

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

RAYANE LUIZA DE CARVALHO

**COMPOSTOS DERIVADOS DO TIMOL E CARVACROL: AVALIAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA *IN SILICO* E *IN VITRO***

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2024

RAYANE LUIZA DE CARVALHO

**COMPOSTOS DERIVADOS DO TIMOL E CARVACROL: AVALIAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA *IN SILICO* E *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos

Coorientadores: Christiane Mariotini-Moura
Vasconcellos
Joice de Melo Agripino
Juliana Lopes Rangel Fietto

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2024

T

C331c
2024

Carvalho, Rayane Luiza de, 1996-
Compostos derivados do timol e carvacrol: avaliação e
caracterização da atividade antileishmania *in silico* e *in vitro* / Rayane
Luiza de Carvalho. - Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (127 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.

Referências bibliográficas: f. 102-108.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.674>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Timol - Uso terapêutico. 2. Carvacrol - Uso terapêutico. 3.
Leishmaniose - Tratamento. I. Vasconcellos, Raphael de Souza, 1982-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 547.632


RAYANE LUIZA DE CARVALHO

**COMPOSTOS DERIVADOS DO TIMOL E CARVACROL: AVALIAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA *IN SILICO* E *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de
Magister Scientiae.


APROVADA: 22 de agosto de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **RAYANE LUIZA DE CARVALHO**
Data: 09/10/2024 17:45:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rayane Luiza de Carvalho

Autora

Documento assinado digitalmente
 **RAPHAEL DE SOUZA VASCONCELLOS**
Data: 10/10/2024 09:15:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Raphael de Souza Vasconcellos

Orientador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me abençoar e iluminar durante todo o caminho, tornando possível que os meus sonhos se realizem

Aos meus pais e meu irmão por todo apoio, amor, carinho e suporte neste momento tão importante, obrigada por sempre estarem disponíveis e ao meu lado me ajudando durante toda a minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, a mais linda do Brasil pela oportunidade de realizar a pós-graduação e por fornecer toda a infraestrutura necessária para a minha pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Às minhas amigas Sara, Bianca e Bárbara que me ajudaram demais tanto com apoio moral, como com todo o companheirismo e cafezinhos.

Em especial a Sara Andrade que foi a luz na minha bioinformática, te agradeço demais por todo ensinamento, ajuda e paciência.

Ao meu Orientador Raphael Vasconcellos por toda ajuda, orientação e paciência, que venham mais quatro anos excelentes no doutorado. Obrigada por ser esse orientador que nos acolhe de instrui nos permitindo também expressar os nossos próprios pensamentos. Só tenho a agradecer.

Agradeço também à mim mesma, pela perseverança, força, persistência e por nunca desistir.

E a toda equipe LAPEM (LAPEV), pela parceria e companheirismo. A melhor equipe de laboratório. Agradeço aos ICs sempre dispostos a ajudar, e pelo excelente ambiente que nós criamos e cultivamos todos os dias. Adoro vocês equipe.

“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio-termo. Ou você faz uma coisa bem-feita ou não faz.”

(Ayrton Senna)

RESUMO

CARVALHO, Rayane Luiza, M.Sc.. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. **COMPOSTOS DERIVADOS DO TIMOL E CARVACROL: AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA *IN SILICO* E *IN VITRO***. Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos. Coorientadores: Christiane Mariotini-Moura Vasconcellos, Joice de Melo Agripino, Juliana Lopes Rangel Fietto.

Leishmanioses são doenças provocadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por flebotomíneos, é prevalente em países subdesenvolvidos. O relatório mundial mais recente da Organização Mundial da Saúde (OMS), de 2022, registrou entre 700 mil e 1 milhão de novos casos globalmente das diversas formas da doença. Ocorrendo em três formas principais: cutânea, a mais comum, mucocutânea e visceral, sendo esta última potencialmente letal se não tratada. Os atuais tratamentos, como antimoniais pentavalentes, enfrentam desafios de toxicidade e eficácia limitada. Por isso, a pesquisa por novos tratamentos é tão importante. O uso de moléculas derivadas de fontes naturais tem crescido fortemente nos últimos anos. Moléculas como carvacrol e timol se destacam por exibir potencial terapêutico contra diversas doenças. Como câncer e a própria leishmaniose, agindo sobre proteínas cinases, atuando na inibição da atividade dos parasitos, induzindo a morte. A escolha de proteínas cinases como alvos terapêuticos baseia-se na complexidade do ciclo de vida dos parasitos *Leishmania* e *Trypanosoma*. Proteínas como AKT-like cinase e caseína cinase (CK) foram identificadas como potenciais alvos leishmanicidas. O presente estudo teve por objetivo o teste da atividade leishmanicida de compostos semissintéticos derivados de carvacrol e timol e avaliação da interação dos compostos com atividade antileishmania através de análises de bioinformática estrutural. O estudo testou *in vitro* da atividade citotóxica em macrófago dos 19 compostos derivados, nomeados de AC, A1 a A11 para os derivados do carvacrol e M1 a M7 para os derivados do timol. Com testes da atividade antileishmania nas espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, e seleção daqueles que apresentaram atividade para realização de *docking* molecular da interação proteína ligante, com as proteínas CKI, CRK3, GSK, MAPK, AKT-like (PKA) e SRPK. Além da análise filogenética de sequências de *Arabidopsis*, *Plasmodium*, mamíferos e a família de tripanossomatídeos. Dos resultados obtidos, todos os compostos apresentaram $CC_{50} > 200 \mu\text{M}$, com maior atividade antileishmania apresentando aproximadamente 60% na triagem nos compostos A6 e A8, definindo valores de IC_{50} de 11,43 e 11,77 μM , com baixíssima citotoxicidade definida por CC_{50} acima de 1 mM, nestes dois compostos. Direcionando somente os compostos A6 e A8

para as análises de bioinformática, apresentada pela melhor interação do composto A8 com a maioria das proteínas analisadas. As análises filogenéticas de todas as proteínas mostraram uma distância evolutiva clara entre tripanossomatídeos e mamíferos indicando oportunidade única para o desenvolvimento de fármacos altamente específicos. A compreensão desses mecanismos pode contribuir para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e com menor toxicidade, abrindo perspectivas promissoras para o combate à leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose, Citotoxicidade, Carvacrol, Timol, Interação Proteína-ligante

ABSTRACT

CARVALHO, Rayane Luiza, M.Sc. Federal University of Viçosa, August 2024.
CHARACTERIZATION OF SYNTHETIC COMPOUNDS WITH ANTILEISHMANIAL POTENTIAL: *IN SILICO* AND *IN VITRO* APPROACHES.
Advisor: Raphael de Souza Vasconcellos. Co-advisors: Christiane Mariotini-Moura Vasconcellos, Joice de Melo Agripino, Juliana Lopes Rangel Fietto.

Leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, transmitted by sandflies, and is prevalent in underdeveloped countries. The latest global report from the World Health Organization (WHO) in 2022 recorded between 700,000 and 1 million new cases of various forms of the disease globally. It manifests in three main forms: cutaneous, which is the most common, mucocutaneous, and visceral, the latter being potentially lethal if untreated. Current treatments, such as pentavalent antimonials, face challenges related to toxicity and limited efficacy. Therefore, research into new treatments is crucial. The use of molecules derived from natural sources has gained significant momentum in recent years. Molecules such as carvacrol and thymol have shown therapeutic potential against various diseases, including cancer and leishmaniasis itself, by acting on protein kinases, inhibiting parasite activity, and inducing cell death. The selection of protein kinases as therapeutic targets is based on the complexity of the life cycles of *Leishmania* and *Trypanosoma* parasites. Proteins such as AKT-like kinase and casein kinase (CK) have been identified as potential leishmanicidal targets. The present study aimed to test the leishmanicidal activity of semi-synthetic compounds derived from carvacrol and thymol and evaluate the interaction of these compounds with antileishmanial activity through structural bioinformatics analyses. The study involved *in vitro* testing of the cytotoxic activity in macrophages of 19 derived compounds, named AC, A1 to A11 for carvacrol derivatives, and M1 to M7 for thymol derivatives. The antileishmanial activity was tested against *L. braziliensis* and *L. amazonensis*, and those exhibiting activity were selected for molecular docking analyses of ligand-protein interactions with CKI, CRK3, GSK, MAPK, AKT-like (PKA), and SRPK proteins. Additionally, phylogenetic analysis of sequences from *Arabidopsis*, *Plasmodium*, mammals, and the trypanosomatid family was conducted. From the results obtained, all compounds presented $CC_{50} > 200 \mu\text{M}$, with the greatest antileishmanial activity shown by compounds A6 and A8, which exhibited approximately 60% inhibition in the screening, and IC_{50} values of 11.43 and 11.77 μM , with very low cytotoxicity defined by CC_{50} above 1 mM in these two compounds. Therefore, only compounds A6 and A8 were directed for

bioinformatics analysis, with compound A8 showing the best interaction with most of the proteins analyzed. Phylogenetic analysis of all proteins revealed a clear evolutionary distance between trypanosomatids and mammals, indicating a unique opportunity for the development of highly specific drugs. Understanding these mechanisms could contribute to the development of more effective treatments with lower toxicity, opening promising perspectives for combating leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, Cytotoxicity, Carvacrol, Thymol, Protein-Ligand Interaction

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição global do status de endemicidade da leishmaniose cutânea.	21
Figura 2 - Distribuição global do status de endemicidade da leishmaniose visceral.	21
Figura 3 - Ciclo de vida do parasito.	25
Figura 4 - Fórmula química estrutural da molécula de Carvacrol.	27
Figura 5 - Fórmula química estrutural da molécula de Timol.	29
Figura 6 - Fórmulas químicas estruturais dos compostos classe A.	41
Figura 7 - Fórmulas químicas dos compostos classe M.	41
Figura 8 - Curva de crescimento de <i>L. braziliensis</i> M2904-GFP.	51
Figura 9 - Triagem dos compostos no experimento de citotoxicidade em macrófago RAW 264.7.	52
Figura 10 - Perfil de citotoxicidade em macrófago RAW 264.7 com tratamento com compostos classe A.	53
Figura 11 - Perfil de citotoxicidade em macrófago RAW 264.7 com tratamento com compostos classe M.	54
Figura 12 - Perfil de citotoxicidade em macrófago RAW 264.7 com tratamento com óleo essencial comercial de Carvacrol.	55
Figura 13 - Triagem da Infecção de macrófago RAW 264.7 por <i>L. braziliensis</i>	56
Figura 14 - Gráfico de Citotoxicidade compostos A6 e A8.	57
Figura 15 - Triagem da Infecção de macrófago RAW 264.7 por <i>L. amazonensis</i> PH8.	58
Figura 16 - Comparação de similaridade estrutural entre as proteínas de <i>Leishmania</i> que foram modeladas e as proteínas cristalizadas que apresentaram similaridade de sequência por Blastp.	62
Figura 17 – Representação 3D dos compostos A6, A8 e Carvacrol utilizados para o <i>docking</i> molecular.	64
Figura 18 - LbCKI + A6.	66
Figura 19 - LbCKI + A6.	66
Figura 20 - LbCKI + A8.	67
Figura 21 - LbCKI + A8.	68
Figura 22 - LbCKI + Carvacrol.	69
Figura 23 - LbCRK3 + A6.	70
Figura 24 – LbCRK3 + A6.	71
Figura 25 - LbCRK3 + A8.	71

Figura 26 - LbCRK3 + A8.....	72
Figura 27 - LbCRK3 + Carvacrol.....	73
Figura 28 - LbGSK + A6.....	74
Figura 29 - LbGSK + A6.....	75
Figura 30 - LbGSK + A8.....	76
Figura 31 - LbGSK + A8.....	76
Figura 32 - LbGSK + Carvacrol.....	77
Figura 33 - LbMAPK + A6.	78
Figura 34 - LbMAPK + A6.	78
Figura 35 - LbMAPK + A8.....	79
Figura 36 - LbMAPK + A8.	79
Figura 37 - LbMAPK + Carvacrol	80
Figura 38 - LbPKA + A6.....	81
Figura 39 - LbPKA + A6.....	82
Figura 40 - LbPKA + A8.....	83
Figura 41 - LbPKA + A8.....	83
Figura 42 - LbPKA + Carvacrol.....	84
Figura 43 - LbSRPK + A6	85
Figura 44 - LbSRPK + A6.....	85
Figura 45 - LbSRPK + A8	86
Figura 46 - LbSRPK + A8.....	87
Figura 47 - LbSRPK + Carvacrol.....	87
Figura 48 - Árvore filogenética de sequências da proteína Caseína cinase I (CKI) de protozoários, planta e mamíferos.....	90
Figura 49 - Árvore filogenética de sequências da proteína Cinase Relacionada a Ciclina/ Cinase Dependente de Ciclina (CRK/CDK) de protozoários, planta e mamíferos.	92
Figura 50 - Árvore filogenética de sequências da proteína Glicogênio sintase cinase (GSK) de protozoários, planta e mamíferos.....	93
Figura 51 - Árvore filogenética de sequências da proteína MAPK de protozoários, planta e mamíferos.....	95
Figura 52 - Árvore filogenética de sequências da Proteína Cinase A (PKA) de protozoários, planta e mamíferos.....	96
Figura 53 - Árvore filogenética de sequências da proteína SRPK de protozoários, planta e mamíferos.....	98

Figura 54 - Alinhamento no ClustalOmega das sequências da LbCKI (LbrM.34.1000) com a HsCKI (3UZP). A marcação em vermelho refere-se a região truncada da LbCKI.....	109
Figura 55 - Alinhamento no ClustalOmega das sequências da LbCRK3 (LbrM.35.0660) com a HsCRK3 (8UV0). A marcação em vermelho refere-se a região truncada da LbCRK3	110
Figura 56 - Alinhamento no ClustalOmega das sequências da LbMAPK (LbrM.10.0620) com a LdMAPK (402Z). A marcação em vermelho refere-se a região truncada da LbMAPK.....	111
Figura 57 - Representação 3D - ligações alquil e pi-alquil da interação da proteína LbCKI com os compostos A6 em vermelho e A8 em vinho	125
Figura 58 - Representação 3D - ligações alquil e pi-alquil da interação da proteína LbCRK3 com os compostos A6 em vermelho e A8 em vinho	125
Figura 59 - Representação 3D - ligações alquil e pi-alquil da interação da proteína LbGSK com os compostos A6 em vermelho e A8 em vinho	126
Figura 60 - Representação 3D - ligações alquil e pi-alquil da interação da proteína LbMAPK com os compostos A6 em vermelho e A8 em vinho	126
Figura 61 - Representação 3D - ligações alquil e pi-alquil da interação da proteína LbPKA com os compostos A6 em vermelho e A8 em vinho	127
Figura 62 - Representação 3D - ligações alquil e pi-alquil da interação da proteína LbSRPK com os compostos A6 em vermelho e A8 em vinho	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação flebotomíneo x <i>Leishmania</i> de algumas espécies de <i>Leishmania</i> , com abreviação do gênero do flebotomíneo de acordo com Marcondes (2007).....	22
Tabela 2 - Proteínas de <i>Leishmania braziliensis</i> selecionadas no banco de dados de tripanossomatídeos TritypDB para análises <i>in silico</i>	44
Tabela 3 - Concentração inibitória de 50% (IC ₅₀) da <i>Leishmania braziliensis</i> , e Concentração Citotóxica de 50% (CC ₅₀) dos macrófagos RAW 264.7. Cálculo do índice de seletividade (IS).....	59
Tabela 4 - Análise da comparação de similaridade de sequência entre proteína de <i>L. braziliensis</i> modelada por <i>Alphafold2</i> e proteínas cristalizadas armazenada no banco de dados PDB.	60
Tabela 5 - Validação das modelagens realizada nos 4 servidores.....	60
Tabela 6 - Dados do <i>redocking</i> das 6 proteínas.....	63
Tabela 7 - Relação de <i>scores</i> dos ligantes A6, A8 e Carvacrol de cada proteína com as respectivas funções de pontuação utilizadas no <i>docking</i>	88

