



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

SALOMÃO LEONARDO SILVA SOARES DE SÁ

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE 1,3-
BISARILOXIPROPANAMINAS E 1,3-BISARILOXIPROPANOIS COM AÇÃO
ANTIFÚNGICA FRENTE À ENZIMA GWT1**

Barreiras – BA

2023

SALOMÃO LEONARDO SILVA SOARES DE SÁ

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE 1,3-BISARILOXIPROPANAMINAS E 1,3-BISARILOXIPROPANOIS COM AÇÃO ANTIFÚNGICA FRENTE À ENZIMA GWT1.

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.^a Dr.^a Stefânia Neiva Lavorato

Barreiras – BA

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

S111 Sá, Salomão Leonardo Silva Soares de.

Avaliação in silico do potencial de inibição de 1,3-bisariloxipropanaminas e 1,3-bisariloxipropanois com ação antifúngica frente à enzima GWT1. / Salomão Leonardo Silva Soares de Sá. – 2023.

53f.

Orientador: Profª Dra. Stefânia Neiva Lavorato.

TCC (Graduação) – Bacharelado em Farmácia. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2023.

1. Ação antifúngica. 2. Inibição enzimática. 3. GWT1. 4. Docking molecular. I. Lavorato, Stefânia Neiva. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 615.32

SALOMÃO LEONARDO SILVA SOARES DE SÁ

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE 1,3-BISARILOXIPROPANAMINAS E 1,3-BISARILOXIPROPANOIS COM AÇÃO ANTIFÚNGICA FRENTE À ENZIMA GWT1

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 17 de novembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Stefania Neiva
Laborato:015352
24614

Assinado de forma digital
por Stefania Neiva
Laborato:01535224614
Dados: 2023.11.17 17:42:37
-03'00'

Prof.^a Dr.^a Stefânia Neiva Lavorato
(Orientadora)

SAULO FEHELBERG
PINTO
BRAGA:10629839719

Assinado de forma digital por
SAULO FEHELBERG PINTO
BRAGA:10629839719
Dados: 2023.11.17 18:40:21
-03'00'

Prof. Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga
(Membro)



Documento assinado digitalmente
BRENO KAIQUE DONATO DOS SANTOS
Data: 28/11/2023 12:29:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Breno Kaique Donato dos Santos
(Membro)

Dedico este trabalho à minha mãe.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial, minha mãe, Roseli, meu pai, Eléus, e meu irmão, Mateus, que me incentivaram nos momentos difíceis, me forneceram apoio emocional e sempre acreditaram em mim.

Aos meus amigos, em especial, Arthur, Felipe, Ingrid, Mariana, Monalisa, Paloma e Tássia, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo suporte demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho e durante toda a graduação.

Ao meu amor, Gustavo, por me amar de volta, por me ajudar a superar dificuldades cotidianas e a desvendar os mistérios da mente humana.

À professora Stefânia, por ter sido minha orientadora e ter desempenhado tal função com excelência, dedicação e amizade. Por ser uma ótima professora e me fazer despertar o interesse pela Química Medicinal e Farmacêutica.

À Universidade Federal do Oeste da Bahia pela infraestrutura para realização dessa pesquisa e ao CNPq pelo fomento da bolsa de iniciação científica.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”

Marie Curie

RESUMO

Infecções causadas por fungos são um problema de saúde enfrentado mundialmente, que ocasiona mais de 1,6 milhão de mortes por ano. O número reduzido de opções farmacológicas para o tratamento antifúngico está ainda mais ameaçado pelo desenvolvimento de cepas de fungos resistentes. O glicosilfosfatidilinositol (GPI) é um glicopeptídeo essencial para ancorar proteínas na membrana celular fúngica. Por ser responsável pela síntese do GPI, a GWT1 se torna essencial para a sobrevivência dos fungos e é um alvo interessante para a ação de fármacos antifúngicos. Um estudo recente de avaliação de atividade biológica *in vitro* revelou que compostos das classes 1,3-bisariloxipropanois e 1,3-bisariloxipropanaminas apresentam atividade antifúngica contra fungos dermatófitos e leveduras. Estudos adicionais mostraram que esses compostos agem a nível da parede celular, mas o alvo específico de ação dessas substâncias ainda é desconhecido. Assim, com o objetivo de compreender o mecanismo de ação antifúngica das substâncias das duas classes químicas supracitadas, modelos tridimensionais da enzima GWT1 das espécies *C. albicans* e *T. rubrum* foram construídos, validados e submetidos a simulações de *docking* molecular com as substâncias mencionadas. Nos estudos de validação, os modelos enzimáticos previstos mostraram pelo menos 99,1% dos seus resíduos de aminoácidos em regiões energeticamente favoráveis, indicando boa qualidade. Todos os compostos analisados, tendo como destaque os compostos 1b, 1c, 2a, 2b e 2e, formaram complexos com baixos valores de energia de ligação e várias interações relevantes com resíduos importantes para a atividade enzimática. Portanto, as classes estudadas podem ser candidatas para a realização de estudos experimentais de inibição contra a enzima GWT1 e validação se esse poderia ser realmente o alvo molecular desses compostos.

Palavras-chave: ação antifúngica; inibição enzimática; GWT1; *docking* molecular.

ABSTRACT

Infections caused by fungi are a health problem faced worldwide, causing more than 1.6 million deaths per year. The reduced number of pharmacological options for antifungal treatment is further threatened by the development of resistant fungal strains. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) is an essential glycopeptide for anchoring proteins to the fungal cell membrane. Because it is responsible for the synthesis of GPI, GWT1 becomes essential for the survival of fungi and is an interesting target for the action of antifungal drugs. A recent study evaluating *in vitro* biological activity revealed that compounds from the 1,3-bisaryloxypropanols and 1,3-bisaryloxypropanamines classes have antifungal activity against dermatophyte fungi and yeasts. Additional studies have shown that these compounds act at the cell wall level, but the specific target of action of these substances is still unknown. Thus, with the aim of understanding the mechanism of antifungal action of substances from the two aforementioned chemical classes, three-dimensional models of the GWT1 enzyme from the species *C. albicans* and *T. rubrum* were built, validated and submitted to molecular *docking* simulations with the substances mentioned. In validation studies, the predicted enzyme models obtained at least 99.1% of their amino acid residues in energetically favorable regions, showing good quality. All analyzed compounds, especially 1b, 1c, 2a, 2b and 2e compounds, formed complexes with low binding energy values and several relevant interactions with important residues for enzymatic activity. Therefore, the classes studied may be candidates for carrying out experimental inhibition studies against the GWT1 enzyme and validating whether this could really be the molecular target of these compounds.

Keywords: antifungal action; enzyme inhibition; GWT1; molecular *docking*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CADD	Planejamento de fármacos auxiliado por computador (do inglês, <i>Computer-aided drug design</i>)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GWT1	<i>Glycosylphosphatidylinositol-anchored Wall Transfer Protein 1</i>
LBDD	Planejamento de fármacos baseado no ligante (do inglês, <i>Ligand-based drug design</i>)
NAG	<i>N</i> -acetilglicosamina
NAG-PI	<i>N</i> -acetilglicosamina-fosfatidilinositol
NG-PI	Glicosamina-fosfatidilinositol
PI	Fosfatidilinositol
RMSD	Desvio quadrático médio (do inglês, <i>Root Mean Square Deviation</i>)
SBDD	Planejamento de fármacos baseado na estrutura (do inglês, <i>Structure-based drug design</i>)
UDP	Difosfato de uridina
UDP-NAG	Difosfato de uridina- <i>N</i> -acetil-glicosamina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da parede celular fúngica.....	16
Figura 2 – Rota biossintética do GPI.....	17
Figura 3 – Estrutura química dos compostos das classes 1,3-bisariloxipropanois (1a-1c) e 1,3-bisariloxipropanaminas (2a-2o) com atividade antifúngica <i>in vitro</i>	21
Figura 4 – Resultado da busca por homólogos para a sequência de aminoácidos de <i>C. albicans</i> pelo HHpred.....	25
Figura 5 – Resultado da busca por homólogos para a sequência de aminoácidos de <i>T. rubrum</i> pelo HHpred.....	26
Figura 6 – Resultados de <i>docking</i> molecular entre os ligantes manogepix e a BIQ e o sítio ativo da GWT1 de <i>C. albicans</i> (A e B , respectivamente) e <i>T. rubrum</i> (C e D , respectivamente). O sítio ativo da GWT1 é representado como fitas verdes. O código de cores para os átomos é branco para carbono, azul para nitrogênio e vermelho para oxigênio.....	30
Figura 7 – Poses observadas nos estudos de <i>docking</i> molecular para os complexos mais estáveis formados a partir de compostos das classes 1,3-bisariloxipropanois e 1,3-bisariloxipropanaminas com o sítio ativo da GWT1 de <i>C. albicans</i> . (A) Interação dos compostos 1b, 1c e 2f. (B) Interação dos compostos 2e, 2g, 2h e 2l. (C) Interação dos compostos 2a, 2b, 2i, 2j, 2k, 2m, 2n e 2o. O sítio ativo da GWT1 é representado como fitas verdes. O código de cores para os átomos é branco para carbono, ciano para flúor, azul para nitrogênio e vermelho para oxigênio.....	33
Figura 8 – Interação de 1b (A), 1c (B) e 2f (C) (padrão 1) com o sítio ativo da GWT1. O código de cores para os átomos é branco para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio, amarelo para enxofre, roxo para cloro e ciano para flúor. As cadeias carbônicas dos resíduos de aminoácidos, presentes no sítio ativo, estão representadas em verde. As interações são representadas por linhas listradas com o seguinte código de cores: verde para ligação de hidrogênio, ciano para ligação de halogênio, laranja para interação ânion π , rosa escuro para empilhamento T e rosa claro para interação π -alquil.....	34

Figura 9 – Interação de 2e (A), 2g (B), 2h (C) e 2l (D) (padrão 2) com o sítio ativo da GWT1. O código de cores para os átomos é branco para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio, amarelo para enxofre, roxo para cloro e ciano para flúor. As cadeias carbônicas dos resíduos de aminoácidos, presentes no sítio ativo, estão representadas em verde. As interações são representadas por linhas listradas com o seguinte código de cores: verde para ligação de hidrogênio, ciano para ligação de halogênio, laranja para interação ânion π ou ligação iônica, rosa escuro para empilhamentos π e T e rosa claro para interação π -alquil.....35

Figura 10 – Interação de 2a (A), 2b (B), 2i (C), 2j (D), 2k (E), 2m (F), 2n (G) e 2o (H) (padrão 3) com o sítio ativo da GWT1. O código de cores para os átomos é branco para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio, amarelo para enxofre, roxo para cloro e ciano para flúor. As cadeias carbônicas dos resíduos de aminoácidos, presentes no sítio ativo, estão representadas em verde. As interações são representadas por linhas listradas com o seguinte código de cores: verde para ligação de hidrogênio, ciano para ligação de halogênio, laranja para interação ânion π ou ligação iônica, rosa escuro para empilhamentos π ou T e rosa claro para interação π -alquil.....36

Figura 11 – Poses observadas nos estudos de *docking* molecular para os complexos mais estáveis formados a partir de compostos das classes 1,3-bisariloxipropanois e 1,3-bisariloxipropanaminas com o sítio ativo da GWT1 de *T. rubrum*. (A) Interações dos compostos 1b, 2a, 2b, 2e, 2f, 2g, 2h, 2j, 2k, 2l, 2m e 2o. (B) Interações do composto 1c. (C) Interações dos compostos 2i e 2n. O sítio ativo da GWT1 é representado como fitas verdes. O código de cores para os átomos é branco para carbono, ciano para flúor, azul para nitrogênio e vermelho para oxigênio.....37

Figura 12 – Interação de 1b (A), 2a (B), 2b (C), 2e (D), 2f (E), 2g (F), 2h (G), 2j (H), 2k (I), 2l (J), 2m (K) e 2o (L) (padrão 4) com o sítio ativo da GWT1. O código de cores para os átomos é branco para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio, amarelo para enxofre e ciano para flúor. As cadeias carbônicas dos resíduos de aminoácidos, presentes no sítio ativo, estão representadas em verde. As interações são representadas por linhas listradas com o seguinte código de cores: verde para ligação de hidrogênio, ciano para ligação de halogênio, laranja

para interação ânion π ou ligação iônica, rosa escuro para empilhamentos π ou T e rosa claro para interação π -alquil.....38

Figura 13 – Interação de 1c (padrão 5) com o sítio ativo da GWT1. O código de cores para os átomos é branco para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio, amarelo para enxofre e ciano para flúor. As cadeias carbônicas dos resíduos de aminoácidos, presentes no sítio ativo, estão representadas em verde. As interações são representadas por linhas listradas com o seguinte código de cores: verde para ligação de hidrogênio, ciano para ligação de halogênio, laranja para interação ânion π ou ligação iônica, rosa escuro para empilhamentos π e T e rosa claro para interação π -alquil.....39

Figura 14 – Interação de 2i (A), 2n (B) (padrão 6) com o sítio ativo da GWT1. O código de cores para os átomos é branco para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio, amarelo para enxofre e ciano para flúor. As cadeias carbônicas dos resíduos de aminoácidos, presentes no sítio ativo, estão representadas em verde. As interações são representadas por linhas listradas com o seguinte código de cores: verde para ligação de hidrogênio, ciano para ligação de halogênio, laranja para interação ânion π ou ligação iônica, rosa escuro para empilhamentos π e T e rosa claro para interação π -alquil.....40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Porcentagem (%) de resíduos em cada região do gráfico de Ramachandran gerado pelo Molprobit e SAVES para os modelos de <i>Candida albicans</i> previstos pelo I-Tasser, Robetta e trRosetta.....	27
Quadro 2 – Porcentagem (%) de resíduos em cada região do gráfico de Ramachandran gerado pelo Molprobit e SAVES para os modelos de <i>Trichophyton rubrum</i> previstos pelo I-Tasser, Robetta e trRosetta.....	28
Quadro 3 – Resultados de <i>docking</i> molecular dos compostos das classes dos 1,3-bisariloxipropanois e das 1,3-bisariloxipropanaminas no sítio ativo da GWT1 de <i>C. albicans</i>	31
Quadro 4 – Resultados de <i>docking</i> molecular dos compostos das classes dos 1,3-bisariloxipropanois e das 1,3-bisariloxipropanaminas no sítio ativo da GWT1 de <i>T. rubrum</i>	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1	EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES FÚNGICAS	12
2.2	TRATAMENTO ANTIFÚNGICO	14
2.3	A ENZIMA GWT1 COMO ALVO DE AGENTES ANTIFÚNGICOS	16
2.4	MODELAGEM E <i>DOCKING</i> MOLECULAR	18
2.5	COMPOSTOS PROMISSORES	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	MODELAGEM MOLECULAR DA ENZIMA GWT1	23
4.2	PREVISÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DA ENZIMA	23
4.3	ESTUDOS DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Infecções causadas por fungos são um problema de saúde enfrentado mundialmente, que ocasiona mais de 1,6 milhão de mortes por ano (Almeida *et al.*, 2019). As infecções causadas por *Candida spp.* representam a maioria dos casos, sendo responsáveis por cerca de 80% dos casos de infecções fúngicas sistêmicas (Diniz-Neto *et al.*, 2022). A candidíase geralmente se manifesta como infecções cutâneo-mucosas superficiais, mas também pode evoluir para a candidemia, assumindo caráter de infecção sistêmica (Lamoth *et al.*, 2018).

