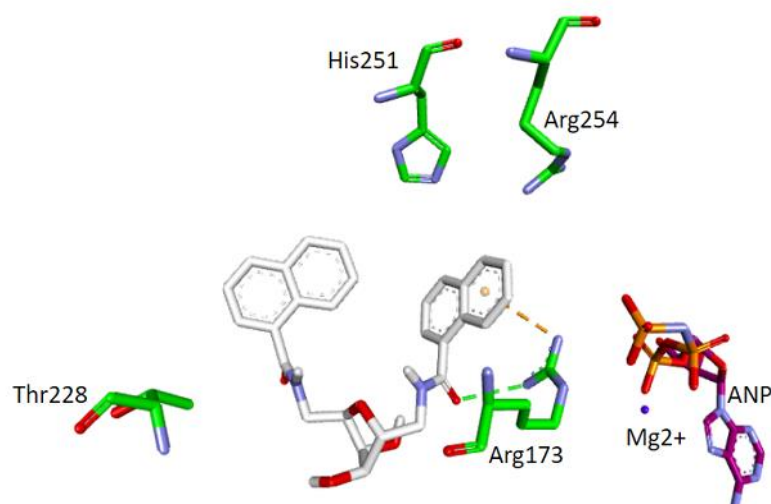


Figura 17 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo o composto 1 (carbonos em branco) com a enzima SaPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ANP (carbonos em roxo). A interação do tipo cátion-pi é mostrada como uma linha tracejada amarela, a ligação de hidrogênio como uma linha tracejada de cor verde.

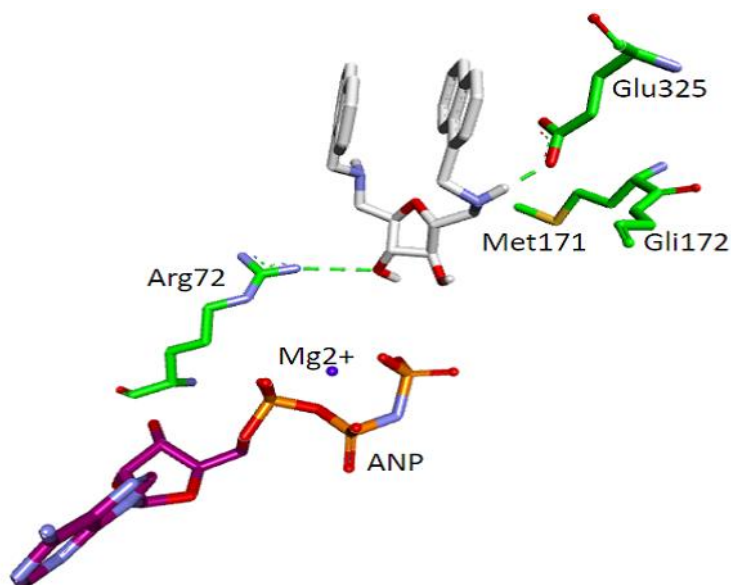


Figura 18 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo o composto 2 (carbonos em branco) com a enzima SaPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ANP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas de cor verde.

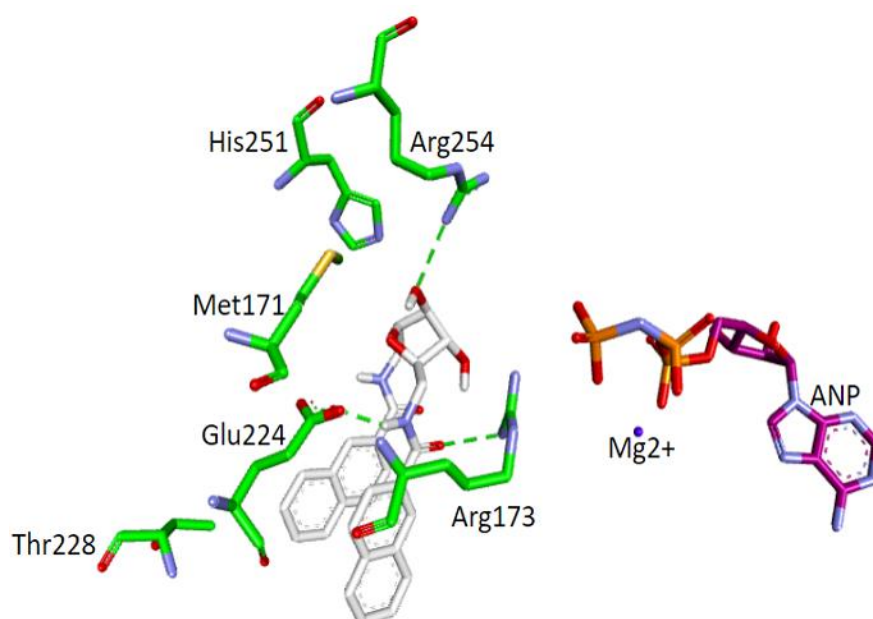


Figura 19 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo o composto 3 (carbonos em branco) com a enzima SaPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ANP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas de cor verde.

Com relação aos grupos quatro, formado pelos compostos 4, 10 e 14 (**Figura 20**), e cinco, formado pelos compostos 5, 6, 8 e 13 (**Figura 21**), nota-se que as posições ocupadas no sítio ativo são bem diferentes.

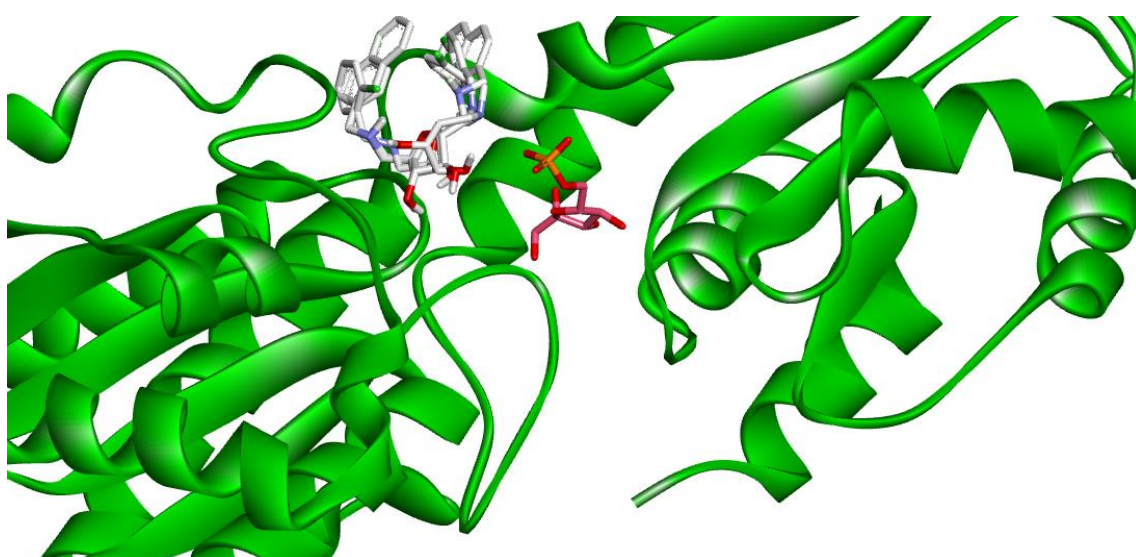


Figura 20 - Pose assumida pelos compostos 4, 10 e 14 (carbonos brancos), pertencentes ao grupo quatro, frente à enzima SaPFK (representação em fitas verdes). O ligante cristalográfico F6P aparece com os carbonos em rosa.