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	19
2.1.	Objetivo Geral.....	19
2.2.	Objetivos Específicos.....	19
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1.	Leishmanioses.....	20
3.2.	Ciclo de vida do parasito.....	22
3.3.	Formas de Tratamento.....	26
3.4.	Carvacrol.....	27
3.5.	Timol.....	28
3.6.	Utilização de proteínas cinase como alvos de tratamento.....	29
3.6.1.	AKT-like cinase - PKA.....	30
3.6.2.	CRK3 – Cinase relacionada a ciclina.....	31
3.6.3.	Caseína cinase (CK).....	33
3.6.4.	Glicogênio sintase cinase (GSK)	34
3.6.5.	Mitogen-activated protein cinase (MAPK).....	34
3.6.6.	Proteína Serina-arginina cinase (SRPK).....	35
3.7.	Análise de bioinformática na modelagem de moléculas para utilização como possíveis fármacos.....	36
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1.	Cultura celular.....	38
4.2.	Manutenção dos parasitos <i>in vitro</i>	38
4.3.	Manutenção dos macrófagos RAW 264.7	39
4.4.	Curva de crescimento da <i>L. braziliensis GFP</i>	39
4.5.	Deteccção da viabilidade celular em macrófago	40
4.6.	Preparação dos compostos	40
4.7.	Ensaio de citotoxicidade em macrófago RAW 264.7	42
4.8.	Ensaio de infecção <i>in vitro</i> de macrófago RAW 264.7 por <i>L. braziliensis-GFP</i>	43
4.9.	Análise <i>in silico</i>	44
4.10.	Árvore Filogenética.....	47
4.11.	Análise estatística.....	50
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

5.1. Curva de Crescimento	51
5.2. Ensaios <i>in vitro</i>	51
5.3. Análise <i>in silico</i>	59
5.3.1.LbCKI	65
5.3.2.LbCRK3	69
5.3.3.LbGSK	73
5.3.4.LbMAPK.....	77
5.3.5.LbPKA	80
5.3.6.LbSRPK	84
5.4. Árvore Filogenética.....	88
5.4.1.CKI.....	88
5.4.2.CRK3	91
5.4.3.GSK.....	93
5.4.4.MAPK	94
5.4.5.PKA.....	96
5.4.6.SRPK.....	97
6. CONCLUSÃO	99
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	101
8. REFERÊNCIAS.....	102
9. Apêndice A – Alinhamento das sequências de proteína com representação das regiões truncadas.....	109
10. Apêndice B – Validação da estrutura tridimensional das proteínas.....	112
10.1. CKI.....	112
10.2. CRK3	114
10.3. LbGSK	116
10.4. MAPK.....	118
10.5. PKA.....	120
10.6. SRPK.....	123
11. Apêndice C – Representação das Ligações Hidrofóbicas.....	125

1. INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças negligenciadas, antropozoonóticas, causadas por protozoários da família *Trypanosomatidae*, pertencentes à diferentes espécies do gênero *Leishmania*, cuja transmissão ocorrem por meio da picada de inseto flebotomíneo fêmeas infectadas dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, vetores nas Américas e nos demais continentes, respectivamente (BRUNI et al., 2017). Com maior ocorrência em países subdesenvolvidos, nas populações com carência de saneamento básico e baixos recursos financeiros, em 2022 foi relatado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) entre 700 mil e 1 milhão de novos casos em todo o mundo.

Existem 3 principais formas de desenvolvimento da doença. Leishmaniose cutânea, responsável por causar lesões ulcerativas na pele no local da picada com cicatrizes permanentes, é a forma mais comum e com maior incidência da doença. Quando não tratada, pode evoluir para a forma mucocutânea, que irá ocasionar lesões na região das mucosas, como nariz, boca e garganta, podendo destruir as membranas mucosas total ou parcialmente. Essas duas formas são as principais responsáveis pelo estigma das populações afetadas, visto que as lesões irão causar deformações e cicatrizes permanentes na pele dos indivíduos. Leishmaniose visceral é a forma mais letal da doença, afetando os órgãos internos, principalmente baço e fígado; se não tratada, pode levar à morte em 90% dos casos (PAHO, 2022; WHO, 2023).

Além dos sintomas da doença serem um grande problema, também há obstáculos quanto às formas de tratamento atuais. Como primeira linha comumente utiliza-se antimoniais pentavalentes, como Pentostam, Glucantime, Isetionato de Pentamidina. Outros tratamentos também são utilizados, variando quanto à evolução da doença, espécie do parasito e características individuais do hospedeiro. Além disso, incluem-se a Anfotericina B (Fungizone), Anfotericina B Lipossomal (AmBisome), Miltefosina, e a combinação de diferentes tratamentos (ARONSON et al., 2017; PAHO, 2022). Todos os diferentes fármacos representam barreiras para o efetivo tratamento da leishmaniose, devido a ocorrência de alta toxicidade dos mesmos, afetando fígado, coração e rins. Além da baixa eficácia de cerca de 50%, que gera incapacidade de promover a morte de 100% dos parasitos presentes no indivíduo e desta forma fazendo com que haja possibilidade de uma recaída no quadro devido a uma queda na imunidade do hospedeiro (BRUNI et al., 2017; CARDONA-ARIAS et al., 2017; PAHO, 2022; PINK et al., 2005; WHO, 2023). Por isso há uma grande relevância na pesquisa de novos fármacos que poderiam agir como possíveis novos tratamentos para a

leishmaniose.

Na busca pelo desenvolvimento de potenciais fármacos de síntese facilitada e custo acessível, há uma crescente utilização de compostos sintéticos derivados de substâncias naturais, tais como plantas e óleos essenciais. Outra abordagem envolve a seleção de compostos sintéticos provenientes de classes que apresentem robustas evidências de eficácia como alvos farmacológicos, além de serem de síntese facilitada. Entre essas classes, os compostos derivados do carvacrol e do timol têm demonstrado um promissor potencial comprovado de atividade antimicrobiana, anticâncer, entre outras (CHEN et al., 2017; MAÇZKA et al., 2023; SAMPAIO et al., 2021; ZIELIŃSKA-BŁAJET; PIETRUSIAK; FEDER-KUBIS, 2021). Por isso a utilização de compostos sintéticos a partir de material natural tem sido cada vez mais frequente como novas formas de tratamento, incluindo moléculas como derivados de monoterpene de carvacrol ou timol (COSTA et al., 2023; GALVÃO et al., 2020; MAÇZKA et al., 2023; SAMPAIO et al., 2021).

Tendo como base revisões de literatura quanto ao funcionamento do organismo dos parasitos e possíveis funções de proteínas, evidenciou-se a grande relevância da escolha de proteínas cinases como possíveis alvos para novos tratamentos para a leishmaniose. Estudos têm sido conduzidos para analisar as mudanças na expressão de proteínas cinase em parasitos como *Leishmania* e *Trypanosoma* (KAUR et al., 2017; KUHN; WIESE, 2005; MEJÍA et al., 2020; PARSONS et al., 2005). Esses parasitos apresentam um ciclo de vida complexo, com transições entre vetores insetos e hospedeiros mamíferos, envolvendo diferenciações morfológicas ao longo do processo. Essas análises visam compreender as adaptações desses parasitos a diferentes ambientes e condições ao longo de seus ciclos de vida (BAKER et al., 2021; PARSONS et al., 2005). A fosforilação é crucial para processos celulares, e a inibição de proteínas cinases pode impactar a regulação do metabolismo desempenhando papel fundamental como reguladores em processos celulares, incluindo controle transcricional, progressão e diferenciação do ciclo celular (NAULA; PARSONS; MOTTRAM, 2005; RACHIDI et al., 2014; TIRADO-DUARTE et al., 2018).