As dermatofitoses, infecções fúngicas da pele, são um problema global comum. São apresentadas por cerca de 20 a 25% da população mundial, tornando-as uma das formas mais frequentes de infecção. Os principais patógenos responsáveis pelas dermatofitoses são os dermatófitos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (Havlickova *et al.*, 2008).

Atualmente, apenas quatro classes de medicamentos antifúngicos estão disponíveis para tratar infecções fúngicas sistêmicas: os azóis, que têm como alvo a biossíntese do ergosterol; as equinocandinas, que inibem a biossíntese da parede celular fúngica; os polienos, que se ligam ao ergosterol na membrana celular fúngica levando à lise celular; e os antimetabólitos, que comprometem a síntese de DNA fúngico (Perfect, 2017; Pereira, 2017). Esse número reduzido de opções para o tratamento antifúngico está ainda mais ameaçado pelo desenvolvimento de cepas de fungos multirresistentes e o surgimento de patógenos intrinsecamente resistentes (Revie *et al.*, 2018).

Muitas proteínas da superfície celular fúngica estão ancoradas na bicamada lipídica através do glicosilfosfatidilinositol (GPI), um glicopeptídeo essencial para o crescimento celular de leveduras e fungos filamentosos (Umemura *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2020). A enzima GWT1 (*Glycosylphosphatidylinositol-anchored Wall Transfer Protein 1*) é uma inositol aciltransferase encontrada no início da via de biossíntese de GPI, sendo responsável por transferir um grupo acila a esse glicopeptídeo (Watanabe *et al.*, 2012). A biossíntese de GPI é essencial para o crescimento de células de leveduras e fungos filamentosos, mas não para o crescimento de células mamíferas (Umemura *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2020). Por exercer essa função, a GWT1 se torna essencial para a sobrevivência dos fungos e é um alvo interessante para a ação de fármacos antifúngicos.

Recentemente, um estudo de avaliação de atividade biológica *in vitro* realizado contra fungos dermatófitos e leveduras revelou que compostos das classes dos 1,3-bisariloxipropanois e das 1,3-bisariloxipropanaminas apresentam atividade antifúngica. Estudos adicionais mostraram que esses compostos agem a nível da parede celular, o que torna a enzima GWT1 um possível alvo para esses compostos. Entretanto, o alvo específico de ação dessas substâncias ainda é desconhecido (Dalla-Lana *et al.*, 2020).

Nesse trabalho, avaliou-se, por meio de análises *in silico*, usando ferramentas computacionais, como softwares de predição estrutural e *docking* molecular, se a enzima GWT1 poderia ser um alvo de ação desses compostos a nível de parede celular fúngica, ampliando assim a compreensão a respeito do mecanismo de ação antifúngica de 1,3-bisariloxipropanaminas e 1,3-bisariloxipropanois, com ação previamente determinada.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Epidemiologia das infecções fúngicas

Infecções causadas por fungos são um problema de saúde enfrentado mundialmente, que ocasiona mais de 1,6 milhão de mortes por ano, o que é semelhante à mortalidade por tuberculose e cerca de três vezes mais do que a malária (Almeida *et al.*, 2019; Bongomin *et al.*, 2017).

Infecções superficiais da pele e unhas são as doenças fúngicas mais comuns e afetam cerca de 25% da população geral em todo o mundo. As principais condições originadas por essas infecções são: pé de atleta, que acomete 20% dos adultos; micose do couro cabeludo, que afeta 200 milhões de indivíduos em todo o mundo; e infecção das unhas, que afeta cerca de 10% da população mundial, embora essa incidência seja maior em indivíduos com 70 anos ou mais (Havlickova *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2010).

Infecções das mucosas dos tratos oral e genital também são comuns, principalmente candidíase vulvovaginal ou oral. Entre 50 a 75% das mulheres em idade fértil sofrem de pelo menos um episódio de vulvovaginite e 5 a 8% delas têm pelo menos quatro episódios por ano (Sobel, 2007). Infecções orais são comumente observadas em bebês e usuários de dentaduras, em indivíduos que usam corticosteroides inalados para asma, em pacientes com leucemia e transplantados e em pessoas que fizeram radioterapia para câncer de cabeça e pescoço. Essas infecções superficiais são causadas na maioria das vezes por várias espécies de *Candida*, que são os segundos mais numerosos agentes de infecção fúngica em todo o mundo (Brown *et al.*, 2012).

As infecções fúngicas invasivas têm uma incidência muito menor do que as infecções superficiais, mas as doenças invasivas são de maior preocupação porque estão associadas a taxas de mortalidade altas, com muitas vezes passam dos 50% (Brown *et al.*, 2012). No entanto, o verdadeiro impacto desse tipo de infecção no mundo provavelmente é mal calculado devido à ausência ou indisponibilidade de métodos diagnósticos confiáveis, sensíveis e universais em diversos países e porque as infecções fúngicas geralmente são prejudicadas por outras doenças (Firacative, 2020).

As infecções causadas por *Candida spp.* representam a maioria dos casos de micoses, sendo responsáveis por cerca de 80% dos casos de infecções fúngicas sistêmicas (Diniz-Neto *et al.*, 2022). A candidíase geralmente se manifesta como infecções cutâneo-mucosas superficiais, mas também pode evoluir para a candidemia, quando a infecção ocorre de forma disseminada (Lamoth *et al.*, 2018). Esta condição é geralmente difícil de ser diagnosticada e tratada, possui uma alta taxa de mortalidade e de alto custo para tratamento. A candidemia pode ser causada principalmente pelo uso de antibióticos para tratar outras infecções, por terapia imunossupressora, nutrição parenteral e procedimentos médicos invasivos múltiplos em pacientes hospitalizados (Colombo *et al.*, 2006).

Além das leveduras, como *Candida spp.*, há também os dermatófitos, que são responsáveis por causar, principalmente, infecções de pele. Um dos dermatófitos mais importantes é o *Trichophyton rubrum*, fungo filamentoso mais comum no mundo. As infecções fúngicas das unhas, ou onicomicose, são distúrbios muito comuns e sua prevalência entre certos grupos de risco, por exemplo, diabéticos, é maior do que na população geral; também é maior em pacientes com distúrbios de queratinização que afetam a pele e as unhas, como, por exemplo, em pacientes com psoríase (Nenoff *et al.*, 2014).

A distribuição das dermatomicoses, seus agentes etiológicos e os padrões anatômicos predominantes de infecção variam com a localização geográfica e uma ampla gama de fatores ambientais e culturais (Macura, 1993; Male, 1990). Os dermatófitos prosperam em temperaturas de superfície de 25 a 28°C e a infecção da pele humana é favorecida por condições quentes e úmidas. Por essas razões, infecções fúngicas superficiais são relativamente comuns em países tropicais e são exacerbadas pelo uso de roupas oclusivas (Havlickova *et al.*, 2008).

Apesar das características regionais e das predisposições para infecções por dermatófitos, o espectro destes fungos não é estático. O turismo de massa em expansão, as atividades esportivas internacionais e o aumento da migração estão fazendo com que espécies menos comuns ou esquecidas sejam importadas e disseminadas (Havlickova *et al.*, 2008).

Geralmente, dermatófitos causam dermatomicoses superficiais caracterizadas por atividade inflamatória relativamente baixa devido a um arranjo imunológico que existe entre o fungo e seu hospedeiro humano. A poeira doméstica pode atuar como

reservatório de dermatófitos, preservando seus esporos por anos (Havlickova *et al.*, 2008).

2.2 Tratamento antifúngico

Atualmente, apenas quatro classes de medicamentos antifúngicos estão disponíveis para tratar infecções fúngicas: inibidores da biossíntese do ergosterol, como os azóis, alilaminas e morfolinas; as equinocandinas, que inibem a biossíntese da parede celular fúngica; os polienos, que se ligam ao ergosterol na membrana celular fúngica levando à lise celular, e os antimetabólitos, que comprometem a síntese de DNA fúngico (Perfect, 2017; Pereira, 2017). Esse número reduzido de opções para o tratamento antifúngico está ainda mais ameaçado pelo desenvolvimento de cepas de fungos multirresistentes e o surgimento de patógenos intrinsecamente resistentes (Revie *et al.*, 2018).

Para tratar micoses sistêmicas, os antifúngicos mais recomendados no Brasil são a anfotericina B (polieno), o fluconazol (azol) e o itraconazol (azol). Para as micoses superficiais, são preconizados a nistatina (polieno), o miconazol (azol) e o cetoconazol (azol) (Brasil, 2010). As equinocandinas e os antimetabólitos também podem tratar infecções fúngicas sistêmicas, geralmente administrados por via intravenosa ou oral (Campoy; Adrio, 2017).

Apesar de muitas das classes de agentes antifúngicos atualmente disponíveis serem altamente eficazes nos contextos apropriados, esses medicamentos, como qualquer terapia, têm limitações e ressalvas, como por exemplo, a toxicidade associada ao uso de alguns que pode ser, em determinados pacientes, até proibitiva para uso (Pianalto; Alspaugh, 2016).

Além disso, existem poucos agentes antifúngicos aprovados em apenas quatro classes de medicamentos. O restrito número de alvos sobre os quais esses fármacos podem atuar, devido aos altos níveis de semelhança entre os patógenos fúngicos eucarióticos e os hospedeiros humanos, é um fator ainda mais limitante (Pianalto; Alspaugh, 2016). Por exemplo, das quatro classes de agentes antifúngicos aprovados para o tratamento de infecções fúngicas invasivas, duas delas têm como alvo o mesmo componente da membrana celular fúngica, o ergosterol. Este pequeno número de alvos celulares aumenta as oportunidades para os fungos desenvolverem

resistência a um ou mais dos antifúngicos disponíveis (Van Den Bossche *et al.*, 1983; Gray *et al.* 2012).

Ademais, a resistência aos antifúngicos tem aumentado nas últimas décadas, sendo comum a todas as classes de agentes antifúngicos atualmente disponíveis (Pfaller, 2012). Entre as espécies de *Candida*, têm-se uma alta prevalência de resistência a azóis, em grande parte atribuída à natureza citostática desses fármacos (Perea *et al.*, 2001). Além disso, algumas cepas de *Aspergillus* e *Cryptococcus* também já demonstraram resistência a azóis (Howard *et al.*, 2009; Sionov *et al.*, 2010).

Numerosos mecanismos adaptativos de resistência a antifúngicos foram identificados, incluindo alteração ou superexpressão de seu alvo, regulação positiva de transportadores de múltiplos fármacos e ativação de respostas ao estresse (Shapiro *et al.*, 2011).

Um dos mecanismos mais prevalentes de resistência a azóis envolve a alteração ou superexpressão do gene alvo do fármaco, ERG11/CYP51A/CYP51B, que codifica a enzima C-14 α desmetilase, enzima-alvo desses fármacos. Quando há alterações nesse gene, os azóis perdem afinidade com a enzima alvo e ao superexpressar o gene, as células produzem mais enzimas que conseguem suprir a demanda das que foram inibidas. Há isolados resistentes de *Candida* e *Aspergillus* frequentemente tendo substituições de aminoácidos em regiões próximas ao local de ligação do heme da enzima C-14 α desmetilase (Marichal *et al.*, 1999; Balashov *et al.*, 2005). A resistência a equinocandinas é conferida principalmente por meio de substituições de aminoácidos dentro de regiões altamente conservadas das subunidades FKS da enzima beta(1,3)-glicano sintase (Park *et al.*, 2005). Essas regiões são conservadas em diferentes espécies de *Candida*, com níveis de resistência variando dependendo das mutações e do nível de expressão desses genes (Cowen *et al.*, 2015).

Um grande obstáculo na descoberta de antifúngicos é a identificação de alvos essenciais para os fungos que podem ser especificamente modulados por substâncias com baixa toxicidade ao hospedeiro. Uma estratégia promissora para expandir o espaço alvo de medicamentos é explorar a terapia combinada (Revie *et al.*, 2018). As combinações de fármacos podem ser empregadas para direcionar os próprios mecanismos de resistência, particularmente aqueles envolvidos na tolerância a fármacos. Por exemplo, a resistência aos azóis de *C. glabrata* é

frequentemente alcançada através de substituições no fator de transcrição Pdr1, resultando em regulação positiva do efluxo desses antifúngicos. Ao inibir a interação do domínio de ativação Pdr1 e do mediador Gal11A em isolados resistentes de *C. glabrata*, o composto iKIX1 pode restaurar a sensibilidade ao azol e reduzir a proliferação fúngica em modelos de infecção sistêmica em roedores (Piotrowski *et al.* 2017).