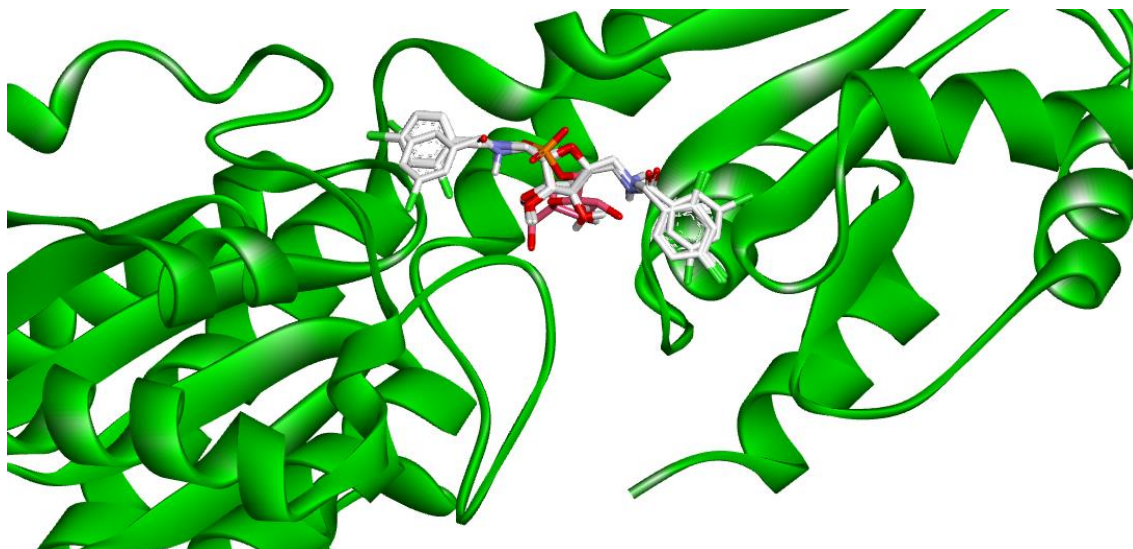


Figura 21 - Pose assumida pelos compostos 5, 6, 8 e 13 (carbonos brancos), pertencentes ao grupo cinco, frente à enzima SaPFK (representação em fitas verdes). O ligante cristalográfico F6P aparece com os carbonos em rosa.

As energias de ligação para as moléculas do grupo quatro são bem divergentes, e novamente os valores observados são altos. Pela posição ocupada no sítio ativo, afastadas da F6P, é possível que elas estejam interagindo em algum sítio alostérico, além de estarem nessa posição fechada com os anéis bem próximos um do outro. Já no grupo cinco, as moléculas apresentam energias de ligação um pouco mais baixas e uma conformação estendida com os anéis interagindo tanto com um bolso extra, quanto com a região ocupada pela F6P. Novamente, o posicionamento mais aberto da molécula parece favorecer a interação, em relação a pose mais fechada. Na **Figura 22**, estão descritas as principais interações para as moléculas do grupo quatro e na **Figura 23** as do grupo cinco.

Tratando do grupo quatro, o composto que melhor interage com a enzima é o 4, que forma o complexo de mais baixa energia (-6,0 kcal/mol). Nota-se que ele faz duas interações, uma delas do tipo pi-stacking envolvendo o anel do grupo naftila e o anel aromático do His251 e a outra entre o oxigênio de uma das hidroxilas da furanose e o resíduo de Thr70 (**Figura 22a**). Já o composto 10 formou o complexo com maior energia dentre os três (-4,6 kcal/mol), sendo o menos estável. Observa-se uma ligação de hidrogênio, em que o oxigênio de uma das hidroxilas da furanose age como doador de uma ligação de hidrogênio, sendo que o resíduo de Gly10 é oceptor (**Figura 22b**).

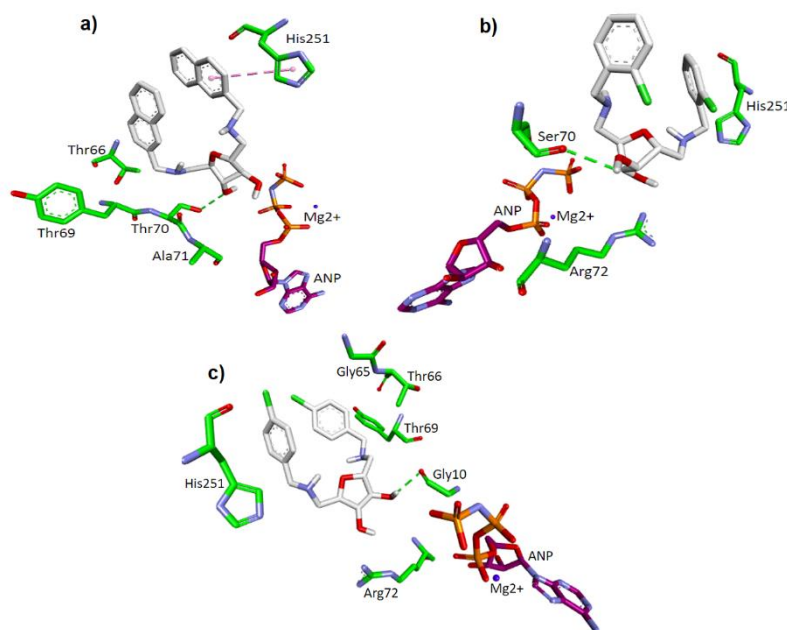


Figura 22 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo os ligantes do grupo quatro, compostos 4 **(a)**, 10 **(b)** e 14 **(c)** (carbonos em branco), com a enzima SaPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ANP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como uma linha tracejada em verde e a interação do tipo pi-stacking como uma linha tracejada rosa.

No caso do grupo cinco, o composto de melhor interação foi o 5 (-6,4 kcal/mol), que interage com o alvo por meio de uma interação cátion-pi entre o anel clorofenila e o resíduo de Arg254 e de ligações de hidrogênio entre um grupo amino da cadeia lateral e o resíduo de Glu224; entre o oxigênio da carbonila e o resíduo de Arg72 e entre o grupo hidroxila da furanose e o resíduo de Arg173 (**Figura 23a**). O complexo menos estável foi formado pelo composto 6 (-5,8 kcal/mol), que interage com a enzima por interações do tipo cátion-pi entre o anel aromático e o resíduo de Arg254 e ligações de hidrogênio entre o oxigênio da hidroxila e o resíduo de Gly11 (**Figura 23b**). Um fato interessante é que a interação do tipo cátion-pi envolvendo o anel e resíduo de Arg254 é comum não só a esses dois compostos, mas a todas as outras moléculas do grupo cinco, indicando que ela pode ser importante para estabilização desses complexos.