Dentre as 195 proteínas cinases identificadas em *Leishmania* (NAULA; PARSONS; MOTTRAM, 2005; PARSONS et al., 2005), 6 foram escolhidas baseado na sua função e possível potencial de ação fundamental para a sobrevivência do parasito. Sendo elas AKT-like cinase (PKA), caseína cinase (CKI), proteína cinase relacionada a ciclina (CRK3), glicogênio sintase cinase (GSK), proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), serina arginina proteína cinase (SRPK).

AKT-like cinase (PKA), uma proteína citoplasmática ortóloga do grupo da *serine-*

threonine kinase B, responsável pela manutenção da sobrevivência dos parasitos. Em testes com inibidores específicos de AKT foi comprovado atividade leishmanicida, agindo com processos semelhantes a apoptose, que ocasionaram na morte do parasito (TIRADO-DUARTE et al., 2018).

A caseína cinase I (CKI) também foi utilizada como alvo de ação de compostos leishmanicidas. As CKs, assim como AKT, fazem parte de uma família de proteínas *serine-threonine kinase* multifuncionais que são caracterizadas por um domínio cinase altamente conservado e um domínio C-terminal específico implicado na sua regulação e localização. Foram identificadas como altamente conservadas em diferentes espécies de *Leishmania* demonstrando que possivelmente atuam em processos fisiológicos fundamentais, o que as caracteriza como bons alvos em potencial para ação de compostos leishmanicidas (KRÖBER-BONCARDO et al., 2020; RACHIDI et al., 2014).

As vias de sinalização de AKT e MAPK já foram diretamente relacionadas e foi comprovado que a ação de compostos inibidores destas vias de sinalização inibiu o crescimento celular de células tumorais. A proteína AKT, como já foi anteriormente citado, possui função fundamental para a sobrevivência do parasito, enquanto a MAPK está presente em diversas vias de sinalização, regulando atividades celulares críticas, como proliferação celular, diferenciação, mortalidade, resposta ao estresse e apoptose (KAUR et al., 2017; MANNING et al., 2002).

Proteína Serina-arginina cinase (SRPK) é uma proteína cinase com grande foco de estudo do nosso grupo de pesquisa, pertencente à família de proteínas *serine-threonine kinase*, crucial em diversos organismos e desempenha um papel essencial no *splicing* do pré-mRNA. É conhecido que a ação das SRPKs ocorre pelo processamento do RNA por *cis-splicing* em humanos, processo este que não ocorre em tripanossomatídeos, que no caso seria através de *trans-splicing*, indicando conservação funcional (PORTAL et al., 2003). Em *Leishmania*, PIMENTEL et al., (2023) mostraram que inibidores de SRPK, como derivados do SRPIN340, têm ação leishmanicida, contra *L. braziliensis*, sugerindo que a inibição da SRPK pode levar à morte do parasito.

Desta forma o presente estudo teve como interesse a análise de compostos semissintéticos derivados de carvacrol e timol, como potenciais agentes leishmanicidas. Analisando o potencial citotóxico em células de macrófago RAW 264.7 e verificação da atividade leishmanicida *in vitro* através de ensaio de infecção. Por se tratar de compostos inéditos não tendo estabelecido o mecanismo de ação, foi realizada análise de bioinformática estrutural através de *docking* molecular proteína-ligante no *software* GOLD das proteínas

LbCKI, LbCRK3, LbGSK, LbMAPK, LbPKA e LbSRPK com os compostos A6 e A8, os quais apresentaram melhor atividade leishmanicida, o que contribui para entender melhor a possibilidade de interação dos compostos com proteínas do parasito.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Analisar a atividade leishmanicida de compostos semissintéticos derivados de carvacrol e timol e avaliar a interação dos compostos com atividade antileishmania através de análises de bioinformática estrutural.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar triagem dos compostos semissintéticos através de teste de citotoxicidade em macrófago RAW 264.7;
- Realizar triagem dos compostos na infecção *in vitro* de *L. braziliensis* em linhagem de macrófagos RAW 264.7;
- Determinar o CC_{50} dos compostos em estudos em macrófago RAW 264.7;
- Determinar o IC_{50} dos compostos avaliados na infecção *in vitro* de *L. braziliensis* em macrófago RAW 264.7;
- Realizar modelagem *in silico* das proteínas LbCKI, LbCRK3, LbGSK, LbMAPK, LbPKA e LbSRPK frente a interação proteína-ligante dos compostos que apresentaram atividade leishmanicida;
- Construir uma árvore filogenética para cada proteína utilizando sequências de proteínas de tripanossomatídeos, mamíferos, planta e levedura.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Leishmanioses

Leishmanioses são doenças da classe das antropozoonoses, sendo transmitida do animal para o homem através da picada de um inseto flebotomíneo fêmea infectado com o protozoário do gênero *Leishmania*. Assim como existem diferentes espécies deste gênero, a doença se manifesta de diferentes formas baseadas em qual espécie o indivíduo ou animal está infectado. Em geral é relatado entre 700 mil a 1 milhão de novos casos por ano em todo o mundo, tendo maior incidência nos países menos desenvolvidos, carentes de saneamento básico, com menores recursos financeiros e em populações subnutridas (WHO, 2023).

Outro problema relacionado às leishmanioses, e que em muitos casos é causador de quadro graves e complexos da doença, são ocorrências de coinfeção em indivíduos imunossuprimidos, como é o caso de indivíduos soropositivos para o HIV. Devido a maior debilidade do sistema imune, estes indivíduos são altamente susceptíveis a infecções e casos de recaídas de seus quadros de saúde. Em 2021, a OMS relatou casos de coinfeção *Leishmania*-HIV em 45 países, sendo países como Brasil, Etiópia e Índia, responsáveis por altas taxas de casos (WHO, 2023).

Existem três formas principais de desenvolvimento da doença. A forma cutânea é a mais predominante, sendo responsável por causar úlceras na pele, no local da picada, podendo progredir para estágios mais graves se não tratada. A forma mucocutânea também irá afetar a superfície da pele, mas direciona-se para região das mucosas, como boca, nariz e garganta, causando lesões deformantes nos indivíduos infectados, sendo responsável por um grande estigma social. A forma mais letal e agressiva é a leishmaniose visceral ou calazar, que afeta os órgãos internos, principalmente fígado e baço, levando à morte se não tratada de forma adequada.