2.3 A enzima GWT1 como alvo de agentes antifúngicos

A célula fúngica é revestida por uma camada protetora externa denominada parede celular que, além de proteção, é responsável pelo formato e comunicação intercelular (Trabulsi; Alterthum, 2015, p. 545). Ela é considerada a estrutura celular mais importante devido sua composição e complexidade (Free, 2013).

As paredes celulares são fundamentais para a viabilidade e patogenicidade dos fungos. A parede determina a morfologia fúngica e fornece proteção osmótica, além de regular a troca de material com o meio externo, adesão a um substrato, penetração de um hospedeiro e comunicação entre células (Deacon, 1997, p. 55). Em geral, as paredes celulares dos fungos são compostas por polímeros lineares de β -1,4-*N*-acetilglucosamina (quitina), α -1,3-glicanos, β -1,3- e β -1,6-glicanos, e proteínas, com extensa ligação cruzada entre esses componentes, como mostrado na **Figura 1** (Adams, 2004).

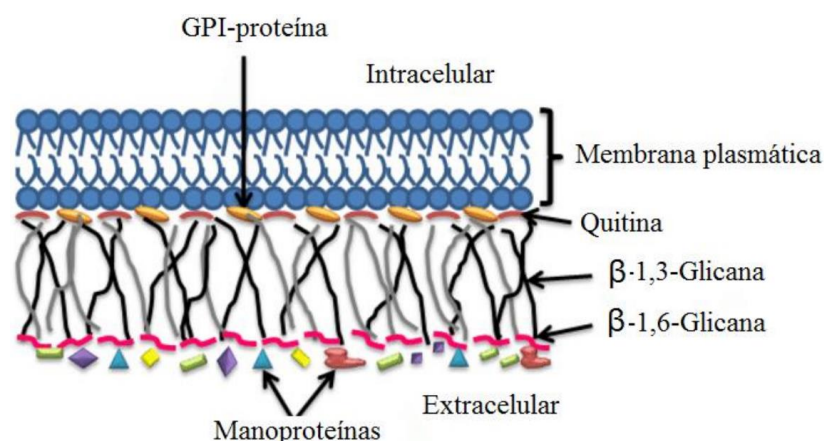


Figura 1 – Representação esquemática da parede celular fúngica
Fonte: Ferreira (2018)

Muitas proteínas da superfície celular fúngica estão ancoradas na bicamada lipídica através do glicosilfosfatidilinositol (GPI), um glicopeptídeo essencial para o crescimento celular de fungos (Umemura *et al.*, 2003). A enzima GWT1 é uma inositol aciltransferase encontrada no início da via de biossíntese de GPI, sendo responsável por transferir um grupo acila ao glicopeptídeo (Watanabe *et al.*, 2012). A biossíntese de GPI é essencial para o crescimento fúngico mas não para o crescimento de células mamíferas (Umemura *et al.*, 2003; Groot *et al.* 2013).

A estrutura do GPI é composta por $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{PO}_4\text{H}-6\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}\alpha 1-4\text{GlcN}\alpha 1-6\text{-D-mioinositol-1-HPO}_4\text{-lipídio}$ (EtNP-Man₃GlcN-PI) (**E, Figura 2**), na qual o lipídio pode ser diacilglicerol, alquilacilglicerol ou ceramida (Smith *et al.*, 2007). A biossíntese de GPI envolve a adição inicial de *N*-acetilglicosamina (NAG), oriunda da difosfato de uridina-NAG (UDP-NAG), ao fosfatidilinositol (PI) para formar o NAG-PI (**1, Figura 2**), que é então *N*-desacetilado a glicosamina-PI (NG-PI) (**2, Figura 2**) (Masterson *et al.*, 1989). O NG-PI é acrescido de um grupo acila (**3, Figura 2**), três manoses e uma etanolamina (**4, Figura 2**) para então formar o GPI (Kinoshita; Inoue, 2000). Nesse contexto, a enzima GWT1 participa desta biossíntese, atuando na etapa da acilação do inositol presente no GPI (Umemura *et al.*, 2003).

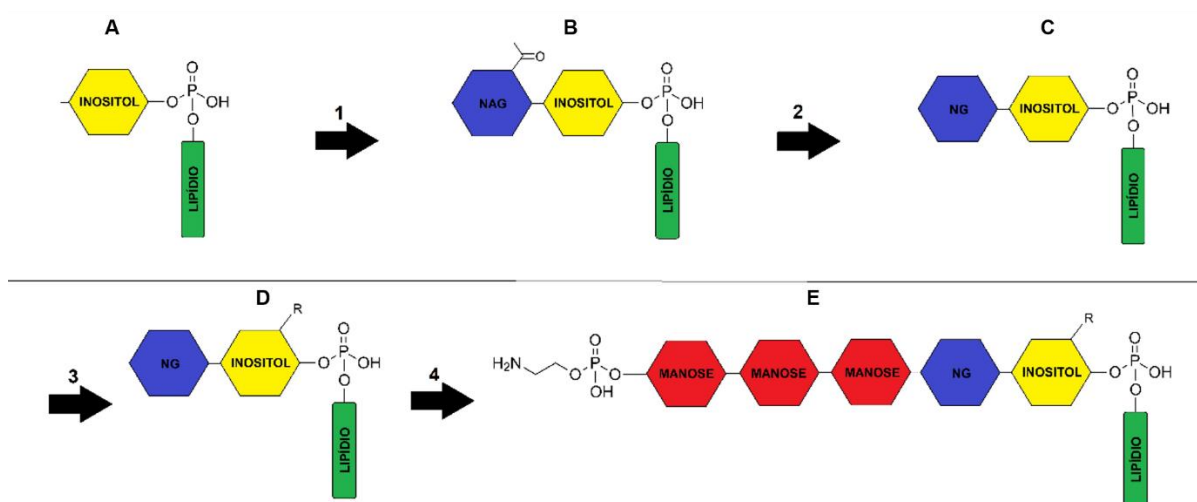


Figura 2 - Rota biossintética do GPI. NG: Glicosamina

Fonte: Elaboração própria

Foi descoberto um novo composto, 1-(4butilbenzil)isoquinolina (BIQ), que inibe a permanência de manoproteínas ancoradas por GPI na parede celular em *Saccharomyces cerevisiae*, sendo a GWT1 o alvo deste composto. Células com o

gene GWT1 deletado mostraram um defeito na montagem da parede celular e crescimento extremamente lento (Umemura *et al.*, 2003).

A inibição de GWT1 compromete a integridade da parede celular, a produção de biofilme, a formação do tubo germinativo e produz graves defeitos de crescimento fúngico (Yadav; Khan, 2018). Em *C. albicans* e *S. cerevisiae*, a inibição dessa enzima pela gepinacina mostrou um comprometimento da maturação e estabilização de manoproteínas ancoradas no GPI (McLellan *et al.*, 2012).

2.4 Modelagem e *docking* molecular

Estimativas recentes sugerem que são necessários aproximadamente 13 anos e um custo de aproximadamente US\$ 1,8 bilhão para trazer um novo medicamento ao mercado. Esse custo inclui o desenvolvimento do medicamento licenciado e também o custo dos compostos que não chegaram ao mercado. Os projetos podem falhar em todas as diferentes etapas do processo de descoberta de medicamentos e, em particular, durante os estágios posteriores de desenvolvimento (Wooller *et al.*, 2017).

Embora o investimento no desenvolvimento de novos medicamentos tenha crescido significativamente nas últimas décadas, a produção não é positivamente proporcional ao investimento devido à baixa eficiência e alta taxa de falhas na descoberta de medicamentos. Consequentemente, várias abordagens foram desenvolvidas para encurtar o ciclo de pesquisa e reduzir o custo e o risco de falha na descoberta de medicamentos. O planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD, do inglês *Computer-aided drug design*) é um dos métodos mais eficazes para atingir esses objetivos (Ou-Yang *et al.*, 2012).

As abordagens computacionais de descoberta de fármacos comumente usadas podem ser categorizadas em planejamento de fármacos baseado na estrutura (SBDD, do inglês *Structure-based drug design*), planejamento de fármacos baseado no ligante (LBDD, do inglês *Ligand-based drug design*) e abordagens baseadas em sequência. As ferramentas de abordagem baseada em sequência partem do pressuposto de que o conhecimento da sequência de aminoácidos por si só pode ser suficiente para estimar a propensão de interação de uma proteína com pequenas moléculas (Wang *et al.*, 2011).

A modelagem molecular de estruturas de proteínas pode ser realizada por homologia, que parte do princípio de que a semelhança entre as estruturas primárias de uma proteína e de proteínas homólogas de estruturas tridimensionais conhecidas (proteínas-molde) superior a 30 % implica em similaridade estrutural entre elas, ou por técnicas independentes de proteínas-molde, as quais utilizam informações físico-químicas das interações entre os aminoácidos a fim de encontrar um modelo tridimensional (Santos Filho; Alencastro, 2003).

As ferramentas do tipo LBDD, que são usadas na ausência de conhecimento das estruturas tridimensionais de alvos potenciais, incluem a relação estrutura-atividade quantitativa, modelagem de farmacóforo, análise de campo molecular e avaliação de similaridade, e podem fornecer informações cruciais sobre a natureza das interações entre alvos moleculares e ligantes, o que permite a construção de modelos preditivos adequados para descoberta e otimização de moléculas com atividade farmacológica promissora que necessita de otimização (Ou-Yang *et al.*, 2012).

Métodos do tipo SBDD, como *docking* molecular e planejamento *de novo* de fármacos, contam com o conhecimento da estrutura da macromolécula alvo, que pode ser obtida a partir de estruturas cristalográficas, dados de ressonância magnética nuclear, modelos de homologia, modelagem molecular, entre outros (Chen *et al.*, 2012). Baseiam-se nas informações derivadas da estrutura tridimensional de um alvo molecular de interesse e permitem classificar moléculas de acordo com a complementaridade estrutural e eletrônica dos ligantes a um determinado alvo (Kitchen *et al.*, 2004).

O *docking* molecular está entre um dos métodos *in silico* baseados em estrutura mais populares e bem-sucedidos, que ajudam a prever as interações que ocorrem entre moléculas e alvos biológicos (Pinzi; Rastelli, 2019). O processo de *docking* molecular envolve a predição da conformação e orientação do ligante (ou posicionamento) dentro de um sítio de ligação direcionado e determinação de suas interações intermoleculares e energia de ligação, o que pode permitir estimar a atividade inibitória de um ligante frente ao alvo de estudo (Kitchen *et al.*, 2004).

O *docking* tem início com a aplicação de algoritmos que tentam encaixar um ligante no sítio ativo do alvo. Esses algoritmos de busca são projetados para prever a atividade biológica através da avaliação de interações entre compostos e alvos potenciais. Essa avaliação é realizada com base em cálculos de formato aproximado

e complementaridade estérica, na avaliação das interações eletrostáticas e de van der Waals e inclusão de pelo menos alguns efeitos de solvatação ou entrópicos. Vale ressaltar que os eventos de ligação ao ligante são conduzidos por uma combinação de efeitos entálpicos e entrópicos, e que tanto a entropia quanto a entalpia podem influenciar interações específicas (Kitchen *et al.*, 2004).

2.5 Compostos promissores

Recentemente, alguns compostos das classes das 1,3-bisariloxipropanaminas e dos 1,3-bisariloxipropanois (**Figura 4**) apresentaram atividade antibacteriana e antiprotozoária promissora contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (Lavorato *et al.*, 2017a; Lavorato *et al.*, 2017b; Serafim *et al.*, 2019). Considerando essas propriedades biológicas, foi proposto que pudessem demonstrar também propriedades antifúngicas. Dessa forma, esses compostos foram submetidos a estudos *in vitro* de avaliação de atividade antifúngica contra fungos dermatófitos dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. schoenleinii* e *T. rubrum*) e leveduras do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) (Dalla-Lana *et al.*, 2020).

No estudo realizado por Dalla-Lana e colaboradores (2020), 18 dos 61 compostos das classes das 1,3-bisariloxipropanaminas e dos 1,3-bisariloxipropanois testados apresentaram atividade antifúngica contra os patógenos avaliados em concentrações menores ou iguais a 50 µg/mL, sendo o composto **2j** (**Figura 3**) o mais promissor, por apresentar uma melhor ação antifúngica e um perfil de segurança desejável para uso em formulações farmacêuticas. Nesse mesmo trabalho, foi demonstrado que o composto **2j** exerce sua ação antifúngica interferindo com a integridade da parede celular fúngica.