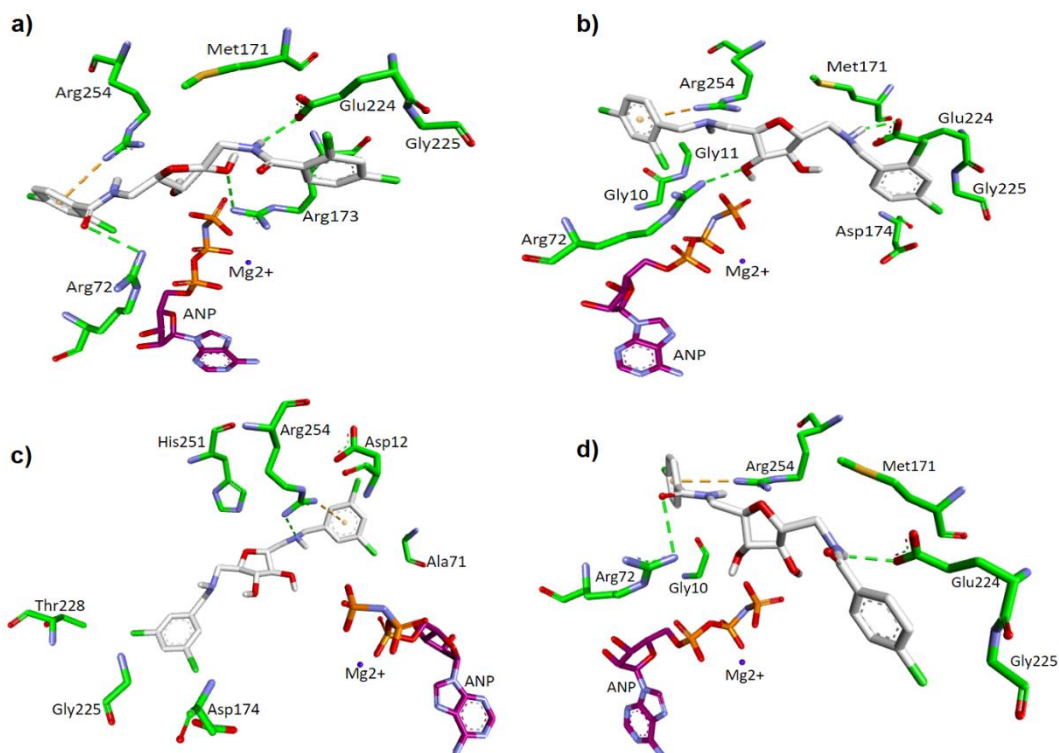


Figura 23 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo os ligantes do grupo cinco, compostos 5 (a), 6 (b), 8 (c) e 13 (d) (carbonos em branco), com a enzima SaPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ANP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas em verde e a interação do tipo cátion-pi como uma linha tracejada amarela.

O grupo seis, formado pelos compostos 7, 9, 11 e 12 (**Figura 24**), também se posicionou mais lateralmente ao sítio ativo em uma conformação estendida, novamente abrangendo algum sítio extra e também a região ocupada pelo ligante natural, porém a furanose está invertida em relação às conformações assumidas pelos compostos do grupo cinco. Os valores de energia de ligação são os mais baixos em relação a todos os grupos anteriores, o que indica que essa pose pode ser a preferida dos compostos nessa enzima.

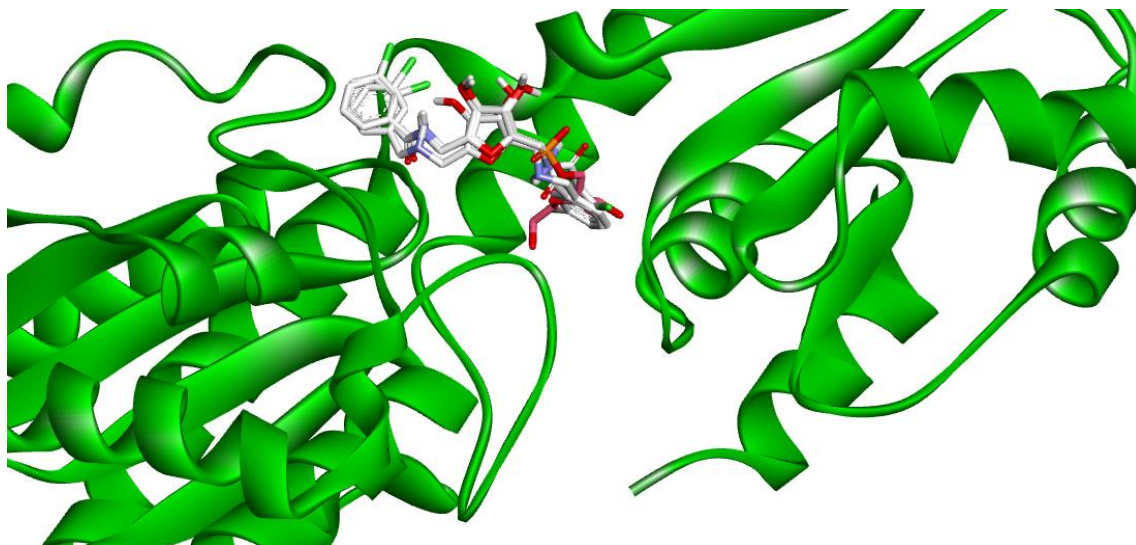


Figura 24 - Pose assumida pelos compostos 7, 9, 11 e 12 (carbonos brancos), pertencentes ao grupo seis, frente à enzima SaPFK (representação em fitas verdes). O ligante cristalográfico F6P aparece com os carbonos em rosa.

Na **Figura 25** são apresentadas as interações para cada molécula do grupo seis.

O composto com melhor interação dentro desse grupo e dentre todos os outros compostos foi o composto 9, com energia de ligação de -6,6 kcal/mol. Observando as suas interações (**Figura 25b**), nota-se a presença de ligações de hidrogênio, as quais envolvem o oxigênio da furanose e o resíduo de Arg72, o oxigênio carbonílico e os resíduos de Asp12 e Arg254 e do hidrogênio da hidroxila da furanose com His251. Além disso, há uma interação cátion-pi entre o anel clorofenila e o resíduo de Arg173. O complexo menos estável foi observado para o composto 12, cuja energia de ligação foi de -5,7 kcal/mol. Duas ligações foram observadas, uma entre o oxigênio da furanose e o resíduo de Arg72, e outra entre o anel aromático e o resíduo de Arg173 (**Figura 25d**). Novamente, a interação do tipo cátion-pi foi comum a todas as moléculas do grupo, porém envolvendo outro resíduo, o de Arg173. Essa interação também foi observada para o composto 1, que também apresenta um valor de energia de ligação mais baixo, se comparado aos demais. Isso pode evidenciar a importância dessa ligação na estabilização dos complexos com a SaPFK. Outrossim, outra ligação que se repete em todas as moléculas desse grupo é a ligação de hidrogênio que se dá entre o oxigênio da furanose e o resíduo de

Arg72. Nesse sentido, ela também pode desempenhar um papel importante ao estabilizar os complexos enzima-ligantes.