Em 2022 dados levantados pela Organização Mundial de Saúde, indicaram que a leishmaniose cutânea encontra-se endêmica em 90 países (Figura 1), dentre eles: Brasil, Venezuela, México, Irã, além de diversos países do Continente Africano, sendo o Afeganistão o país com maior número de casos reportados, mais de 58 mil. A OMS estima que há ocorrência de cerca de 600 mil a 1 milhão de novos casos anualmente, porém com a subnotificação, somente 200 mil são relatados. A forma mucocutânea não é tão prevalente e não há tantos relatos e análises, porém estima-se que 90% dos casos estão presentes na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2023)

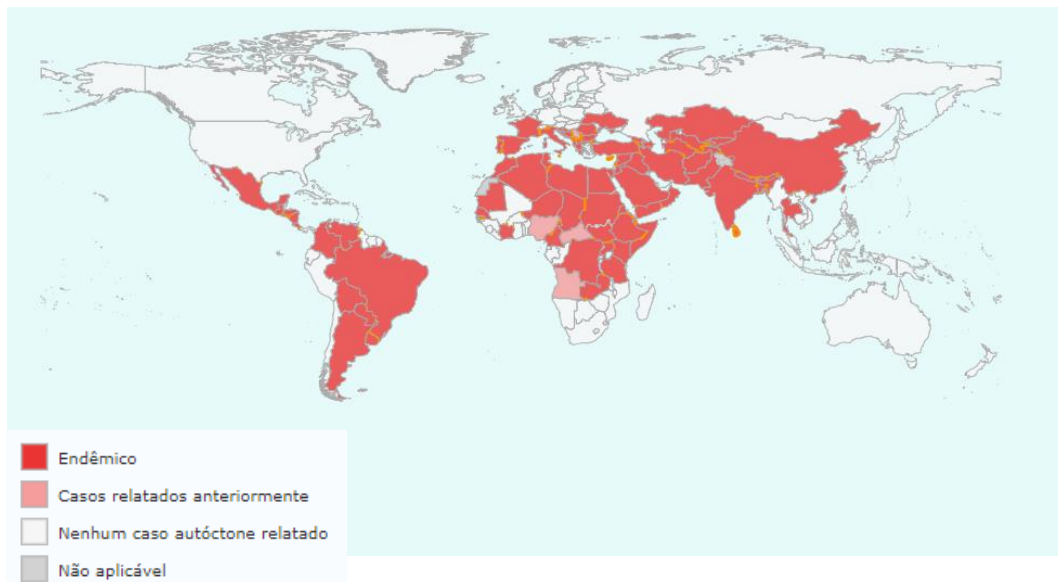
Figura 1 – Distribuição global do status de endemicidade da leishmaniose cutânea.



Fonte: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Leishmaniasis>.

Em relação à leishmaniose visceral, dados de 2022, da OMS, revelaram que há endemicidade da doença em 80 países (Figura 2), dentre eles: Brasil, Bolívia, Quênia, Etiópia, Índia, dentre outros, com um número total de novos casos anuais em torno de 50 a 90 mil. O Sudão foi relatado como o país com maior número de casos reportados em 2022, com mais de 4 mil casos, enquanto o Brasil fica apenas no segundo lugar com mais de 1600 novos casos. Há muita subnotificação, estimando-se que apenas 25 a 45% dos casos sejam relatados, devido à dificuldade no diagnóstico e identificação correta da doença. O que devido à sua letalidade aumenta o risco de surto epidêmico e de mortalidade (WHO, 2023).

Figura 2 - Distribuição global do status de endemicidade da leishmaniose visceral.



Fonte: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Leishmaniasis>.

Além das formas principais da doença, existem algumas complicações que podem surgir após o tratamento fazendo com que estes indivíduos infectados permaneçam como potenciais transmissores. Este é o caso da leishmaniose dérmica pós-calazar ou pós-leishmaniose visceral, que é definida como lesões ou pústulas causadas por erupções cutâneas na região da face, braços e tronco, que ocorrem em indivíduos que passaram pelo tratamento para a leishmaniose visceral aproximadamente 6 meses após o término do tratamento, o que indicaria que possivelmente o indivíduo estaria “curado” da doença. Porém, os sintomas foram tratados, mas os parasitos permaneceram vivos e replicando no organismo do indivíduo, que se encontra assintomático. É relatado que estes indivíduos apresentariam uma carga parasitária muito superior os tornando “super transmissores” e, portanto, seriam responsáveis pela transmissão de formas mais graves da doença (COURTENAY et al., 2017)

3.2. Ciclo de vida do parasito

Dentre as principais espécies transmissoras das leishmanioses, temos: *L. donovani* e *L. infantum chagasi* causadoras da leishmaniose visceral; *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. major* e *L. mexicana*, causadoras da leishmaniose cutânea. A transmissão destes parasitos ocorre através da picada de insetos da família *Psychodidae*, com variação das espécies dos vetores para cada espécie de *Leishmania* e para os diferentes continentes, em que estão localizados. Os principais gêneros de vetores transmissores do parasito e consequentemente da doença, são os gêneros *Phlebotomine* e *Lutzomyia* (Tabela 1), que se diferenciam pela presença no Velho Mundo (Ásia, África e Europa) e no Novo Mundo (América do Sul, Norte e Central), respectivamente (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022; WHO, 2023).

Tabela 1 - Relação flebotomíneo x *Leishmania* de algumas espécies de *Leishmania*, com abreviação do gênero do flebotomíneo de acordo com Marcondes (2007).

Flebotomíneo	Parasito	Tipo de Leishmaniose	Presença
<i>Lu. longipalpis</i> , <i>Lu. cruzi</i>	<i>L. infantum chagasi</i>	Visceral	Novo Mundo
<i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. migonei</i> , <i>Lu. neivai</i> , <i>Lu. carrera</i>	<i>L. braziliensis</i>	Cutânea	Novo Mundo
<i>Lu. flaviscutellata</i>	<i>L. amazonensis</i>	Cutânea	Novo Mundo
<i>Lu. olmeca</i> , <i>Lu. ayacuchensis</i>	<i>L. mexicana</i>	Cutânea	Novo Mundo
<i>Ph. papatasi</i> , <i>Ph. duboscqi</i>	<i>L. major</i>	Cutânea	Velho Mundo

<i>Ph. argentipes</i>	<i>L. donovani</i>	Visceral	Velho Mundo
<i>Ph. perniciosus,</i>	<i>L. infantum</i>	Visceral	Velho Mundo

Fonte: (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022)

O ciclo de vida do parasito inicia-se após a picada de um flebotomíneo fêmea em um hospedeiro contaminado, ocorre a ingestão do parasito na sua forma amastigota, que é caracterizada pela morfologia mais arredondada com ausência de flagelo e pouca ou nenhuma motilidade. *In vivo* essa forma é encontrada somente no hospedeiro. As características do organismo e a ocorrência da infecção promovem um ambiente ideal para o seu estabelecimento.