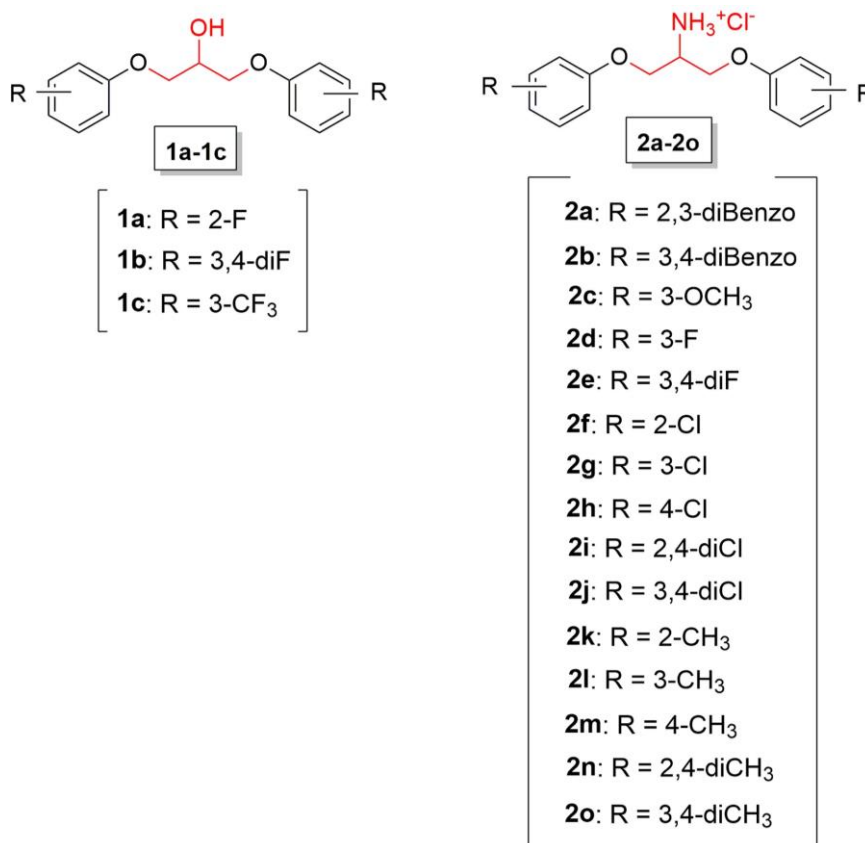


Figura 3 - Estrutura química dos compostos das classes 1,3-bisariloxipropanois (**1a-1c**) e 1,3-bisariloxipropanaminas (**2a-2o**) com atividade antifúngica *in vitro*

Fonte: Dalla-Lana e colaboradores (2020)

Apesar de apresentarem boa atividade antifúngica, ainda não é de conhecimento o alvo molecular a nível de parede celular onde esses compostos atuam. Portanto, é necessário que sejam realizados estudos para esclarecer esse fator. Uma boa opção para tentar compreender o alvo de ação é utilizando estudos de *docking* molecular, pela simulação da interação de substâncias conhecidas com seus alvos de ação propostos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar, por meio de estudos *in silico*, o potencial de inibição de compostos das classes das 1,3-bisariloxipropanaminas e dos 1,3-bisariloxipropanois com ação antifúngica frente à enzima GWT1.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a busca pelas sequências da enzima GWT1 de *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*.
- Prever os modelos tridimensionais da enzima GWT1 de *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*, por modelagem molecular.
- Realizar a análise e validação dos modelos previstos.
- Realizar simulações de *docking* molecular de dois compostos da classe das 1,3-bisariloxipropanois (**1b** e **1c**) e treze compostos da classe das 1,3-bisariloxipropanaminas (**2a**, **2b**, **2e**, **2f**, **2g**, **2h**, **2i**, **2j**, **2k**, **2l**, **2m**, **2n** e **2o**), com ação antifúngica previamente determinada, em estruturas tridimensionais previstas da enzima GWT1.
- Correlacionar e avaliar se existe uma tendência nos resultados de *docking* molecular em comparação com os resultados de atividade antifúngica obtidos em estudo *in vitro*.
- Avaliar se a enzima GWT1 pode ser o alvo molecular dos compostos com ação antifúngica das classes estudadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelagem molecular da enzima GWT1

As sequências de aminoácidos para a enzima GWT1 de *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum* foram obtidas a partir do banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/>).

Para modelagem da estrutura tridimensional de cada proteína, foram utilizados os servidores online: I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), que utiliza o método de threading; ROBETTA (<https://rosetta.bakerlab.org>), que utiliza a ferramenta RoseTTAFold, que realiza previsões por método de *deep learning*; e trRosetta (<https://yanglab.nankai.edu.cn/trRosetta/>), que também utiliza o método de *deep learning*.

Para validação dos modelos tridimensionais, foram utilizados os servidores online MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>), SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) e ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/>). Os modelos foram avaliados com relação a sua qualidade estereoquímica e, pelos gráficos de Ramachandran obtidos, foi possível avaliar os aminoácidos com relação às regiões energeticamente favoráveis e permitidas. O modelo que satisfizesse todos os parâmetros desejados após validação foi utilizado para estudos posteriores.

4.2 Previsão do sítio de ligação da enzima

Para previsão do sítio de ligação, foram comparados os resultados fornecidos pelos servidores online I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) e 3DLigandSite (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dligandsite/>) para os modelos criados.

4.3 Estudos de *docking* molecular

Para esse trabalho, foram selecionados dois compostos da classe dos 1,3-bisariloxipropanois (1b e 1c) e treze compostos da classe das 1,3-bisariloxipropanaminas (2a, 2b, 2e, 2f, 2g, 2h, 2i, 2j, 2k, 2l, 2m, 2n e 2o) (**Figura 3**),

com atividade antifúngica já determinada *in vitro*, conforme descrito na Introdução desse projeto (Dalla-Lana *et al.*, 2020), para avaliação da interação com as enzimas modeladas. Os ligantes em estudo foram desenhados e otimizados utilizando o programa BIOVIA Discovery Studio 2020 (<https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio/>). Para otimização destes compostos, foi utilizado o campo de força tipo Dreiding. O programa AutoDockTools 1.5.7 (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>) foi utilizado para a preparação das macromoléculas modeladas (adição de cargas Gasteiger, hidrogênios polares e tipo atômico AD4) bem como dos ligantes (definição de aspectos torcionais), permitindo 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/>). Para análises, foram consideradas apenas as conformações dos ligantes que geraram os complexos de menor energia. O programa BIOVIA Discovery Studio 2020 foi utilizado para análise dos resultados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sequências de aminoácidos das enzimas em estudo foram selecionadas a partir do banco de dados UniProt. Foram selecionadas as sequências “GPI-anchored wall transfer protein 1” (Código: Q873N2), que corresponde à enzima GWT1 para a espécie *Candida albicans* e possui 485 aminoácidos; e “GPI-anchored wall transfer protein” (Código: F2SWZ1) para a espécie *Trichophyton rubrum*, que contém 491 aminoácidos.

Foram utilizados os servidores BLAST e HHpred para busca de homólogos das respectivas sequências de aminoácidos na tentativa de se realizar a predição da estrutura por meio de homologia. Pelo BLAST, não foi encontrado nenhum homólogo com mais de 30% de similaridade estrutural previamente determinado para ambas as espécies do estudo. Pelo HHpred, foi encontrada apenas uma estrutura para cada espécie, que possui pouquíssima similaridade com as sequências de aminoácidos das enzimas de estudo, baixo grau de confiabilidade, pois foram encontrados escores abaixo de 21.09, que desejavelmente deveriam estar acima de 100, e *E-value* acima de 15, que desejavelmente deveriam estar abaixo de 1, além de uma cobertura de aminoácidos insuficiente (entre 96 e 101 aminoácidos, em comparação com a quantidade de aminoácidos da enzima, que está entre 485 e 491) (**Figuras 4 e 5**).

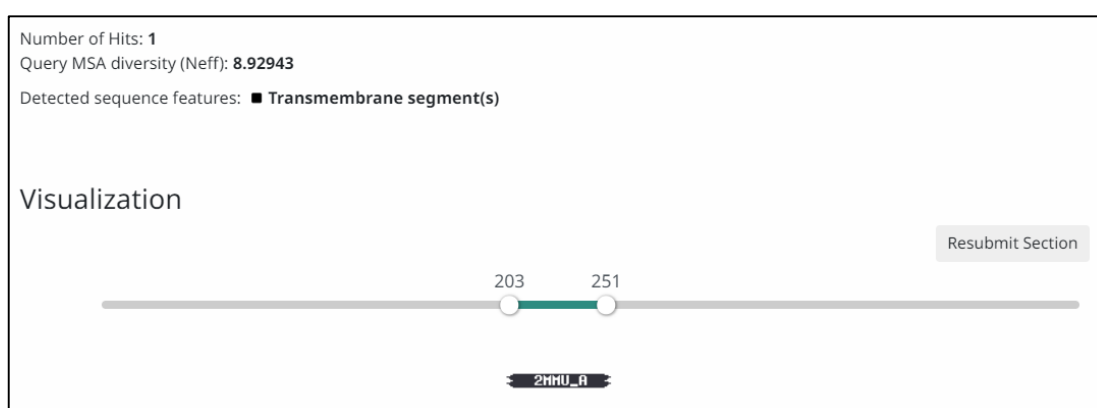


Figura 4 – Resultado da busca por homólogos para a sequência de aminoácidos de *C. albicans* pelo HHpred

Fonte: HHpred

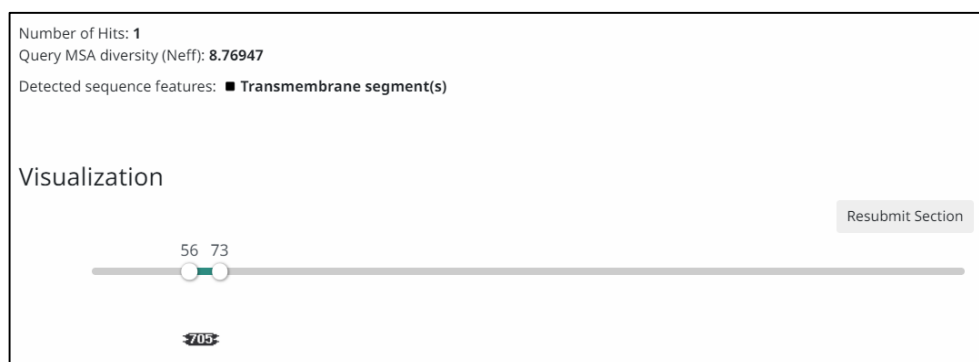


Figura 5 – Resultado da busca por homólogos para a sequência de aminoácidos de *T. rubrum* pelo HHpred

Fonte: HHpred

As sequências de aminoácidos foram então submetidas aos servidores I-Tasser, Robetta e trRosetta para a predição de estruturas. Os melhores modelos obtidos a partir desses servidores foram submetidos ao servidor do GalaxyWEB com a intenção de refinar as estruturas.

As plataformas de predição de modelos tridimensionais de proteínas descritas foram selecionadas considerando serem mais adequadas para o contexto em que se trabalha com proteínas que apresentam baixa identidade sequencial com os modelos disponíveis em bancos de dados de estruturas (Verli, 2014, p. 161), como é o caso da GWT1. O servidor I-TASSER utiliza a estratégia de modelagem por *threading*, envolvendo um alinhamento múltiplo de fragmentos seguido de simulações de agrupamento desses fragmentos para construção do modelo (Yang; Zhang, 2015). Já o servidor ROBETTA permite tanto a realização de modelagem por homologia quanto de modelagem *ab initio* com posterior comparação da conformação proposta com modelos tridimensionais já validados em bancos de dados de proteínas (Baek *et al.*, 2021). A previsão pelo servidor trRosetta, por sua vez, é baseada na minimização restrita, com restrições de distância e orientação derivadas dos produtos do servidor (Yang *et al.*, 2020).

Os servidores I-Tasser, Robetta e trRosetta forneceram cinco estruturas preditas da enzima para as duas espécies, *C. albicans* e *T. rubrum*. Para decidir qual modelo apresentava melhor predição, eles foram submetidos aos servidores Molprobit, SAVES e ProSA-web para serem validados (**Quadros 1 e 2**). Para critério de validação, foram avaliadas a porcentagem de resíduos de aminoácidos presentes em regiões favoráveis, sendo que quanto maior a porcentagem, melhor a

qualidade, e a porcentagem de resíduos em regiões desfavoráveis no gráfico de Ramachandran fornecidos pelo Molprobit e pelo Procheck, sendo que quanto menor a porcentagem, melhor a qualidade. Também foi levado em consideração se resíduos em regiões desfavoráveis estavam próximos ao sítio ativo da enzima. O Z-score fornecido pelo programa ProSA-web foi um critério secundário para validação do modelo, sendo que quanto maior o valor, maior a confiabilidade do modelo. Para *C. albicans*, o melhor modelo obtido a partir do I-Tasser obteve Z-score de -2,62 e o obtido a partir do trRosetta obteve -5,18; e para *T. rubrum*, o melhor modelo obtido a partir do I-Tasser obteve Z-score de -1,14 e o obtido a partir do trRosetta obteve -7,13. Por algum motivo desconhecido, o ProSA-web não conseguiu determinar o Z-score dos modelos previstos pelo Robetta.