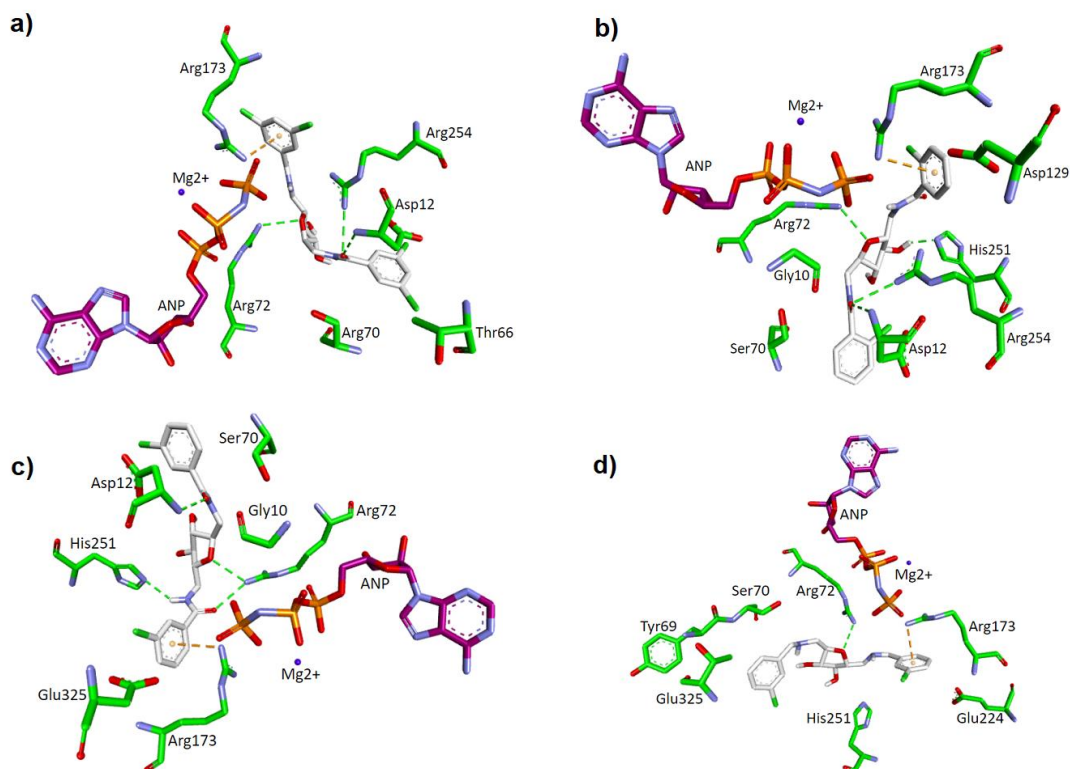


Figura 25 - Interações observadas para o complexo de menor energia envolvendo os ligantes do grupo cinco, compostos 7 **(a)**, 9 **(b)**, 11 **(c)** e 12 **(d)** (carbonos em branco), com a enzima SaPFK (carbonos em verde) e o ligante cristalográfico ANP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas em verde e a interação do tipo cátion-pi como uma linha tracejada amarela.

Ademais, a participação recorrente de alguns resíduos, como Glu325, Glu224, Arg72 e Arg173, em ligações de hidrogênio pode indicar uma maior relevância deles em encontrar pontos de interação nessa estrutura.

5.3 Estudos de previsão do perfil ADMET dos ligantes em estudos

Além das possíveis interações intermoleculares dos compostos estudados com a fosfofrutoquinase, foram previstos também, a partir de estudos

in silico, suas características físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas utilizando o programa OSIRIS Property Explorer e o servidor online SwissADME.

Na **Tabela 5**, estão inseridos os dados de propriedades físico-químicas e toxicológicas para os 14 compostos. O programa OSIRIS Property Explorer foi utilizado para essa etapa de previsão.

Tabela 5 - Dados de propriedades físico-químicas e toxicológicas previstas para os 14 compostos

Cpt	Riscos toxicológicos				Propriedades físico-químicas				Druglik eness	Drug Score
	Mutagênico	Tumorigênico	Irritante	Efeito sobre reprodução	Clog P	Solubilidade	PM	TPSA		
1	Sem risco	Alto risco	Sem risco	Sem risco	2,93	-6,03	470,0	107,8	0,19	0,22
2	Sem risco	Alto risco	Sem risco	Sem risco	2,77	-5,78	442,0	73,75	-1,14	0,19
3	Sem risco	Sem risco	Sem risco	Sem risco	2,93	-6,03	470,0	107,8	-1,97	0,27
4	Sem risco	Sem risco	Sem risco	Sem risco	2,77	-5,78	442,0	73,75	-3,26	0,27
5	Sem risco	Sem risco	Sem risco	Sem risco	2,97	-5,77	506,0	107,8	1,41	0,41
6	Sem risco	Sem risco	Sem risco	Sem risco	2,81	-5,51	478,0	73,75	0,34	0,40
7	Sem risco	Sem risco	Sem risco	Sem risco	2,97	-5,77	506,0	107,8	-5,80	0,23
8	Sem risco	Sem risco	Sem risco	Sem risco	2,81	-5,51	478,0	73,75	-4,48	0,26
9	Sem risco	Sem risco	Sem risco	Sem risco	1,76	-4,30	438,0	107,8	0,87	0,59
10	Sem risco	Sem risco	Sem risco	Sem risco	1,59	-4,04	410,0	73,75	-0,33	0,53
11	Sem risco	Sem risco	Sem risco	Sem risco	1,76	-4,30	438,0	107,8	-0,84	0,45
12	Sem risco	Sem risco	Sem risco	Sem risco	1,59	-4,04	410,0	73,75	-0,95	0,47
13	Sem risco	Sem risco	Sem risco	Sem risco	1,76	-4,30	438,0	107,8	2,56	0,66
14	Sem risco	Sem risco	Sem risco	Sem risco	1,59	-4,04	410,0	73,75	1,01	0,64

A avaliação de propriedades toxicológicas fornecida pelo programa prevê riscos de efeitos mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e reprodutivos. Para esse estudo, os compostos avaliados, em geral, não apresentaram nenhum desses efeitos, excetuando-se apenas os compostos 1 e 2, para os quais foi indicado alto risco de efeitos tumorigênicos. Esses compostos são uma amida e uma amina, respectivamente, e diferem dos outros apenas em relação à posição do segundo anel do grupo naftila, o que pode estar associado à tumorigenicidade observada.

Nas propriedades físico-químicas, são preditos os valores de ClogP, solubilidade em água, peso molecular e TPSA (área de superfície polar topológica), sendo que para cada propriedade são estabelecidos limites dentro

dos quais, a molécula apresenta um comportamento em consonância com um fármaco.

Os valores de ClogP medem a lipofilicidade do composto e não devem ser superiores a 5 para que este tenha uma probabilidade razoável de ser bem absorvido caso seja um fármaco de uso oral (OSIRIS Property Explorer, 2023). Nos resultados das análises desse parâmetro, os compostos ficaram dentro do limite aceitável. Para os compostos de 1 a 8, os valores foram maiores que 2, enquanto que para os compostos de 9 a 14, foram menores. Nesse caso, essa mudança na lipofilicidade pode estar associada à presença do sistema naftila, nos compostos 1-4, e do sistema diclorofenila, nos compostos 5-8, que elevam o valor de ClogP em comparação ao sistema clorofenila presente nos demais. Quanto aos valores de solubilidade, que medem a hidrossolubilidade do composto, o ideal é que sejam maiores que -4, pois abaixo disso a absorção gastrointestinal do composto seria comprometida (OSIRIS Property Explorer, 2023). Nos resultados, nota-se uma predominância de valores abaixo de -4, condizentes com o que foi obtido para o ClogP. Dessa forma, os compostos de 1 a 8 apresentaram menores valores de solubilidade, ultrapassando o limite desejado, em comparação com os compostos de 9 a 14 que, razoavelmente, se encaixam no limiar proposto.

O parâmetro TPSA define a área de superfície ocupada por átomos polares em uma molécula, estando relacionada com a capacidade de formação de ligações de hidrogênio, e consequentemente, com a polaridade e a absorção intestinal humana (RASHID, 2020). Verber e colaboradores (2002) afirmam que o valor limítrofe para esse parâmetro é menor ou igual a 140 Å, dentro do qual a biodisponibilidade oral é adequada. Nesse ínterim, todos os compostos analisados ficaram dentro dessa faixa aceitável. É notório, porém, que não houve uma correlação significativa com o que foi previsto para o ClogP. Como TPSA normalmente se relaciona com a lipofilia de forma inversa, ou seja, quanto maior o seu valor, mais baixa a lipofilia seria, era esperado que as substâncias com maiores ClogP tivessem menores TPSA, o que não foi observado. Nesse caso, uma tendência interessante foi observada. Todas as amidas apresentaram exatamente o mesmo valor de TPSA (107,8) e todas as aminas também tiveram um resultado igual (73,75). Tais resultados sugerem que a presença de um átomo de cloro adicional, no sistema diclorofenila, e de mais um anel aromático,

no sistema naftila, não impactam significativamente na superfície polar dos compostos, apesar de influenciar no aumento da lipofilia.