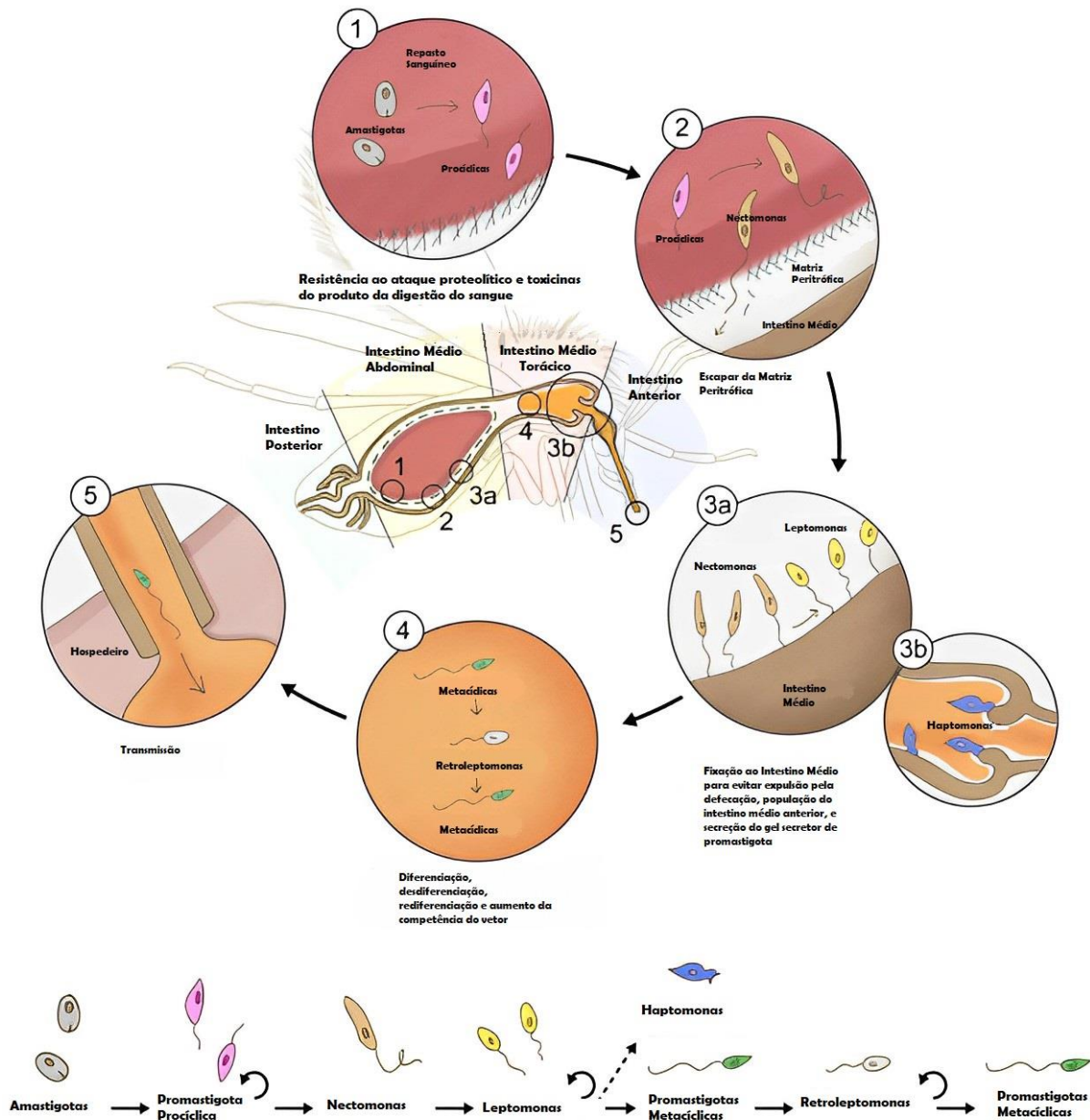
Após a alimentação os parasitos serão transportados pelo sistema digestivo do vetor como mostrado na Figura 3, ficando armazenados no intestino médio (IM), internamente na matriz peritrófica, juntamente com o repasto sanguíneo. Neste ambiente ocorrerá diferenciações que têm como objetivo a replicação, adaptabilidade e sobrevivência do parasito. Ao estar armazenada no espaço endoperitrófico o parasito na forma amastigota irá se diferenciar para a forma promastigota procíclica (Figura 3 (1)), forma em que há o surgimento de um flagelo curto e corpo mais esférico, que se replica rapidamente. Este processo ocorrerá por vários dias após a alimentação sanguínea. Haverá então o deslocamento da matriz peritrófica do epitélio intestinal, promovendo o desenvolvimento do parasito e fazendo com que haja diferenciação para a forma nectomona, caracterizado por um corpo alongado e flagelo de maior ou igual tamanho. A função desta forma será perfurar a matriz peritrófica e aderir-se às microvilosidades do epitélio intestinal para evitar a eliminação juntamente com o bolo alimentar (Figura 3 (2)). Para replicar e aumentar o número de parasitos, o mesmo irá diferenciar-se no espaço exoperitrófico, para a forma leptomona (Figura 3 (3a)), corpo mais curto e largo, com flagelo de mesmo tamanho. A próxima forma de diferenciação são as haptomonas, que são caracterizadas por corpo mais largo e curto e flagelo curto (Figura 3 (3b)), facilitando a adesão às vilosidades da válvula estomodeal, promovendo uma pressão e obstruindo a válvula o que permite a regurgitação. A forma final de infecção será determinada através da metacicloênese com a diferenciação para a promastigota metacíclica (Figura 3 (4)) que é caracterizada por um corpo curto e fino e flagelo alongado, estando presente no intestino médio torácico na válvula estomodeal (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022; MARQUARDT et al., 2004).

Após todos os passos de diferenciação e metacicloênese o parasito já estará na forma final e infectiva, que será transmitida para um novo hospedeiro quando houver uma nova alimentação. No entanto, estudos evidenciam que haverá uma nova etapa de modificações na

morfologia do parasito, que será definido quando há uma alimentação subsequente à primeira. Este fato ocorre devido à renovação dos nutrientes do bolo alimentar, que promoverá uma desdiferenciação das formas metacíclicas para a forma retroleptomona, a função desta desdiferenciação será a replicação do número de parasitos, com a rediferenciação subsequente para promastigota metacíclica (Figura 3 (4)). Esses passos farão com que a carga parasitária aumente, promovendo uma transmissão para o hospedeiro vertebrado da forma mais aguda da doença (Figura 3 (5)) (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022; COURTENAY et al., 2017). Quando transmitida para um hospedeiro vertebrado, haverá a internalização dos parasitos nas células de defesa, como os macrófagos, com diferenciação para a fase amastigota, em que irá se replicar internamente nas células do hospedeiro, promovendo a lise destas células e posterior migração para uma nova (BATES, 2018).

No entanto, quando cultivada *in vitro* o ciclo de vida do parasito não passará por tantas diferenciações, estando presente em apenas 4: amastigota axênica, amastigota, promastigota procíclica, promastigota metacíclica. A fase amastigota axênica ocorrerá com manipulação do meio de cultivo, quanto a temperatura, composição e pH, simulando a infecção, promovendo assim um ambiente próprio para a diferenciação forçada, sem que haja uma infecção. O parasito estará na fase promastigota procíclica quando mantida em cultura em meio de cultura característico para a fase e manutenção comumente definida a 25° C (+/- 1° C), no correspondente a fase log ou exponencial, replicativa e com alta densidade celular. Com o passar dos dias, esta cultura irá alcançar um pico de crescimento e estagnar-se, definido pela fase estacionária, identificado pela diferenciação do parasito para a forma promastigota metacíclica, infectiva. A fase amastigota internalizada, se dará quando aplicada em testes de infecção em macrófago *in vitro*, em que o parasito irá se diferenciar devido ao ambiente apresentado, partindo da fase promastigota metacíclica na infecção e diferenciando para a fase amastigota internalizada no macrófago.

Figura 3 - Ciclo de vida do parasito.



Legenda: A imagem retrata as fases de diferenciação do parasito desde a alimentação do flebotômio de sangue infectado com formas amastigotas do parasito, formando o repasto sanguíneo no intestino médio abdominal havendo diferenciação para a forma promastigota procíclica replicativa (1), após alguns dias de alimentação haverá rompimento da matriz peritrófica e diferenciação para a fase nectomona, que irá aderir-se às microvilosidades do epitélio intestinal (2), com função de replicação o parasito irá se diferenciar no espaço exoperitrófico para a forma leptomona (3a), enquanto alguns parasitos irão aderir às vilosidades da válvula estomodeal para a fase haptomona (3b) aumentando a pressão e permitindo a regurgitação. A fase final da diferenciação será através da metacicloênese, com a diferenciação para a promastigota metacíclica (4). Em alguns casos, quando o flebotômio ingere uma segunda alimentação antes de regurgitar os parasitos diferenciados, a presença do novo sangue fará com que haja a desdiferenciação modificando os parasitos para a fase replicativa retroleptomona que se rediferenciará novamente para a promastigota metacíclica e infectando um novo hospedeiro através de uma nova alimentação do vetor (5). Imagem adaptado de (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022).

3.3. Formas de Tratamento

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde, os tratamentos existentes para leishmanioses irão variar na escolha do fármaco dependendo da apresentação clínica, da espécie causadora da doença, da faixa etária do paciente e da análise do histórico médico. Além de ser necessário estar atento quanto à eficácia do tratamento, desenvolver um bom esquema terapêutico, conferir a toxicidade, que é um dos principais problemas quanto à utilização dos tratamentos atuais, custo e aceitabilidade pelo paciente, visto a forma de aplicação do medicamento. A leishmaniose é uma doença tratável e com chance de cura, porém requer que o indivíduo esteja imunocompetente, pois os medicamentos não eliminam o parasita do organismo completamente, dessa forma aumenta o risco de recaída caso ocorra imunossupressão (PAHO, 2022; WHO, 2023).