Quadro 1 – Porcentagem (%) de resíduos em cada região do gráfico de Ramachandran gerado pelo Molprobit e SAVES para os modelos de *Candida albicans* previstos pelo I-Tasser, Robetta e trRosetta

Modelo	Molprobit			Procheck (SAVES)			
	Mais favorável	Permitida	Não permitida	Mais favorável	Permitida	Gen. permitida	Não permitida
I-Tas 1	87,2	96,5	4,5	83,4	11,9	2,5	2,2
I-Tas 2	72	87,4	12,6	74,4	16,6	5,4	3,6
I-Tas 3	85,7	94,4	5,6	80,4	11,7	4,5	3,4
I-Tas 4	78,7	93,8	6,2	76,2	18,4	2,5	2,9
I-Tas 5	73,3	89,6	10,4	71,2	21,3	5,2	2,2
Robe 1	94	98,8	1,2	90	7,2	0,9	1,8
Robe 2	93,4	98,6	1,4	88,5	8,1	1,6	1,8
Robe 3	92,6	99	1	87,2	10,3	0,7	1,8
Robe 4	92,5	99,6	0,4	90,1	8,5	0,9	0,4
Robe 5	91,9	99,4	0,6	90,1	7,4	1,1	1,3
trRos 1	96,3	99,4	0,6	92,4	6,3	0,4	0,9
trRos 2	96,9	99,8	0,2	92,1	7	0,4	0,4
trRos 3	95	99	1	91,9	6,7	0,2	1,1
trRos 4	95,4	98,8	1,2	91,5	7,2	0,2	1,1
trRos 5	95,9	98,6	1,4	89,9	7,4	0,9	1,8

Fonte: Elaboração própria

Quadro 2 – Porcentagem (%) de resíduos em cada região do gráfico de Ramachandran gerado pelo Molprobit e SAVES para os modelos de *Trichophyton rubrum* previstos pelo I-Tasser, Robetta e trRosetta

Modelo	Molprobit			Procheck (SAVES)			
	Mais favorável	Permitida	Não permitida	Mais favorável	Permitida	Gen. permitida	Não permitida
I-Tas 1	78,3	90,8	9,2	73,7	20,8	2,5	3
I-Tas 2	83,6	93,5	6,5	82,4	13,9	2,3	1,4
I-Tas 3	75,1	89,6	10,4	77,2	16	4,8	2,1
I-Tas 4	76,7	90,4	9,6	74,4	19,4	4,6	1,6
I-Tas 5	68,7	87,3	12,7	67,1	23,1	6,6	3,2
Robe 1	96,9	99,2	0,8	94,1	5	0,2	0,7
Robe 2	92	98,6	1,4	86,3	9,8	1,6	2,3
Robe 3	96,1	99	1	90,4	8	0,9	0,7
Robe 4	95,7	99	1	88,1	10,5	0,5	0,9
Robe 5	95,1	99	1	89,3	8,4	0,9	1,4
trRos 1	97,8	99,8	0,2	93,2	5,7	0,9	0,2
trRos 2	96,1	99,4	0,6	90,2	9,4	0	0,5
trRos 3	95,1	99,4	0,6	89,7	8,4	1,4	0,5
trRos 4	95,5	98,8	1,2	90	8,4	0,9	0,7
trRos 5	94,7	98,2	1,8	90,4	7,8	1,4	0,5

Fonte: Elaboração própria

De modo geral, os resultados da validação para os modelos obtidos a partir do I-Tasser indicam uma qualidade baixa, enquanto os modelos obtidos a partir do Robetta e pelo trRosetta mostraram bons resultados. O melhor modelo para a enzima de *C. albicans* foi o modelo 1 previsto pelo servidor Robetta e o melhor modelo para a enzima de *T. rubrum* foi o modelo 1 previsto pelo servidor trRosetta, cada um com quase 100% de resíduos em regiões permitidas. O melhor modelo para a enzima de *C. albicans* apresentou 99,1% de resíduos em regiões permitidas ou favoráveis e o melhor modelo para a enzima de *T. rubrum* apresentou 99,8% de resíduos em regiões permitidas ou favoráveis.

Para obter uma confiabilidade ainda maior nos modelos construídos no presente trabalho, foi realizada uma comparação destes com os modelos previamente modelados utilizando o servidor AlphaFold que haviam disponíveis no banco de dados do Uniprot. O valor do RMSD entre o modelo previsto pelo AlphaFold de *C. albicans* e o modelo previsto pelo Robetta para a mesma espécie foi de 1,190. Já para a espécie *T. rubrum* esse valor foi de 0,820. Vale ressaltar que esse valor indica que as estruturas são bastante parecidas, já que quanto menor o valor do RMSD, menor a divergência entre os modelos. Além disso, analisando-se dados de

validação do modelo previsto pelo Alphafold, observou-se que este possui valores de validação inferiores aos modelos obtidos nesse trabalho.

Os resíduos de aminoácidos essenciais para o funcionamento correto da enzima foram obtidos a partir de uma compilação de resíduos extraídos de artigos científicos. Kapoor e colaboradores (2019) apontaram como essenciais os aminoácidos Asp-139, Lys-149 e Val-162 da enzima de *C. albicans* e Asp-155, Lys-165 e Val-178 para *T. rubrum*. Morais e colaboradores (2021) apontaram os resíduos Thr-131, Ile-135, Met-158, Val-162, His-225, Glu-228, Phe-235 e Phe-434 para *C. albicans* e Thr-147, Ile-151, Met-174, Val-178, His-238, Glu-241, Phe-248 e Phe-440 para *T. rubrum*. Fenollar e colaboradores (2022) indicaram os resíduos Thr-131, Lys-149 e Phe-434 para *C. albicans* e Thr-147, Asp-165 e Phe-440 para *T. rubrum*. Todos esses aminoácidos considerados relevantes como alvo de inibição da enzima foram base para a construção das *GridBoxes*, regiões contendo as coordenadas requeridas para a execução do *docking* molecular.

Em testes de *docking* molecular com os inibidores já descritos da enzima GWT1 manogepix e a 1-(4-butilbenzil)isoquinolina (BIQ) (**Figura 6**), foi possível perceber que os mesmos foram capazes de interagir de modo significativo com a enzima. O complexo entre GWT1 e manogepix apresentou uma energia de ligação de -10,0 kcal/mol para *C. albicans* e -7,4 kcal/mol para *T. rubrum*, enquanto o complexo com BIQ apresentou uma energia de ligação de -8,3 kcal/mol para *C. albicans* e -8,9 kcal/mol para *T. rubrum*. Portanto, esses resultados fornecem maior segurança de que as condições de *docking* estabelecidas são válidas para seguir com os estudos de *docking* com as classes químicas em estudo.

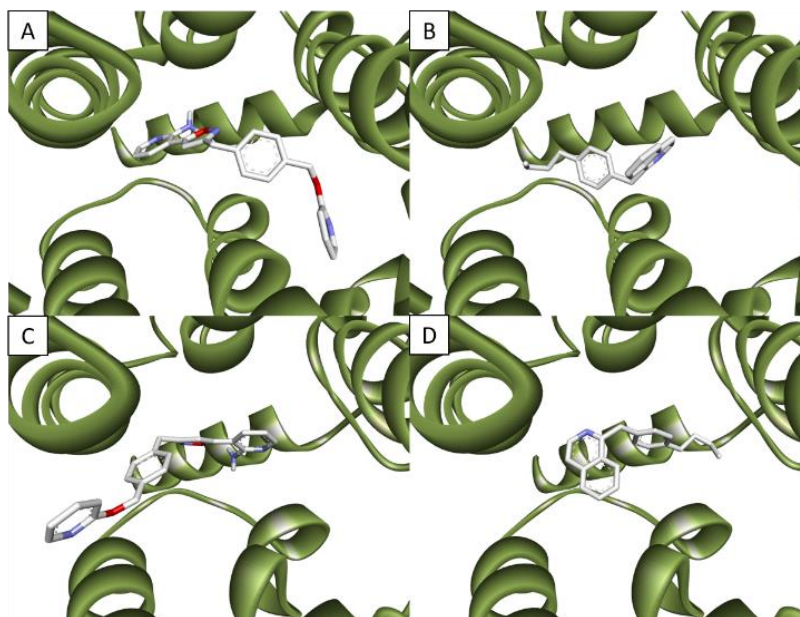


Figura 6 – Resultados de *docking* molecular entre os ligantes manogepix e a BIQ e o sítio ativo da GWT1 de *C. albicans* (**A** e **B**, respectivamente) e *T. rubrum* (**C** e **D**, respectivamente). O sítio ativo da GWT1 é representado como fitas verdes. O código de cores para os átomos é branco para carbono, azul para nitrogênio e vermelho para oxigênio.

Fonte: Elaboração própria

Ao realizar o estudo de *docking* molecular da GWT1 com os compostos da classe dos 1,3-bisariloxipropanois (**1b** e **1c**) e os compostos da classe das 1,3-bisariloxipropanaminas (**2a**, **2b**, **2e**, **2f**, **2g**, **2h**, **2i**, **2j**, **2k**, **2l**, **2m**, **2n** e **2o**), foi possível perceber diversas interações importantes com a enzima. Os principais resultados são mostrados nos **Quadros 3 e 4**. Os valores de energia de ligação variaram entre -8,4 kcal/mol (composto **1b**) e -6,7 kcal/mol (compostos **2k** e **2m**) para *C. albicans* e entre -9,4 kcal/mol (composto **2b**) e -7,2 kcal/mol (compostos **2f** e **2g**) para *T. rubrum*.

Quadro 3 – Resultados de *docking* molecular dos compostos das classes dos 1,3-bisariloxipropanois e das 1,3-bisariloxipropanaminas no sítio ativo da GWT1 de *C. albicans*.

Composto	Energia de Ligação (kcal/mol)	Interações entre o composto e a enzima					
		Ligação de hidrogênio	Ligação iônica	Empilhamento π	Ânion π	π -Alquil	Ligação de Halogênio
1b	-8,4	O-H:GLU228, C-O:HIS232, F:ASN445	-	-	Ph:GLU224	Ph:ILE135, Ph:VAL217	F:MET158, F:TYR222
1c	-8,3	O-H:GLU228, F:PHE235, F:ARG385	-	-	-	Ph:MET158, Ph-C:PHE235	F:GLU151, F:THR227, F:ILE231
2a	-8,3	-	NH+:GLU151, NH+:ASP159	-	Ph:GLU228	Ph:ILE135, Ph:VAL162	-
2b	-8,0	-	NH+:GLU151, NH+:ASP159	-	Ph:GLU228	Ph:ILE135, Ph:ILE231	-
2e	-8,2	F:HIS232, F:THR238, F:ASN438	NH+:ASP159	Ph:TYR306	-	Ph:ILE135, Ph:VAL162	F:ASN234, F:ASN438
2f	-7,7	C-O:HIS232, C-O:HIS232	-	-	Ph:GLU228	Ph:VAL217	-
2g	-7,8	-	NH+:ASP159	Ph:TYR306	-	Ph:VAL162	-
2h	-7,5	-	NH+:ASP159	Ph:HIS232	-	Ph:ILE135, Ph:VAL162, Ph:PHE231	-
2i	-7,8	-	NH+:GLU151, NH+:ASP159	Ph:PHE235	Ph:GLU228	-	-
2j	-7,4	-	NH+:ASP159	-	Ph:GLU228	Ph:ILE135	Cl:MET158
2k	-6,7	-	NH+:GLU151, NH+:ASP159	Ph:PHE235	Ph:GLU228	Ph:ILE135	-
2l	-8,1	-	NH+:ASP159	Ph:TYR306	-	Ph-C:PHE235, Ph-C:TYR306	-
2m	-6,7	-	NH+:GLU151, NH+:ASP159	-	-	Ph:VAL162	-
2n	-7,5	-	NH+:GLU151, NH+:ASP159	Ph:PHE235	Ph:GLU228	Ph:ILE135	-
2o	-7,2	-	NH+:GLU151, NH+:ASP159	-	-	Ph:PHE235	-

Fonte: Elaboração própria

Quadro 4 – Resultados de *docking* molecular dos compostos das classes dos 1,3-bisariloxipropanois e das 1,3-bisariloxipropanaminas no sítio ativo da GWT1 de *T. rubrum*.

Composto	Energia de Ligação (kcal/mol)	Interações entre o composto e a enzima					
		Ligação de hidrogênio	Ligação Iônica	Empilhamento π	Ânion π	π -Alquil	Ligação de Halogênio
1b	-8,0	<u>E</u> :ARG226	-	-	-	Ph:VAL230	<u>E</u> :ASN444, <u>E</u> :ASN444
1c	-8,4	C- <u>O</u> :ARG226	-	Ph:TYR242	Ph:ASP155	Ph:VAL154, Ph:VAL154, Ph-C:TYR242	<u>E</u> :TYR235, <u>E</u> :TYR235, <u>E</u> :TYR236, <u>E</u> :TYR236, <u>E</u> :TYR237
2a	-8,6	N- <u>H</u> :TYR235, N- <u>H</u> :ASN451, C- <u>O</u> :ASN451	<u>NH</u> +:ASP155	-	-	Ph:VAL13, Ph:VAL154	-
2b	-9,4	N- <u>H</u> :ASN451	<u>NH</u> +:ASP155	Ph:TYR142, Ph:TYR142	-	Ph:VAL230, Ph:VAL230	-
2e	-8,1	<u>E</u> :ARG226, N- <u>H</u> :TYR235, N- <u>H</u> :ALA236, N- <u>H</u> :ALA236	-	-	-	Ph:VAL230	<u>E</u> :ASN444, <u>E</u> :ASN444,
2f	-7,2	N- <u>H</u> :TYR235, N- <u>H</u> :ALA236, N- <u>H</u> :ALA236, C- <u>O</u> :ASN451	-	Ph:TYR242	-	Ph:VAL230	-
2g	-7,2	N- <u>H</u> :TYR235, N- <u>H</u> :ALA236	-	-	-	Ph:VAL230	-
2h	-7,4	N- <u>H</u> :TYR235, C- <u>O</u> :ASN451	<u>NH</u> +:ASP155	-	-	Ph:VAL230	-
2i	-7,4	N- <u>H</u> :ASN444	-	-	-	Ph:ILE151, Ph:VAL154	-
2j	-7,4	N- <u>H</u> :TYR235, N- <u>H</u> :ALA236, C- <u>O</u> :ASN451	-	Ph:TYR242	-	-	-
2k	-7,4	N- <u>H</u> :TYR235, N- <u>H</u> :ALA236, C- <u>O</u> :ASN451	-	Ph:TYR242	-	Ph:VAL230	-
2l	-7,5	N- <u>H</u> :TYR235, N- <u>H</u> :ALA236	-	-	-	Ph:VAL230	-
2m	-7,7	N- <u>H</u> :TYR235, C- <u>O</u> :ASN451	<u>NH</u> +:ASP155	-	-	Ph:VAL230	-
2n	-7,8	N- <u>H</u> :ASN444	-	-	-	Ph:ILE151, Ph:VAL154	-
2o	-7,9	N- <u>H</u> :TYR235, N- <u>H</u> :TYR235, N- <u>H</u> :ALA236, N- <u>H</u> :ALA236	-	Ph:TYR242	-	-	-

Fonte: Elaboração própria

Considerando as conformações assumidas pelos ligantes no sítio ativo da enzima de *C. albicans*, foram encontrados três padrões de interação diferentes (**Figura 7**). O padrão de interação apresentado pelos compostos **1b**, **1c** e **2f** foi chamado de “padrão 1”. O padrão de interação apresentado pelos compostos **2e**, **2g**, **2h** e **2l** foi chamado de “padrão 2”. O padrão de interação apresentado pelos compostos **2a**, **2b**, **2i**, **2j**, **2k**, **2m**, **2n** e **2o** foi chamado de “padrão 3”.