Relativamente ao peso molecular, sua influência se dá na absorção, já que compostos de maior massa são menos absorvidos no trato gastrointestinal e, conseqüentemente, não atingem o local de ação. Por conseguinte, o programa OSIRIS indica que valores mais compatíveis com uma boa absorção devem ser inferiores a 450 Da (OSIRIS Property Explorer, 2023). A grande maioria dos compostos apresenta resultados satisfatórios, o que é um bom indicativo pois melhora as possibilidades de absorção e transporte dessas substâncias para o local de ação, se administradas por via oral.

O parâmetro Druglikeness mede a similaridade estrutural dos compostos em estudo com fármacos já aprovados, e quando apresenta valores mais positivos há o indicativo de maior grau de semelhança (OSIRIS Property Explorer, 2023). Nesse caso, foram observados valores negativos para a maioria dos compostos, o que indica um baixo grau de semelhança aos fármacos em comercialização. Concernente ao Drug Score, que combina os valores obtidos de Druglikeness, CLogP, Solubilidade, massa molecular (MM) e riscos toxicológicos em um único valor, de modo a avaliar se o composto tem potencial para se tornar um fármaco ou não, quanto mais o valor obtido for próximo de 1, maior o potencial. Os compostos estudados, de forma geral, apresentaram valores bem abaixo de 1, sendo que os valores mais baixos foram observados para os compostos 1-8. Esses resultados podem ser indicativos de que os compostos 9-14 têm propriedades mais compatíveis com o que se deseja para um fármaco de uso oral, com 13 e 14 sendo os mais promissores.

Na **Tabela 6**, são apresentados os dados de propriedades farmacocinéticas e dados relacionados à química medicinal previstos para os compostos em estudo, utilizando o servidor online SwissADME. O programa avalia as propriedades farmacocinéticas por meio da previsão do comportamento das substâncias em estudo com relação à absorção gastrointestinal, BHE (barreira hematoencefálica) e inibição das isoformas do CYP450.

Tabela 6 - Dados de propriedades farmacocinéticas, *druglikeness* e relacionadas a química medicinal previstas para os 14 compostos.

Cpt	Propriedades farmacocinéticas							Druglikeness	Química medicinal
	Absorção GI	BHE	CYP1A2_i	CYP2C19_i	CYP2C9_i	CYP2D6_i	CYP3A4_i	Lipinski #violações	PAINS #alerta
1	Alta	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	0	0
2	Alta	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	0	0
3	Alta	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	0	0
4	Alta	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	0	0
5	Alta	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	1/ P.M>500	0
6	Alta	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	0	0
7	Alta	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	1/P.M>500	0
8	Alta	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	0	0
9	Alta	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	0	0
10	Alta	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	0	0
11	Alta	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	0	0
12	Alta	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	0	0
13	Alta	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	0	0
14	Alta	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	0	0

Em relação às propriedades de absorção no trato gastrointestinal, prevê-se uma alta absorção para todos os compostos, o que é um bom indicativo para uma boa biodisponibilidade dessas substâncias quando administradas por via oral. Considerando o parâmetro BHE, que indica a possibilidade de ação central dos compostos, um padrão interessante foi observado. Os resultados obtidos para todas as amidas indicam uma baixa probabilidade de exerçam qualquer efeito central, enquanto que para as aminas essa probabilidade tende a ser alta. Isso pode estar relacionado ao TPSA, que é maior para as amidas do que para as aminas, podendo comprometer o acesso dessas substâncias ao SNC, mesmo quando o ClogP é maior. Considerando que parte dos compostos estudados provavelmente não atravessariam a barreira hematoencefálica, esses resultados apontam para uma limitação na utilização dessas substâncias no tratamento da doença do sono, à nível de Sistema Nervoso Central, restringindo o uso para tratar a doença a nível periférico.

O conhecimento do comportamento dos compostos estudados quanto à previsão de inibição enzimática de isoformas do CYP450 é importante por permitir antecipar potenciais interações farmacológicas que impactem no metabolismo de xenobióticos reconhecidos por essas enzimas. Nesse sentido, os dados obtidos para esse parâmetro, no caso dos 14 compostos, podem ser considerados uniformes. Pela previsão do software, a isoforma CYP1A2 não seria inibida por nenhuma das substâncias, entretanto todas elas inibiriam a

isoforma CYP2D6. As isoformas CYP2C19 e CYP3A4 são passíveis de inibição pela maioria dos compostos, enquanto uma minoria inibiria a isoforma CYP2C9.

Quanto ao parâmetro de druglikeness, os compostos foram avaliados conforme a Regra dos 5 de Lipinski (2001), que afirma que a boa biodisponibilidade oral de um fármaco está associada à não violação de mais de um dos seguintes parâmetros: $\text{ClogP} < 5$; $\text{PM} < 500 \text{ Da}$; grupos doadores de ligação de hidrogênio (HBD; $\text{NH} + \text{OH}$) < 5 ; grupos aceptores de ligação de hidrogênio (HBA; $\text{N} + \text{O}$) < 10 . Nesse sentido, todos os quatorze compostos se encaixam nessa definição, com a maioria das moléculas não violando nenhum dos parâmetros e somente os compostos 5 e 7 ultrapassando uma das regras (Apresentando $\text{PM} > 500 \text{ Da}$). A combinação desses resultados sugere que todos os compostos analisados poderiam apresentar uma biodisponibilidade oral adequada para uso por essa via, estando condizente com o parâmetro de previsão de absorção no trato gastrointestinal.

Pan-assay interference compounds (PAINS) são definidos como compostos que podem induzir resultados falso positivos em ensaios biológicos, gerando com isso, um grande desafio na interpretação dos resultados dessas análises (BAELL e HOLLOWAY, 2010). Esses compostos têm a capacidade de atuar inespecificamente em diversos alvos, o que interfere no ensaio e pode impactar inclusive na segurança de seu uso. O servidor SwissADME também foi utilizado para prever se os compostos em estudos apresentam características estruturais comumente encontradas nos compostos com tal propriedade. Nas análises, não foi previsto qualquer alerta para os compostos avaliados.

5.4 Análise do perfil dos compostos estudados como potenciais candidatos a novos fármacos tripanocida e antibacteriano, considerando os resultados dos estudos *in silico*

Examinando-se os resultados obtidos nos estudos de previsão *in silico* de propriedades ADMET em conjunto com os resultados dos estudos de *docking* molecular, é possível assinalar que as substâncias estudadas apresentam características que, se confirmadas experimentalmente, as tornariam potenciais

candidatos a fármacos. Para se considerar um bom inibidor da enzima PFK, é importante que o composto forme um complexo de baixa energia com o alvo, o que pode estar relacionado principalmente a interações com os resíduos considerados essenciais à atividade enzimática.