Atualmente as formas de tratamento mais utilizadas são Antimoniais Pentavalentes (Pentostam, Glucantime, Isetionato de Pentamidina), Anfotericina B (Fungizone), Anfotericina B Lipossomal (AmBisome), Miltefosina, e Tratamentos Combinados.(ARONSON et al., 2017; PAHO, 2022). Alguns dos grandes problemas destes tratamentos são a forma de administração destes que em sua maioria necessitam ser aplicados de forma parenteral, além do tratamento ter uma longa duração e possuir baixa eficácia. Além das diversas comprovações de ocorrência de resistência dos fármacos pelos parasitos (PONTE-SUCRE et al., 2017). Outro problema que contribui para a principal causa para interrupção do tratamento é a alta toxicidade, responsável pelo aparecimento de múltiplos efeitos adversos com hepatotoxicidade, insuficiência renal e cardíaca, nefrotoxicidade, efeitos gastrointestinais, dentre vários outros (PAHO, 2022; PONTE-SUCRE et al., 2017).

Diversas são as reclamações dos pacientes quanto à realização dos tratamentos, muitos estão sujeitos à gastos, devido ao seu deslocamento frequente para hospitais para recebimento do tratamento, visto que os casos de leishmaniose ocorrem em região mais carentes e que muitas vezes o hospital mais próximo fica a quilômetros de distância. Além disso, os tratamentos necessitam ser realizados exclusivamente em ambiente hospitalar. Outra reclamação é quanto ao longo período de tratamento, pacientes afetados pela LC, devido ao grande estigma causado pelas lesões e deformações na pele, relatam grande incidência de sensação de baixa autoestima, preferindo grande parte das vezes por tratamentos mais curtos ou até recorrendo a tratamentos com curandeiros ou terapias holísticas (CARDONA-ARIAS et al., 2017; PAHO, 2022).

Observa-se frequentemente que, ao mencionar a elevada despesa de determinado

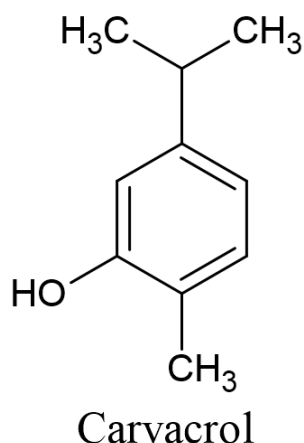
tratamento, o custo associado não está estritamente relacionado ao próprio valor do medicamento, já que em vários países ele é disponibilizado de maneira gratuita. Contudo, é crucial considerar os custos adicionais suportados tanto pelo paciente quanto pela instituição hospitalar, necessários para lidar com os efeitos adversos decorrentes do tratamento para leishmaniose (CARDONA-ARIAS et al., 2017).

Portanto, torna-se evidente a relevância substancial e a imperativa necessidade de pesquisa direcionada à descoberta de novos fármacos, compostos ativos e abordagens terapêuticas que possuam maior eficácia, menor toxicidade, aplicação ou uso mais facilitados, e que verdadeiramente eliminem o parasito, contribuindo efetivamente para a erradicação da doença. Estas características na busca por novos fármacos visam reduzir ou até mesmo impedir a ocorrência de recaídas ou casos de reincidência (BRUNI et al., 2017; CARDONA-ARIAS et al., 2017; PAHO, 2022; PINK et al., 2005; WHO, 2023).

3.4. Carvacrol

O carvacrol (Figura 4) é um álcool monoterpênóide, quimicamente nomeado de 5-isopropil-2-metilfenol com características físico-químicas de baixa solubilidade em solução aquosa, rápida oxidação e volatilização, encontrado nos óleos essenciais de diversas plantas como cominho preto (*Nigella sativa*), orégano (*Origanum compactum*), alecrim (*Lippia sidoides*), dentre outras. Na natureza já foram identificados diversos mecanismos de síntese, capazes de definir diferentes teores da sua composição no óleo essencial.

Figura 4 - Fórmula química estrutural da molécula de Carvacrol.



Em laboratório a sua reprodução é possível e muito requerida, visto a ampla gama de utilizações em que o mesmo pode ser empregado, como propriedades antimicrobianas, cardio, reno e neuroprotetora, modulador da resposta imune, antioxidante, anti-inflamatório,

anticâncer, analgésico, anticonvulsivante, antidiabético; hepatoprotetor e propriedades anti-obesidade (CHEN et al., 2017; MAÇZKA et al., 2023; SAMPAIO et al., 2021; ZIELIŃSKA-BŁAJET; PIETRUSIAK; FEDER-KUBIS, 2021).

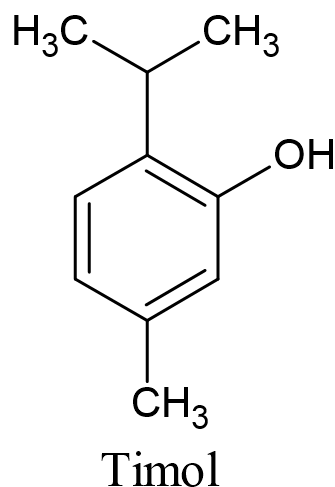
Em estudos anteriores esta molécula mostrou capacidade de ação sobre diversas vias de sinalização, atuando em proteínas cinase como MAPKs e PI3K/AKT/mTOR, CDK em células de câncer, reduzindo a viabilidade celular, proliferação e induzindo apoptose (SAMPALIO et al., 2021; ZIELIŃSKA-BŁAJET; PIETRUSIAK; FEDER-KUBIS, 2021).

Em estudo realizado por Galvão (2020), foi extraído óleo essencial de *Chenopodium* que possui em sua composição o carvacrol como um dos principais componentes. Para análise da atividade leishmanicida fez-se o teste com diferentes formas, amastigota internalizada e promastigota da *L. amazonensis* e tanto o óleo essencial, quanto o próprio carvacrol comercial, foram capazes de agir contra o parasito. Assim como outros estudos que mostram que o carvacrol puro utilizado em teste de citotoxicidade tanto na infecção quanto na forma promastigota apresentou redução considerável na sobrevivência do parasito (COSTA et al., 2023). Devido à insolubilidade do carvacrol puro, diversos estudos realizam técnicas de encapsulamento com nanopartículas ou micelas, para garantir que o composto seja internalizado no macrófago, possua ação leishmanicida, porém com redução da toxicidade devido a proteção destas barreiras físicas (BRUNI et al., 2017; COSTA et al., 2023; MAÇZKA et al., 2023). Por isso, o *design* de derivados dessas moléculas são tão importantes, como possibilidades de se obter formas que possam ser mais solúveis, menos tóxicas, mas que apresentem o mesmo potencial leishmanicida do original.

3.5. Timol

O timol (Figura 5) é um isômero planar do carvacrol. Um monoterpeneo, quimicamente nomeado de 2-isopropil-5-metilfenol, constituinte principal do tomilho (gênero *Thymus*), possui características físico-química se ser solúvel em álcoois, soluções alcalinas e outros solventes orgânicos, enquanto apresenta ser levemente solúvel em soluções aquosas (NAGOOR MEERAN et al., 2017). Este composto já é a séculos fortemente utilizado pela medicina tradicional no tratamento de diversas afecções a saúde e no tratamento de doenças. Assim como o carvacrol, o timol também possui diversas atividades biológicas comprovadas, como antimicrobiano, anti-inflamatório, antioxidantes, eliminadoras de radicais livres, analgésicas, antiespasmódicas, antifúngicas, antissépticas e antitumorais (MORSELLI et al., 2020; NAGOOR MEERAN et al., 2017; SAMPAIO et al., 2021).