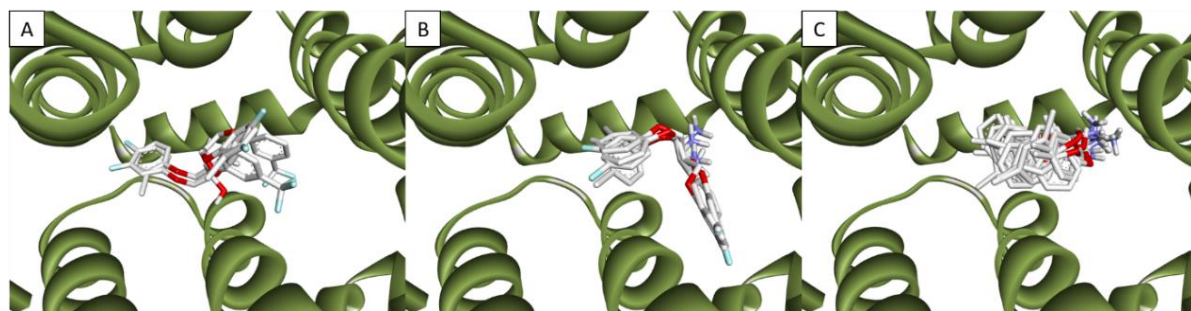


Figura 7 – Poses observadas nos estudos de *docking* molecular para os complexos mais estáveis formados a partir de compostos das classes 1,3-bisariloxipropanois e 1,3-bisariloxipropanaminas com o sítio ativo da GWT1 de *C. albicans*. **(A)** Interação dos compostos **1b**, **1c** e **2f**. **(B)** Interação dos compostos **2e**, **2g**, **2h** e **2l**. **(C)** Interação dos compostos **2a**, **2b**, **2i**, **2j**, **2k**, **2m**, **2n** e **2o**. O sítio ativo da GWT1 é representado como fitas verdes. O código de cores para os átomos é branco para carbono, ciano para flúor, azul para nitrogênio e vermelho para oxigênio.

Fonte: Elaboração própria

Os compostos com o padrão 1 de interação com o sítio ativo da enzima (**Figura 8**) tiveram como principal característica uma ligação de hidrogênio entre o grupo álcool dos compostos e a carbonila do resíduo Glu228, outra ligação de hidrogênio entre o grupo éter dos compostos e ao grupo imidazol do resíduo His232, além de uma interação π -alquil entre o anel aromático dos compostos e a cadeia carbônica da Val217 e um empilhamento T entre os anéis aromáticos dos compostos e o anéis aromáticos da Phe235. O composto **1b** também apresentou ligações de halogênio entre os grupos fluoretos e as carbonilas dos resíduos Met158 e Tyr222, uma ligação de hidrogênio com a Asn445 e outras interações de Van der Waals.

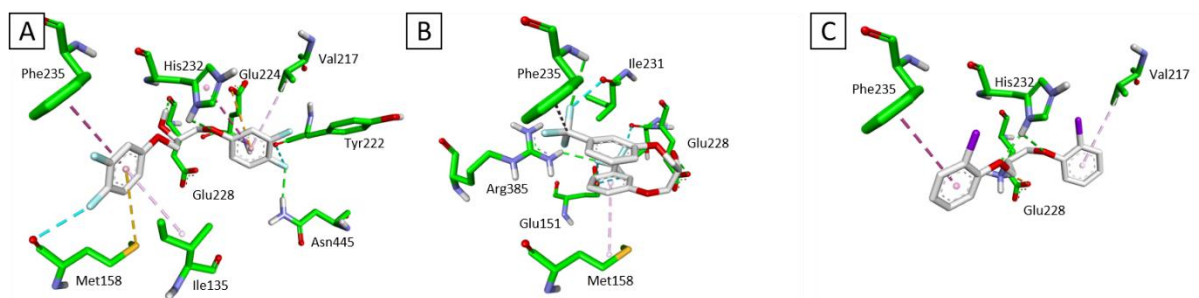


Figura 8 – Interação de 1b (A), 1c (B) e 2f (C) (padrão 1) com o sítio ativo da GWT1. O código de cores para os átomos é branco para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio, amarelo para enxofre, roxo para cloro e ciano para flúor. As cadeias carbônicas dos resíduos de aminoácidos, presentes no sítio ativo, estão representadas em verde. As interações são representadas por linhas listradas com o seguinte código de cores: verde para ligação de hidrogênio, ciano para ligação de halogênio, laranja para interação ânion π , rosa escuro para empilhamento T e rosa claro para interação π -alquil.

Fonte: Elaboração própria

Os compostos com o padrão 2 de interação com o sítio ativo da enzima (**Figura 9**) tiveram como principais características uma ligação iônica entre o grupo amino dos compostos e o grupo carboxilato do resíduo Asp159, uma interação do tipo empilhamento π entre um de seus anéis aromáticos e o anel aromático do resíduo Tyr306 e uma interação π -alquil com o resíduo Val162. Além disso, o composto **2e** realizou duas ligações de halogênio com os resíduos Asn234 e Asn438 e três ligações de hidrogênio com os resíduos His232, Thr238 e Asn438. O composto **2h** realizou sete ligações π -alquil com os resíduos Ile135, Val162, Ile231, Phe235, Phe236, Tyr306 e Phe434.

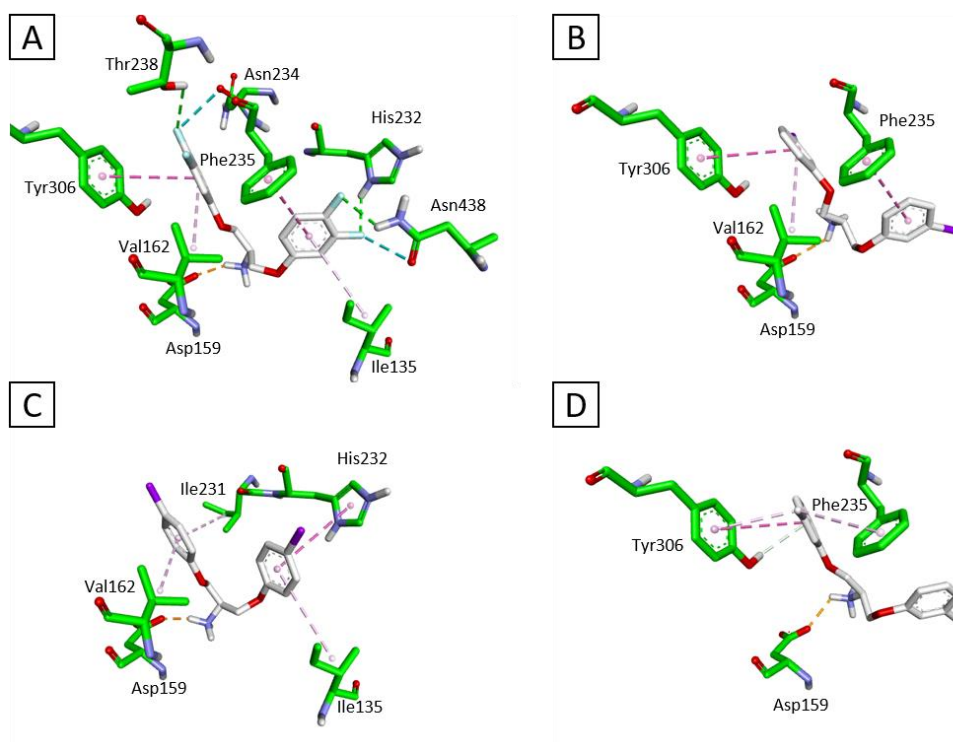


Figura 9 – Interação de 2e (A), 2g (B), 2h (C) e 2l (D) (padrão 2) com o sítio ativo da GWT1. O código de cores para os átomos é branco para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio, amarelo para enxofre, roxo para cloro e ciano para flúor. As cadeias carbônicas dos resíduos de aminoácidos, presentes no sítio ativo, estão representadas em verde. As interações são representadas por linhas listradas com o seguinte código de cores: verde para ligação de hidrogênio, ciano para ligação de halogênio, laranja para interação ânion π ou ligação iônica, rosa escuro para empilhamentos π e T e rosa claro para interação π -alquil.

Fonte: Elaboração própria

Os compostos com o padrão 3 de interação com o sítio ativo da enzima (**Figura 10**) tiveram como principais características duas ligações iônicas entre o grupo amino dos compostos e os grupos carboxilatos dos resíduos Glu151 e Asp159, uma interação ânion π entre os anéis aromáticos dos compostos e o grupo ácido carboxílico do resíduo Glu228 e uma interação π -alquil entre o anel aromático e a cadeia carbônica do resíduo Ile135. Além disso, os compostos **2i** e **2j** realizaram no total 4 e 5 interações do tipo π -alquil, respectivamente, sendo os resíduos Ile135, His232, Phe235, Phe236 e Phe434 responsáveis por essas interações.

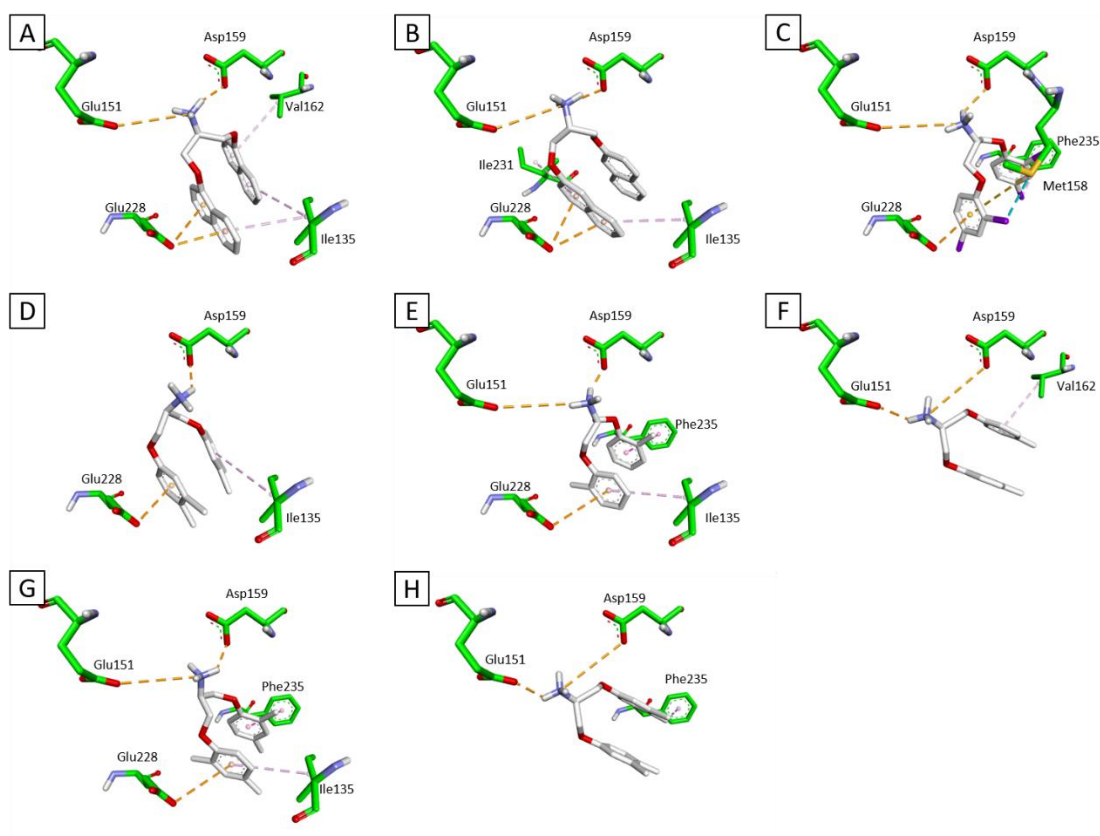


Figura 10 – Interação de 2a (A), 2b (B), 2i (C), 2j (D), 2k (E), 2m (F), 2n (G) e 2o (H) (padrão 3) com o sítio ativo da GWT1. O código de cores para os átomos é branco para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio, amarelo para enxofre, roxo para cloro e ciano para flúor. As cadeias carbônicas dos resíduos de aminoácidos, presentes no sítio ativo, estão representadas em verde. As interações são representadas por linhas listradas com o seguinte código de cores: verde para ligação de hidrogênio, ciano para ligação de halogênio, laranja para interação ânion π ou ligação iônica, rosa escuro para empilhamentos π ou T e rosa claro para interação π -alquil.

Fonte: Elaboração própria

Considerando as conformações assumidas pelos ligantes no sítio ativo da enzima de *T. rubrum*, foram encontrados três padrões de interação diferentes (Figura 11). O padrão de interação apresentado pelos compostos **1b**, **2a**, **2b**, **2e**, **2f**, **2g**, **2h**, **2j**, **2k**, **2l**, **2m** e **2o** foi chamado de “padrão 1”. O padrão de interação apresentado pelo composto **1c** foi chamado de “padrão 2”. O padrão de interação apresentado pelos compostos **2i** e **2n** foi chamado de “padrão 3”.