No caso da TbPFK, Lavorato e colaboradores (2012) relataram os principais resíduos de aminoácidos considerados importantes para a ação dessa enzima. Notáveis pontos de interação foram descritos pelos autores, tanto com o ATP quanto com o substrato natural F6P. Os principais resíduos envolvidos nas interações com o ATP são Gly107, Arg173, Gly198, Gly200, Thr201, Asn343, Gly174 e Pro175. Já para F6P, os resíduos de Arg383, Glu325, Arg173, Tyr380 e Lys374 parecem ser importantes. Além disso, considerando-se o mecanismo catalítico proposto na revisão citada, nota-se que os resíduos de Arg173 e Asp229 participam da reação como resíduos catalíticos, desempenhando assim um papel crucial para manutenção da atividade enzimática, sendo que o Arg173 destaca-se por ser um ponto de interação tanto com o ATP, quanto com a F6P.

Dessa forma, tais resíduos parecem ser promissores como pontos essenciais de interação molecular de novos fármacos tripanocidas. Nos estudos de *docking* descritos por Lavorato e colaboradores (2012), um dos derivados aqui citados anteriormente por estar incluído entre os principais inibidores de PFK encontrados por Nowicki e colaboradores (2008) (**IV, Tabela 2**) foi analisado e suas principais interações polares se dão com os resíduos de Asp377, Lys270, Glu325 e Tyr380 (**Figura 26**).

Os autores destacaram a potencialidade do composto testado pelo seu bom ajuste no sítio ativo da enzima, mencionando os pontos adicionais de interação que podem ser explorados, principalmente os de maior importância para a atividade da enzima. Comparando com os resultados obtidos no presente trabalho, nota-se que os novos derivados demonstraram novas interações que não foram vistas na revisão de Lavorato e colaboradores (2012).

Uma causa provável é o aumento de tamanho da cadeia lateral dos novos derivados, em relação a esse derivado testado, de forma que as moléculas se posicionaram de forma diferente, e em regiões diferentes no sítio ativo, o que facilitou para que encontrassem novos pontos de interação. Na **Figura 26** é apresentado um comparativo entre as interações do composto IV (**Tabela 2**) e

as interações de composto 11, estudado nesse trabalho, a fim de ilustrar esses novos pontos de interação com resíduos importantes.

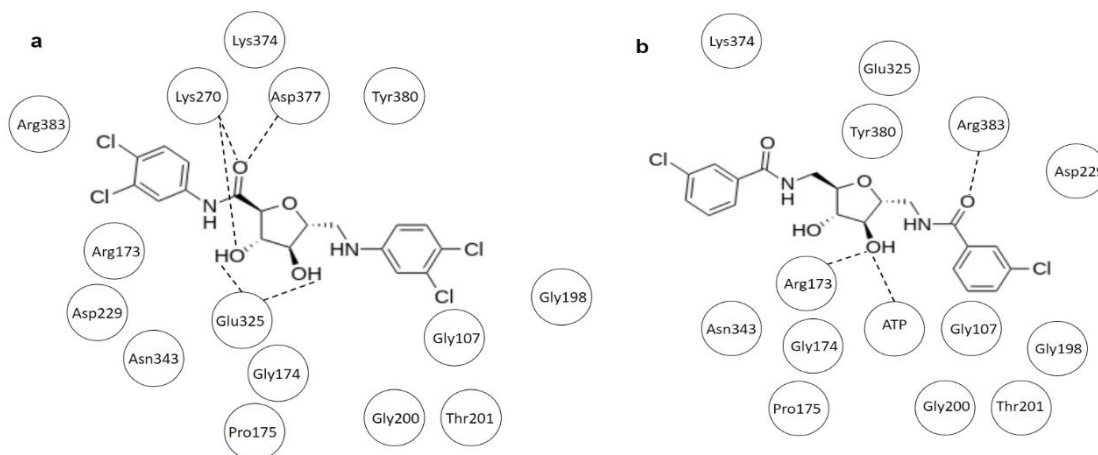


Figura 26 - Interações encontradas da enzima TbPFK com a substância IV em estudos de *docking* molecular realizados por Lavorato e colaboradores (2012) (a) em comparação com as interações encontradas para o composto 11 (b). As ligações de hidrogênio são representadas por uma linha tracejada.

Em relação a esses novos pontos de interação, destacam-se aquelas encontradas entre os compostos 1, 5, 7, 9 e 11 com Arg383; 2, 4, 8, 12, 13 e 14 com Glu325 e 10, 11, 12 e 13 com Arg173. Levando em conta esses novos pontos de interação, junto ao fato de que essas interações se dão com resíduos considerados importantes para a função da TbPFK, é possível inferir que há um potencial de que essas novas substâncias consigam inibir a TbPFK em ensaios experimentais de inibição enzimática.

Analisando conjuntamente o padrão de interação e o perfil ADMET das substâncias testadas, nota-se que, em geral, a maioria das moléculas que interagem melhor com a enzima, formando os complexos ligante-alvo mais estáveis, e que interagiram com os resíduos considerados importantes para a enzima apresentaram propriedades farmacocinéticas não tão favoráveis ou vice-versa. Dentre todos os compostos, o que formou um complexo relativamente estável com a TbPFK, interagindo com resíduos importantes para a atividade enzimática, em consonância com um perfil ADMET razoavelmente bom, foi o composto 11. Na **Figura 27**, ele é mostrado juntamente com os resíduos já

mencionados como importantes para a atividade da TbPFK. É notável que essa molécula possui alguns aspectos estruturais passíveis de serem trabalhados a fim de potencializar o seu perfil de interação, destacando-se a possibilidade de troca do substituinte do anel clorado por um de característica polar, tendo em vista que ele se posiciona próximo a alguns aminoácidos de característica polar, o que poderia possibilitar novas interações com esses resíduos.

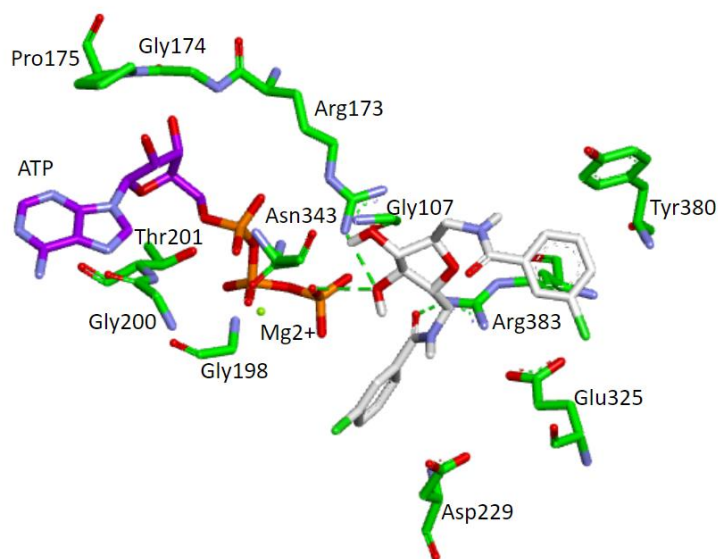


Figura 27 - Composto 11 (carbonos em branco) na presença dos principais resíduos envolvidos na atividade catalítica da enzima TbPFK (Carbonos em verde) e do ligante cristalográfico ATP (carbonos em roxo). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas em verde.

Em relação às substâncias 1 e 2, que apresentaram bons perfis de interação, mas perfis ADMET considerados ruins, mudanças estruturais benéficas incluiriam a utilização de sistemas heteroaromáticos, como indol e quinolina por exemplo, em lugar do anel naftila, o que ajudaria a balancear as propriedades físico-químicas desses compostos, e a substituição bioisostérica do grupamento amida por sulfonamida, que por ser um grupo ácido poderia interagir melhor com alguns resíduos básicos de arginina do sítio ativo.

No caso da SaPFK, as investigações de Tian e colaboradores (2018) acerca dos principais aspectos envolvidos na regulação alostérica da interconversão entre as formas dimérica inativa e tetramérica ativa da enzima, apontaram a importância do motivo GL (Gly150 e Leu151), juntamente com a

hélice $\alpha 7$ e a F6P na conversão do dímero de SaPFK em tetrâmero. Dessa forma, presume-se que alguns aminoácidos envolvidos na interação entre F6P e a enzima, junto aos aminoácidos que compõem o motivo GL são fundamentais nesse processo.

Foi relatado que os quatro bolsos de ligação desse substrato estão localizados na interface II, entre os dois dímeros na estrutura tetramérica da enzima, com os resíduos Asp129, Met171, Gly172, Arg173, Glu224 e Arg254 da subunidade A interagindo com a porção frutose de F6P e os resíduos Arg72, Arg254 e His251 da subunidade A e Arg164' e Arg245' da subunidade D acomodando o grupo fosfato carregado negativamente da F6P (TIAN et al., 2018). Considerando a criticidade do papel desempenhado pela conversão de dímero e tetrâmero modulada por F6P na regulação da atividade catalítica de SaPFK, pode-se considerar os resíduos mencionados acima como promissores na busca por pontos de interações importantes para a atividade enzimática.

Em relação aos resultados dos compostos avaliados, algumas interações envolvendo determinados pontos importantes foram observadas, destacando-se as interações entre os compostos 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 12 com o Arg173; 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 13 com Arg254; 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13 com Arg72; e 4, 9 e 11 com His251. Considerando a importância desses resíduos à atividade da SaPFK, pode-se dizer novamente que há um potencial de que essas substâncias exibam algum tipo de atividade inibitória e podem ser de interesse por mais estudos a partir de outras modificações. A análise do perfil de interação em conjunto com o ADMET revelou que o composto mais promissor no estudo com SaPFK é o composto 9. Na **Figura 28**, ele é mostrado juntamente com os resíduos já mencionados como importantes para a atividade da SaPFK. Além de formar o complexo ligante-alvo mais estável, dentre todas as outras moléculas, para a SaPFK, incluindo o maior número de interações com os resíduos considerados mais relevantes, apresentou um perfil ADMET razoavelmente bom. Levando em conta possíveis melhorias estruturais benéficas ao perfil de interação, novamente a troca de substituintes no anel clorado por um grupo de característica polar poderia melhorar a interação com os resíduos polares dos quais ele está próximo. Um grupo sulfonamida, em lugar da amida, também poderia contribuir ao incrementar a interação mimetizando o grupo fosfato de F6P.

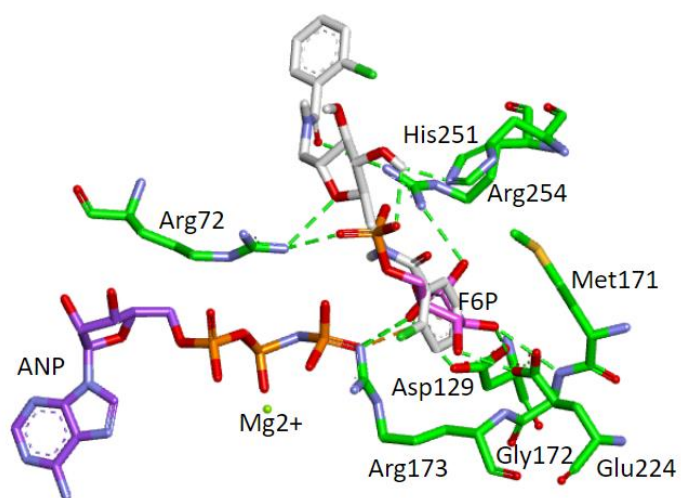


Figura 28 - Composto 9 (carbonos em branco) na presença dos principais resíduos envolvidos na regulação alostérica da atividade catalítica da enzima SaPFK (Carbonos em verde), do ligante cristalográfico ANP (carbonos em roxo) e da F6P (carbonos em rosa). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas em verde e a interação do tipo cátion-pi como uma linha tracejada amarela.

6 CONCLUSÃO

Em geral, os compostos estudados apresentaram um bom perfil de interação, que é evidenciado pelos baixos valores de energia de ligação entre os complexos enzima-ligante.

Comparando as duas enzimas, a que formou complexos mais estáveis foi a TbPFK, sendo que as moléculas de melhor interação foram o composto 1, para a TbPFK e o composto 9 para a SaPFK.

Os perfis ADMET demonstrados foram razoáveis, sendo observada a tendência de melhores propriedades farmacocinéticas e de toxicidade para os compostos com perfis de interação menos favoráveis, como 13 e 14, em contraste com compostos como 1 e 2, que tiveram boa interação com as duas enzimas, mas que não apresentaram boas propriedades ADMET, incluindo o risco de serem tumorigênicos.

Nesse sentido, mudanças estruturais podem ser pensadas a fim de solucionar esses problemas, como modificações principalmente nos grupos naftila (trabalhando-se com sistemas heteroaromáticos), nos anéis clorados e diclorados (com a troca dos substituintes por grupos polares) e no grupo amida (substituindo-a por um grupo sulfonamida).

Ademais, interações observadas entre as moléculas e alguns resíduos essenciais às atividades catalíticas das enzimas são um bom indicativo do seu potencial inibitório, apontando para a necessidade de se continuar o estudo desses compostos como potenciais candidatos a fármacos tripanocidas e antibacterianos. Considerando-se os perfis ADMET e de interação em conjunto, nota-se que as substâncias 11 e 9 destacaram-se por apresentar características mais favoráveis do ponto de vista do desenvolvimento de novos fármacos, o que os qualifica como principais candidatas a novos estudos.

REFERÊNCIAS

- ALQAHTANI, Saeed. *In silico*ADME-Tox modeling: progress and prospects. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 13, n. 11, p. 1147–1158, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28988506/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.
- AYYILDIZ, Merve; CELIKER, Serkan; OZHELVACI, Fatih; *et al.* Identification of Alternative Allosteric Sites in Glycolytic Enzymes for Potential Use as Species-Specific Drug Targets. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.00088/full>>. Acesso em: 11 dez. 2022.
- Baell JB, Holloway GA. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. **Journal of Medicinal Chemistry**. 53 (7): 2719–40, 2010.
- BOUCHER, Helen W.; COREY, G. Ralph. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. S5, p. S344–S349, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18462089/#:~:text=Infection%20due%20to%20S.,as%20does%20nosocomial%20MRSA%20infection.>>. Acesso em: 11 dez. 2022.
- BÜSCHER, Philippe; CECCHI, Giuliano; JAMONNEAU, Vincent; *et al.* Human African trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 390, n. 10110, p. 2397–2409, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28673422/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.
- CENTERS OF DISEASE AND CONTROL PREVENTION. **CDC - African Trypanosomiasis - Epidemiology & Risk Factors**. cdc. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/epi.html>>. Acesso em: 11 dez. 2022.
- CLAUSTRE, Samantha; DENIER, Colette; LAKHDAR-GHAZAL, Faouzi; *et al.* Exploring the Active Site of *Trypanosoma brucei* Phosphofructokinase by Inhibition Studies: Specific Irreversible Inhibition. **Biochemistry**, v. 41, n. 32, p. 10183–10193, 2002. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12162732/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

CONG, Yanguang; YANG, Sijin ; RAO, Xiancai. Vancomycin resistant Staphylococcus aureus infections: A review of case updating and clinical features. **Journal of Advanced Research**, v. 21, p. 169–176, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32071785/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

CUNHA, VITOR LEONARDO SILVA. **SÍNTESE DE INIBIDORES POTENCIAIS DE FOSFOFRUTOQUINASE DE TRYPANOSOMA BRUCEI DERIVADOS DE 2,5-ANIDRO-D- MANITOL**. 2016. 262 p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas.) - Universidade Federal de Minas Gerais, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-B4WNXD>. Acesso em: 11 dez. 2022.