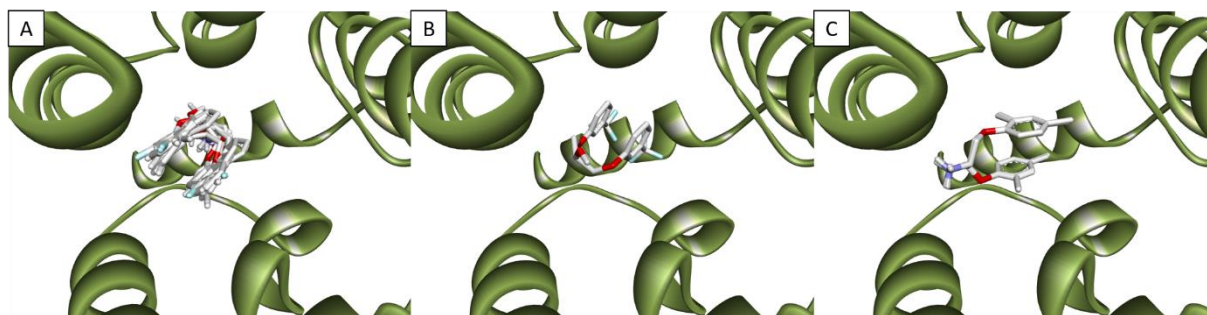


Figura 11 – Poses observadas nos estudos de *docking* molecular para os complexos mais estáveis formados a partir de compostos das classes 1,3-bisariloxipropanois e 1,3-bisariloxipropanaminas com o sítio ativo da GWT1 de *T. rubrum*. **(A)** Interações dos compostos 1b, 2a, 2b, 2e, 2f, 2g, 2h, 2j, 2k, 2l, 2m e 2o. **(B)** Interações do composto 1c. **(C)** Interações dos compostos 2i e 2n. O sítio ativo da GWT1 é representado como fitas verdes. O código de cores para os átomos é branco para carbono, ciano para flúor, azul para nitrogênio e vermelho para oxigênio.

Fonte: Elaboração própria

Os compostos com o padrão 1 de interação com o sítio ativo da enzima (**Figura 12**) tiveram como principais características ligações de hidrogênio entre os grupos álcoois ou aminos dos compostos e os resíduos Tyr235, Ala236 e Asn451, sendo que este último resíduo realizou ligação de hidrogênio entre o grupo éter de alguns compostos (**2a**, **2f**, **2h**, **2j**, **2k** e **2m**) ao invés de interagir com o grupo central. Além disso, nove desses compostos apresentaram interações π -alquil com o resíduo Val230. Os compostos **1b** e **2e** ainda realizaram duas ligações de halogênio com o resíduo Asn444 e uma ligação de hidrogênio com o resíduo Arg226.

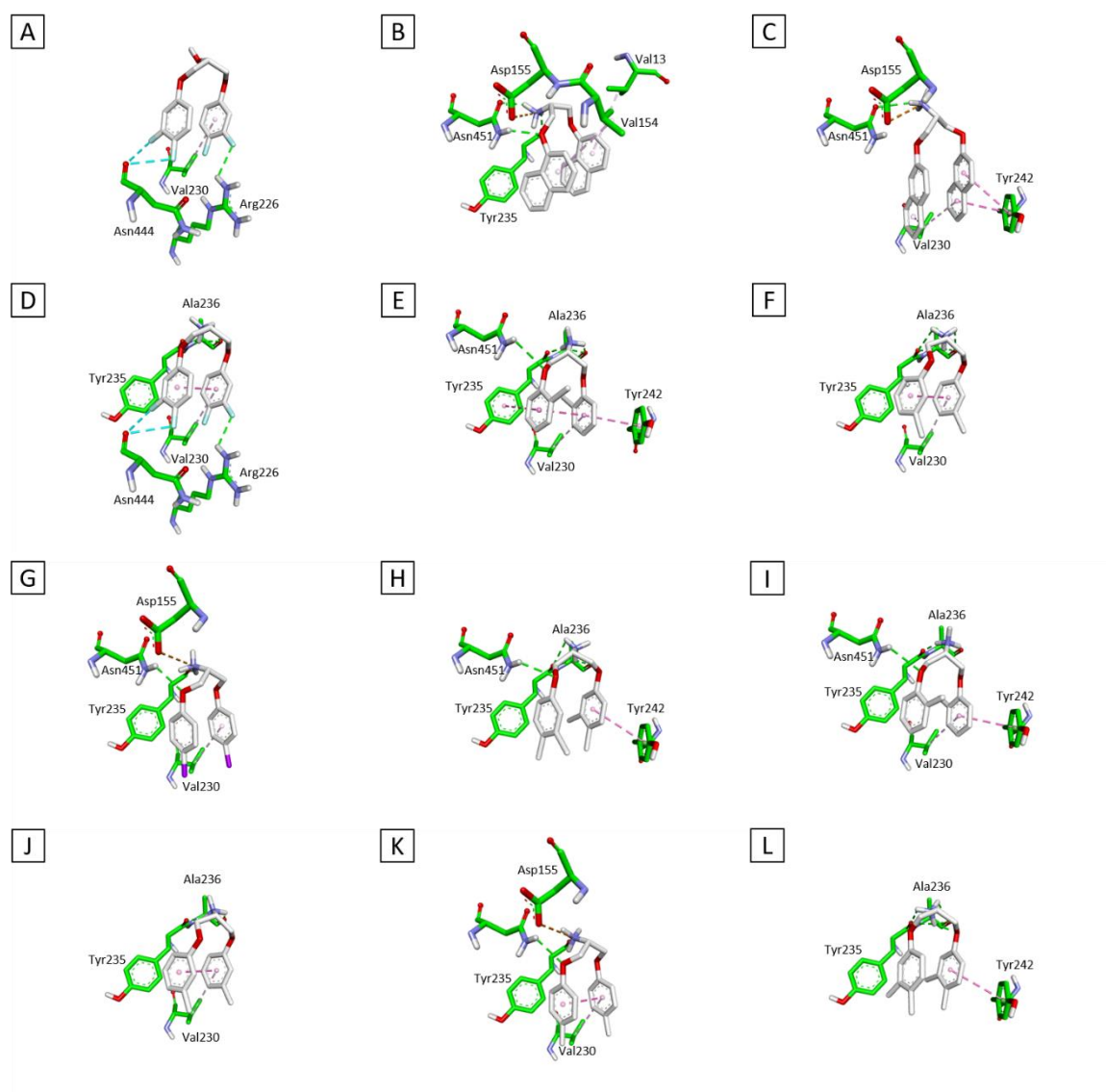


Figura 12 – Interação de 1b (A), 2a (B), 2b (C), 2e (D), 2f (E), 2g (F), 2h (G), 2j (H), 2k (I), 2l (J), 2m (K) e 2o (L) (padrão 1) com o sítio ativo da GWT1. O código de cores para os átomos é branco para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio, amarelo para enxofre e ciano para flúor. As cadeias carbônicas dos resíduos de aminoácidos, presentes no sítio ativo, estão representadas em verde. As interações são representadas por linhas listradas com o seguinte código de cores: verde para ligação de hidrogênio, ciano para ligação de halogênio, laranja para interação ânion π ou ligação iônica, rosa escuro para empilhamentos π ou T e rosa claro para interação π -alquil.

Fonte: Elaboração própria

O composto com o padrão 2 de interação com o sítio ativo da enzima (**Figura 13**), o composto **1c**, teve como principais características uma ligação de hidrogênio

entre o grupo éter e o resíduo Arg226 e seis ligações de halogênio distribuídas entre os resíduos Tyr235, Ala236, Glu237 e Asn451. Além disso, os anéis aromáticos do composto **1c** realizaram interações do tipo ânion π com o resíduo Asp155, empilhamento π com o resíduo Tyr242 e π -alquil com o resíduo Val154.

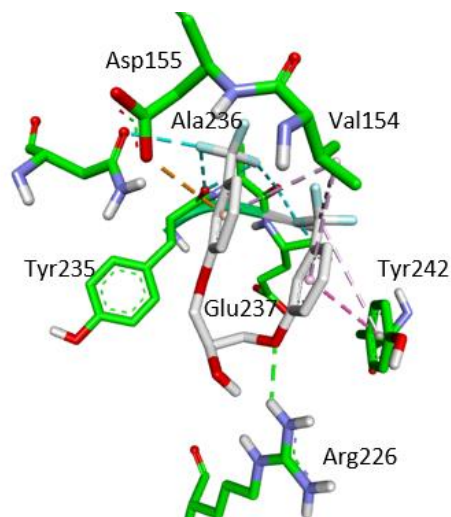


Figura 13 – Interação de **1c** (padrão 2) com o sítio ativo da GWT1. O código de cores para os átomos é branco para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio, amarelo para enxofre e ciano para flúor. As cadeias carbônicas dos resíduos de aminoácidos, presentes no sítio ativo, estão representadas em verde. As interações são representadas por linhas listradas com o seguinte código de cores: verde para ligação de hidrogênio, ciano para ligação de halogênio, laranja para interação ânion π ou ligação iônica, rosa escuro para empilhamentos π e T e rosa claro para interação π -alquil.

Fonte: Elaboração própria

Os compostos com o padrão 3 de interação com o sítio ativo da enzima (**Figura 14**) tiveram como principais características uma ligação de hidrogênio entre o grupo amino dos compostos e o resíduo Asn444 e duas interações π -alquil entre o anel aromático e os resíduos Ile151 e Val154. O composto **2i** ainda realizou mais uma interação π -alquil com o resíduo Tyr242.

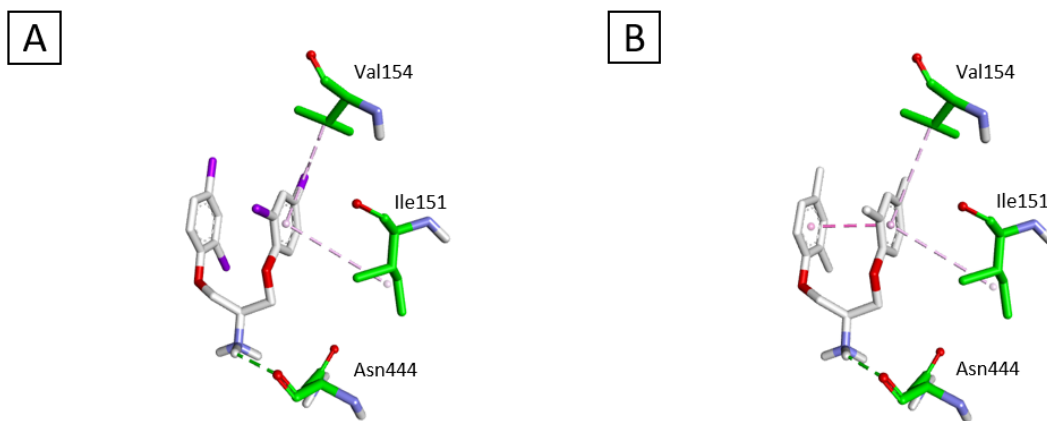


Figura 14 – Interação de 2i (A), 2n (B) (padrão 3) com o sítio ativo da GWT1. O código de cores para os átomos é branco para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio, amarelo para enxofre e ciano para flúor. As cadeias carbônicas dos resíduos de aminoácidos, presentes no sítio ativo, estão representadas em verde. As interações são representadas por linhas listradas com o seguinte código de cores: verde para ligação de hidrogênio, ciano para ligação de halogênio, laranja para interação ânion π ou ligação iônica, rosa escuro para empilhamentos π e T e rosa claro para interação π -alquil.

Fonte: Elaboração própria

Vale ressaltar que, apesar de não sinalizado pelo programa de análise, é possível que os compostos contendo átomos de cloro em sua estrutura também realizem ligações de halogênio, da mesma forma que observado para os compostos que possuem átomos de flúor, considerando as posições similares.

Os complexos formados pelos compostos alcoólicos apresentaram menores valores de energia de ligação quando comparados com aqueles que possuem grupamento amina. Esse efeito foi absoluto quando avaliado para a GWT1 da espécie *C. albicans*. Já para *T. rubrum*, esses mesmos compostos alcoólicos formaram complexos com energias de ligação inferiores comparados com 77% dos compostos contendo amina em sua estrutura.

Os compostos **2a** e **2b**, que possuem como cadeia lateral o grupo naftila, geraram complexos com os menores valores de energia de ligação quando avaliados com a GWT1 da espécie *T. rubrum*, levantando a hipótese de que esse sistema bicíclico pode ser importante para a interação dos compostos com a enzima.

Compostos com átomos de flúor em sua estrutura (**1b**, **1c**, **2e**) apresentaram as menores energia de ligação ao formarem complexos com a GWT1 da espécie *C. albicans*. Para a enzima da espécie *T. rubrum*, estes compostos formam complexos com energias de ligação mais altas, quando comparados aos complexos dos compostos com sistemas bicíclicos em sua estrutura (**2a** e **2b**).

Quando avaliados para a GWT1 de *T. rubrum*, compostos com substituintes metila em sua estrutura formaram complexos com menores valores de energia de ligação comparados aos compostos com substituintes cloro.

Quando esses resultados são comparados com os resultados do estudo *in vitro* realizado por Dalla-Lana e colaboradores (2020), observa-se algumas diferenças entre os grupos químicos que demonstram ser importantes para a inibição da enzima. No estudo *in vitro*, os compostos alcoólicos, que apresentaram complexos com as menores energias de ligação para *C. albicans* no estudo de *docking*, não mostraram atividade antifúngica significativa contra esta espécie. O substituinte cloro nos compostos foi considerado importante para a atividade antifúngica no estudo *in vitro*, mas não promoveu melhora da energia de ligação nos estudos deste trabalho. Em contrapartida, o substituinte flúor, considerado crucial para a atividade antifúngica no estudo *in vitro*, também apresentou moderada importância no *docking* molecular. De modo geral, não houve uma tendência ao correlacionar os resultados do *docking* molecular com os resultados obtidos a partir do estudo *in vitro*. Porém, considerando que outros fatores, como propriedades físico-químicas dos compostos, também interferem em estudos celulares, só estudos de inibição *in vitro* contra a enzima poderiam realmente excluir a participação desses compostos na inibição do alvo em questão.