FERREIRA, LUIZ FELIPE GOMES REBELLO. **Novas estratégias para métodos in silico na inovação terapêutica utilizando computação distribuída: GriDoMol**. 2017. Tese de Doutorado (Doutor em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://encurtador.com.br/hwEN8>. Acesso em: 11 dez. 2022.

GAJDÁCS, Márió. The Continuing Threat of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 52, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31052511/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

GUEDES, Isabella A.; MAGALHÃES, Camila S. de ; DARDENNE, Laurent E. Atracamento Molecular. *In*: **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, 2014.p. 188-208. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/166105>.

HANSON. Inhibition of gluconeogenesis and glycogenolysis by 2,5-anhydro-D-mannitol. **The Journal of biological chemistry**, v. 259, n. 1, 1984. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6423625/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

IMRAN, Mohd; KHAN, Shah Alam; ALSHAMMARI, Mohammed Kanan; *et al*. Discovery, Development, Inventions and Patent Review of Fexinidazole: The First All-Oral Therapy for Human African Trypanosomiasis. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 2, p. 128, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8247/15/2/128>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

KENNEDY, Peter G. E. Update on human African trypanosomiasis (sleeping

sickness). **Journal of Neurology**, v. 266, n. 9, p. 2334–2337, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31209574/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

KENNEDY, Peter GE. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 2, p. 186–194, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23260189/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

KOURTIS, Athena P.; HATFIELD, Kelly; BAGGS, James; *et al.* *Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections — United States. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 68, n. 9, p. 214–219, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30845118/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

LAVORATO, Stefânia N.; ANDRADE, Saulo F.; SILVA, Thaïs H. A.; *et al.* Phosphofructokinase: structural and functional aspects and design of selective inhibitors. **MedChemComm**, v. 3, n. 10, p. 1219, 2012. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/md/c2md20122d>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

LEVINSON, Warren; CHIN-HONG, Peter; JOYCE, Elizabeth; *et al.* Cocos Gram-positivos. In: **Microbiologia Médica e Imunologia - 15.ed.** [s.l.]: McGraw Hill Brasil, 2021.p. 105-123 Disponível em: <[https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9786558040156/epubcfi/6/48\[%3Bvnd.vst.idref%3Dcap_015.xhtml\]/4/2/2/1:5\[P%3%8DT%2CULO\]>](https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9786558040156/epubcfi/6/48[%3Bvnd.vst.idref%3Dcap_015.xhtml]/4/2/2/1:5[P%3%8DT%2CULO]>)>.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 46 (1–3): 3–26, 2001.

LOZANO, Rafael; MOHSEN NAGHAVI; FOREMAN, Kyle J; *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, v. 380, n. 9859, p. 2095–2128, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0140673612617280>>. Acesso em: 4 nov. 2023.

MCNAE, Iain W.; KINKEAD, James; MALIK, Divya; *et al.* Fast acting allosteric phosphofructokinase inhibitors block trypanosome glycolysis and cure acute African trypanosomiasis in mice. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021.

Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-021-21273-6>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

MCNAE, Iain W.; MARTINEZ-OYANEDEL, José; KEILLOR, Jeffrey W.; *et al.* The Crystal Structure of ATP-bound Phosphofructokinase from *Trypanosoma brucei* Reveals Conformational Transitions Different from those of Other Phosphofructokinases. **Journal of Molecular Biology**, v. 385, n. 5, p. 1519–1533, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19084537/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

NELSON, David L ; COX, Michael M. Glicólise. In: **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. [s.l.]: Barcelona Omega, 2022. p. 534-547. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788582715345/pageid/572>>.

NOWICKI, Matthew W.; TULLOCH, Lindsay B.; WORRALL, Liam; *et al.* Design, synthesis and trypanocidal activity of lead compounds based on inhibitors of parasite glycolysis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 5050–5061, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18387804/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

OLIVEIRA, Diana; BORGES, Anabela ; SIMÕES, Manuel. Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 252, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29921792/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

OSIRIS Property Explorer. Available online: www.organic-chemistry.org/prog/peol/. Accessed 06/21/2023.

PROCOP, Gary W *et al.* **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas**, 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara: Grupo GEN, 2018. E-book. ISBN 9788527734516. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527734516/>. Acesso em: 01 nov. 2023.

RASHID, Mohammad. Design, synthesis and ADMET prediction of bis-benzimidazole as anticancer agent. **Bioorganic Chemistry**, v. 96, p. 103576–

103576, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045206819316414?via%3Dihub>. Acesso em: 29 ago. 2023.

REY Luís. Tripanosomíase por *Trypanosoma Brucei* e Doença do sono. In: **Parasitologia : parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.p. 344-358. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/978-85-277-2027-4/pageid/360>. Acesso em: 11 dez. 2022.

RIQUELME, P T; WERNETTE-HAMMOND, M E; KNEER, N M; *et al.* Regulation of carbohydrate metabolism by 2,5-anhydro-D-mannitol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 14, p. 4301–4305, 1983. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.80.14.4301>. Acesso em: 11 dez. 2022.

Swiss Institute of Bioinformatics SwissADME online database. www.swissadme.ch. Accessed 06/21/2023.

TIAN, Tian; WANG, Chengliang; WU, Minhao; *et al.* Structural Insights into the Regulation of *Staphylococcus aureus* Phosphofructokinase by Tetramer–Dimer Conversion. **Biochemistry**, v. 57, n. 29, p. 4252–4262, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29940104/>. Acesso em: 11 dez. 2022.

TIBERTI, Natalia; SANCHEZ, Jean-Charles. Sleeping Sickness in the ‘Omics Era. **PROTEOMICS - Clinical Applications**, v. 12, n. 4, p. 1700041, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29517161/>. Acesso em: 11 dez. 2022.

TONG, Steven Y. C.; DAVIS, Joshua S.; EICHENBERGER, Emily; *et al.* *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26016486/>. Acesso em: 11 dez. 2022.

TURNER, Nicholas A; SHARMA-KUINKEL, Batu K.; MASKARINEC, Stacey A.; *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203–218, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-018-0147-4>. Acesso em: 11 dez. 2022.

Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J Med Chem.** 2002 Jun 6;45(12):2615-23. doi: 10.1021/jm020017n. PMID: 12036371.

VITKO, Nicholas P.; SPAHICH, Nicole A. ; RICHARDSON, Anthony R. Glycolytic Dependency of High-Level Nitric Oxide Resistance and Virulence in *Staphylococcus aureus*. **mBio**, v. 6, n. 2, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25852157/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human African trypanosomiasis (sleeping sickness)**. Who.int. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/human-african-trypanosomiasis>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

ZUO, Jianlin; TANG, Jinshuo; LU, Meng; *et al.* Glycolysis Rate-Limiting Enzymes: Novel Potential Regulators of Rheumatoid Arthritis Pathogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34899740/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.