De modo geral, os complexos de menor energia de ligação envolvendo a GWT1 da espécie *C. albicans* foram obtidos com os compostos **1b**, **1c**, **2a**, **2e** e **2l**, que obtiveram os valores de -8,4, -8,3, -8,3, -8,2 e -8,1 kcal/mol, respectivamente. Já quando testados com a enzima da espécie *T. rubrum*, os menores valores de energia de ligação pertenceram aos complexos envolvendo os compostos **2b**, **2a**, **1c**, **2e** e **1b**, com valores de -9,4, -8,6, -8,4, -8,1 e -8,0 kcal/mol, respectivamente.

Além disso, todos os compostos realizaram interações intermoleculares com dois a quatro resíduos importantes para a atividade da enzima, indicados pela literatura, para *C. albicans*, sendo eles Ile135, Met158, Asp159, Val162, Glu228 ou

Phe235 (**1c**, **2a**, **2e**, **2i**, **2k** e **2n** com quatro resíduos; **1b**, **2b**, **2g**, **2h**, **2j**, com três; e **2f**, **2l**, **2m** e **2o** com dois). As interações foram do tipo ligação de hidrogênio com o resíduo Glu228, ligação iônica com o resíduo Asp159, empilhamento T com o resíduo Phe235, π -alquil com os resíduos Ile135 e Val162 e ligação de halogênio com o resíduo Met158, sendo todas estas consideradas interações fortes ou relevantes para a interação do composto com a enzima. Já para *T. rubrum*, nove compostos (**1b**, **1c**, **2a**, **2b**, **2e**, **2h**, **2i**, **2m** e **2n**) interagiram com apenas um resíduo importante, sendo ele Ile151, Asp155 ou Arg226. As interações foram do tipo ligação de hidrogênio com o resíduo Arg226, ligação iônica com o resíduo Asp155 e π -alquil com o resíduo Ile151, sendo todas estas consideradas interações fortes ou relevantes para a interação do composto com a enzima.

Comparando estes resultados com as interações realizadas pelos ligantes com atividade anti-GWT1 já descrita, manogepix e BIQ, percebeu-se que estes ligantes realizaram interações do mesmo tipo e com os resíduos Ile135, Val162, Glu228 para *C. albicans* e, com o resíduo Phe235, realizaram um empilhamento π . Para *T. rubrum*, só houve interação com o resíduo Arg226, mas ao invés de uma ligação de hidrogênio, foram realizadas interações do tipo cátion- π ou π -alquil.

Através de uma comparação das energias de ligação dos complexos envolvendo os compostos em análise e as energias dos complexos envolvendo os inibidores manogepix e BIQ, para *C. albicans*, observou-se que três dos quinze compostos estudados (**1b**, **1c**, **2a**) formaram complexos com energias iguais ou menores que a do complexo com BIQ (-8,3 kcal/mol), mas nenhum dos complexos teve valor menor que -10,0 kcal/mol, obtido para o complexo com manogepix. Já para *T. rubrum*, os complexos de treze dos quinze compostos testados (**1b**, **1c**, **2a**, **2e**, **2h**, **2i**, **2j**, **2k**, **2l**, **2m**, **2n**, **2o**) apresentaram as energias de ligação menores ou iguais a do complexo com manogepix (-7,4 kcal/mol), sendo que apenas um deles, com **2b**, teve energia de ligação menor que a do complexo com BIQ (-8,9 kcal/mol). Entretanto, de modo geral, todos os compostos em ambas as espécies formam complexos com a enzima com valores bem próximos de energia de ligação dos complexos envolvendo manogepix e BIQ.

6 CONCLUSÃO

Em relação aos estudos de *docking* realizados, de maneira geral, quando se trata da enzima da espécie *C. albicans*, os compostos interagiram predominantemente com os resíduos de aminoácidos indicados por Kapoor e colaboradores (2019), Moraes e colaboradores (2021) e Fenollar e colaboradores (2022) como essenciais para o funcionamento da enzima. Nos estudos com a enzima de *T. rubrum*, isso foi bem pouco observado, porém por interagirem com resíduos que estão próximos da região em que os resíduos importantes estão, esses compostos também podem acabar afetando o funcionamento da enzima para essa espécie. Além disso, ao interagirem de uma maneira similar que a apresentada pelos inibidores manogepix e BIQ no sítio ativo dessas enzimas, os compostos também se tornam potenciais inibidores da enzima, considerando que realizam algumas das mesmas interações intermoleculares com resíduos importantes e por terem valores de energia de ligação próximos ou melhores, como já explicitado anteriormente.

Como os resultados deste trabalho não apresentaram uma concordância em tendência com os resultados do estudo *in vitro* realizado por Dalla-Lana e colaboradores (2020), predizer que a enzima GWT1 é o alvo real de ação dos compostos estudados se torna mais difícil, porém deve-se levar em consideração, que no ambiente *in vitro*, há outros fatores que podem interferir na atividade antifúngica e não estão presentes nas simulações de *docking* molecular. Além disso, a estabilidade dos complexos que os compostos em estudo formaram com esse alvo não pode ser desconsiderada para que a análise seja mais crítica.

Portanto, é possível dizer que os compostos analisados, tendo como destaque os compostos **1b**, **1c**, **2a**, **2b** e **2e** por realizarem várias interações relevantes com resíduos importantes do alvo e formarem complexos estáveis com a enzima, podem ser candidatos para realização de estudos de inibição contra a enzima GWT1 e validação se esse poderia ser realmente um alvo molecular desses compostos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, London, v. 150, p. 2029–2035, jul. 2004
- ALMEIDA, F.; RODRIGUES, M. L.; COELHO, C. The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, n. 214, fev. 2019
- BAEK, M. *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. **Science**, v. 373, n. 6557, p. 871–876, ago. 2021
- BALASHOV, S. V. *et al.* Rapid, high-throughput, multiplex, real-time PCR for identification of mutations in the *cyp51A* gene of *Aspergillus fumigatus* that confer resistance to itraconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, New York, v. 43, n. 1, p. 214–22, jan. 2005
- BONGOMIN, F. *et al.* Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. **Journal of Fungi**, Basel, v. 3, n. 4, out. 2017
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Formulário terapêutico nacional 2010: Rename 2010**. 2. ed. Brasília, 2010, p. 131-135 (Série B. Textos Básicos de Saúde).
- BROWN, G. D. *et al.* Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 4, n. 165, dez. 2012
- CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86–96, jun. 2017
- CHEN, L.; K. *et al.* From Laptop to Benchtop to Bedside: Structure-based Drug Design on Protein Targets. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 9, p. 1217–1239, 2012.
- COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of clinical microbiology**, New York, v. 44, n. 8, p. 2816–2823, ago. 2006
- COWEN, L. E. *et al.* Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 7, jul. 2015.
- DALLA-LANA, D. F. *et al.* Discovery of a novel and selective fungicide that targets fungal cell wall to treat dermatomycoses: 1,3-bis(3,4-dichlorophenoxy)propan-2-aminium chloride. **Mycoses**, Hoboken, v. 63, n. 2, p. 197-211, fev. 2020
- DEACON, J. W. **Modern Mycology**. 4 ed. Malden: Blackwell Science, Inc., 1997, p. 55

DINIZ-NETO, H. *et al.* Atividade antifúngica de 2-cloro-N-fenilacetamida: uma nova molécula com atividade fungicida e anti-biofilme contra *Candida spp.* resistentes a fluconazol. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 84, jan. 2022

GRAY, K. C. *et al.* Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 7, p. 2234–2239, fev. 2012

GROOT, P. W. J. *et al.* Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 4, p. 470-481, 2013.

FENOLLAR, À. *et al.* Compounds targeting GPI biosynthesis or N-glycosylation are active against *Plasmodium falciparum*. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, Amsterdam, v. 20, p. 850–863, fev. 2022

FERREIRA, G. A. **Análise Comparativa de Glicanas e Quitinas da Parede Celular de Espécies de Trichoderma e a Relação Desses Polissacarídeos no Pareamento com Fitopatógenos**. Dissertação (Mestrado em Ciências aplicadas a produtos da saúde). Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2018.

FIRACATIVE, C. Invasive fungal disease in humans: are we aware of the real impact? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 115, out. 2020

FREE, S. J. Fungal cell wall organization and biosynthesis. **Advances in Genetics**, Buffalo, v. 81, p.34-71, 2013.

FU, Y. *et al.* Jawsamycin exhibits in vivo antifungal properties by inhibiting Spt14/Gpi3-mediated biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

HAVLICKOVA, B.; CZAICA, V. A.; FREDERICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, Hoboken, v. 51, n. 4, p. 2–15, set. 2008.

HOWARD, S.J. *et al.* Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. **Emerging Infectious Diseases**, New York, v. 15, n. 7, p. 1068-1076, jul. 2009

KAPOOR, M. *et al.* Evaluation of Resistance Development to the Gwt1 Inhibitor Manogepix (APX001A) in *Candida* Species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 64, n. 1, p. 1-12, dez. 2019

KINOSHITA, T.; INOUE, N. Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 4, n. 6, p. 632-638, dez. 2000

KITCHEN, D. B. *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery, London**, v. 3, n. 11, p. 935-949, nov. 2004

LAMOTH, F. *et al.* Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 73, p. 4-13, jan. 2018

- LAVORATO, S. N. *et al.* Synthesis and antileishmanial activity of 1,3-bis(aryloxy)propan-2-amines. **Med Chem Res.** v. 26, p. 1052-1072, 2017a
- LAVORATO, S. N. *et al.* Synthesis, antileishmanial activity and QSAR studies of 2-chloro-N-arylacetamides. **Braz J Pharm Sci**, v. 53, p. 1-7, 2017b.
- MALE, O. The significance of mycology in medicine. In: Hawksworth DL, **Frontiers in Mycology**. Wallingford: CAB International, 1990, p. 131–56.
- MARICHAL, P. *et al.* Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology**, London, v.145, p. 2701–13, out. 1999
- MASTERSON, W. J. *et al.* A novel pathway for glycan assembly: biosynthesis of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. **Cell**, v. 56, n. 5, p. 793–800, mar. 1989
- MCLELLAN, C. A. *et al.* Inhibiting GPI Anchor Biosynthesis in Fungi Stresses the Endoplasmic Reticulum and Enhances Immunogenicity. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 9, p. 1520–1528, 2012.
- MORAIS, M. C. *et al.* Cytotoxic and Antifungal Amides Derived from Ferulic Acid: Molecular *Docking* and Mechanism of Action. **BioMed Research International**, London, v. 2021, p. 1-18, nov. 2021
- NENOFF, P. *et al.* Mycology – an update. Part 1: Dermatomycoses: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, Berlin, v. 12, n. 3, p. 188-210, fev. 2014
- OU-YANG, S. *et al.* Computational drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 9, p. 1131–1140, 2012
- PARK, S. *et al.* Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 8, p. 3264–73, ago. 2005
- PEREA, S. *et al.* Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 45, n. 10, p. 2676–2684, out. 2001
- PEREIRA, J. A.. **Atividade antifúngica do geraniol sobre leveduras multirresistentes do gênero *Candida* e perfil farmacológico e toxicológico em estudos *in silico***. 2017. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017
- PERFECT, J. F. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 16, n. 9, p. 603-616, set. 2017

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, Tucson, v. 125, n. 1, jan. 2012

PIANALTO, K. M.; ALSPAUGH, J. A. New Horizons in Antifungal Therapy. **Journal of Fungi**, Basel, v. 2, n. 4, p. 26, out. 2016

PINZI, L.; RASTELLI, G.. Molecular *Docking*: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, Berna, v. 20, n. 18, set. 2019

PIOTROWSKI, J. S. *et al.* Functional annotation of chemical libraries across diverse biological processes. **Nature Chemical Biology**, London, v. 13, n. 9, p. 982–93, set. 2017

REVIE, N. M. *et al.* Antifungal Drug Resistance: Evolution, Mechanisms and Impact. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 45, p. 70-76, out. 2018

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B.. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003

SERAFIM, M. S. M. *et al.* Antibacterial activity of synthetic 1,3-bis(aryloxy)propan-2-amines against Gram-positive bacteria. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 11, 2019.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 75, n. 2, p. 213–67, jun. 2011

SIONOV, E. *et al.* *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 4, abr. 2010

SMITH, T. *et al.* The Role of Inositol Acylation and Inositol Deacylation in the *Toxoplasma gondii* Glycosylphosphatidylinositol Biosynthetic Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 44, p. 32032–32042, 2007

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, London, v. 369, p. 1961–1971, jun. 2007

THOMAS, J. *et al.* Toenail onychomycosis: An important global disease burden. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, London, v. 35, n. 5, p. 497–519, out. 2010

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2015, p. 545.

UMEMURA, M. *et al.* GWT1 Gene Is Required for Inositol Acylation of Glycosylphosphatidylinositol Anchors in Yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, Tsukuba, v. 278, n. 26, p. 23639–23647, jun. 2003

VAN DEN BOSSCHE, H. *et al.* Hypothesis on the molecular basis of the antifungal activity of N-substituted imidazoles and triazoles. **Biochemical Society transactions**, London, v. 11, n. 6, p. 665–667, dez. 1983.

- VERLI, H. **Bioinformática: Da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1 ed. São Paulo: SBBq, 2014, p. 148-171
- WANG, F. *et al.* Computational Screening for Active Compounds Targeting Protein Sequences: Methodology and Experimental Validation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 11, p. 2821–2828, 2011.
- WATANABE, N. *et al.* E1210, a New Broad-Spectrum Antifungal, Suppresses *Candida albicans* Hyphal Growth through Inhibition of Glycosylphosphatidylinositol Biosynthesis. **American Society for Microbiology**, Washington, v. 56, n. 2, p. 960-971, fev. 2012
- WOOLLER, S. K. *et al.* Bioinformatics in translational drug discovery. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 4, 2017
- YADAV, U.; KHAN, M. A. Targeting the GPI biosynthetic pathway. **Pathogens and Global Health**, v. 112, n. 3, p. 115–122, 2018.
- YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 1, p. 174–181, abr. 2015.
- YANG, J *et al.* Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 3, p. 1496–1503, jan. 2020.