Figura 5 - Fórmula química estrutural da molécula de Timol.



Em 2015, Armas e colaboradores realizaram uma pesquisa com óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) e timol comercial, com aplicação por meio de tubo intragástrico em camundongo Balb/c infectado com *Trypanosoma cruzi* no 8º dia de infecção. Após 28 dias de infecção e tratamento, foi detectado uma redução significativa no número de amastigotas internalizadas no tecido cardíaco. Na doença de Chagas a invasão e dano no tecido do hospedeiro é a indicação inicial da progressão da doença, e com o tratamento realizado foi identificado uma modulação na atividade dos macrófagos com o aumento significativo da proliferação dos esplenócitos. A inflamação do tecido cardíaco é a característica chave para a patologia da doença de Chagas, portanto a redução dos infiltrados inflamatórios no tecido do coração que foi relatado como estando diretamente relacionado com a utilização do óleo essencial de *Thymus vulgaris*, assim como o uso isolado do seu ingrediente timol, torna o uso do timol muito promissor para o tratamento da doença de Chagas (ARMAS; AGÜERO; PACHECO, 2015).

Dessa forma, tem-se evidências que comprovem a grande importância e relevância na síntese de compostos derivados do timol para análise de potencial atividade leishmanicida.

3.6. Utilização de proteínas cinase como alvos de tratamento

Visto que parasitos do gênero *Leishmania*, assim como os outros tripanossomatídeos, estão classificados filogeneticamente como organismos que surgiram com a evolução dos eucariotos, e devido à sua localização filogenética, esses parasitos possuem uma série de características muito semelhantes aos eucariotos, tanto na organização como na expressão de genes (BARRAL; COSTA, 2011).

Devido ao complexo ciclo de vida de parasitos como *Leishmania*, *Plasmodium* e

Trypanosoma, que possuem uma intrincada transição entre vetor inseto e hospedeiro mamífero, com diferenciações em sua morfologia ao longo do processo. Diversos estudos já foram realizados analisando alterações quanto a expressão de proteínas em determinados momentos do ciclo de vida, que seriam possivelmente responsáveis pela adaptação aos diferentes ambientes e condições, como por exemplo MAPK e CRK3 (BAKER et al., 2021; PARSONS et al., 2005). Em estudos de 2013, TSIGANKOV et al., identificaram que a transdução de sinal mediada por fosforilação pode ser um fator chave para regulação da função proteica, podendo agir diretamente na diferenciação de parasitos do gênero *Leishmania*. Como a fosforilação é essencial para diversos processos celulares, a inibição das proteínas cinases, poderia levar a uma alteração na regulação do metabolismo. As proteínas cinase são tipos de proteínas que atuam como reguladores importantes de muitos processos celulares diferentes, como controle transcricional, progressão e diferenciação do ciclo celular (NAULA; PARSONS; MOTTRAM, 2005; RACHIDI et al., 2014; TIRADO-DUARTE et al., 2018).

Foram identificadas 195 proteínas cinases presentes em *Leishmania*, que foram divididas em 6 grupos: CMGC, AGC, CAMK, STE, NEK, CK1; estes foram selecionados devido a conservação do domínio catalítico das proteínas, além de um sétimo grupo identificado como Outros, contendo proteínas eucarióticas importantes com funções de transdução de sinal (BAKER et al., 2021). Diversas proteínas cinase desses grupos já foram comprovadas como responsáveis pela manutenção da sobrevivência do parasito, sendo assim de grande importância o estudo das mesmas como possíveis alvos para tratamento, visto que há comprovação que, por exemplo, poderiam interferir na diferenciação para a forma amastigota que estará presente no hospedeiro mamífero, ou mesmo participando da regulação da sobrevivência desta forma quando já presente na infecção, internalizadas em macrófagos. Por isso fez-se uma seleção baseada na literatura de 6 proteínas cinases que poderiam atuar como potenciais alvos de tratamento.

3.6.1. AKT-like cinase - PKA

A cinase AKT-like presente no gênero *Leishmania* spp. é uma proteína citoplasmática ortóloga do grupo da *serine-treonine kinase* B, responsável pela manutenção da sobrevivência dos parasitos. Tirado-Duarte et al. (2018) comprovou através de testes com inibidores específicos da AKT cinase que a inibição do domínio PH da cinase em *L. panamensis* promovia o bloqueio da fosforilação da mesma, levando o parasito a morte em um processo semelhante a apoptose. O grupo de pesquisa ainda confirmou por meio de análise de sequência por alinhamento no *software Clustal Omega*, de 4 espécies de *Leishmania* que

havia alta conservação na sequência da proteína em todas as espécies, indicando que provavelmente esta cinase poderia atuar como um forte alvo em todas as espécies (TIRADO-DUARTE et al., 2018).

Em *T. cruzi* foi identificada uma proteína semelhante a AKT, que poderia estar relacionada com a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, que já foi identificada como uma via de sinalização muito importante para diversos processos biológicos responsáveis pela sobrevivência celular, proliferação e diferenciação, além de apresentarem diferenças significativas para a AKT humana, podendo ser desta forma, um alvo muito promissor para o tratamento da doença de chagas (OCHOA et al., 2018).

No tratamento de doenças, as proteínas cinase AKT, já foram diversas vezes relacionadas como alvo de fármacos com resultados positivos. Em uma revisão sistemática foi encontrado diversas pesquisas envolvendo o tratamento de câncer, confirmando que compostos derivados do carvacrol e timol foram responsáveis pela redução da proliferação, migração e invasão de células cancerígenas através da modulação da via de sinalização de PI3K/AKT e MAPK. Testes em linhagens tumorais diferentes comprovaram que a ação destes compostos sobre a via de sinalização PI3K/AKT e MAPK foi muito positiva, e capaz de impedir a progressão e desenvolvimento das células (SAMPAIO et al., 2021).

3.6.2. CRK3 – Cinase relacionada a ciclina

Dentre as diferentes famílias, temos as cinases dependentes de ciclina (CDK) pertencentes às *serine-treonine kinase*, nos eucariotos superiores a família de proteína CDK age nos limites entre a diferenciação do ciclo celular e na prevenção de transição prematura ou inapropriada. Sua regulação é feita através da ligação com ciclina e fosforilação (NAULA; PARSONS; MOTTRAM, 2005; PARSONS et al., 2005).

Esta é uma família relativamente grande de proteínas em tripanossomatídeos, com 12 proteínas CDKs, o que pode refletir a complexidade da divisão celular do parasito e também a necessidade de integração ao desenvolvimento do ciclo de vida em que o parasito oscila entre a fase proliferativa e a fase infectiva. O entendimento da biologia celular de parasitos protozoários do gênero *Leishmania* relativamente quanto ao ciclo celular permanece particularmente inexplorado. Fundamentalmente o ciclo celular do parasito é o mesmo em todos os eucariotos quanto ao crescimento, replicação de DNA, mitose e citocinese. Organismos do gênero *Leishmania* possuem diversos ortólogos de proteínas cinases que têm sido mostradas como peças essenciais no controle do ciclo celular eucariótico incluindo a família CDK (GRANT et al., 1998; HASSAN et al., 2001).

Apesar do grande número de proteínas, denominadas CRK (cinase relacionada a ciclina), apenas 2 demonstraram ser essenciais para progressão do ciclo celular, dentre elas a CRK3 que apresenta diferentes funções quanto a progressão em diferentes fases da mitose quando ligada à ciclinas como CYC6 e CYC2. Dentre essas a CRK3 é a melhor descrita da família da CDKs, possuindo uma regulação com mecanismos similares a outras CDKs visto que possui um domínio de ligação a ciclina conservado e 3 sítios de fosforilação regulatório quando se comparado a CDK de humano. Dessa forma pode-se concluir que é uma proteína cinase de fundamental importância no funcionamento do organismo do parasito, sendo também um possível importante alvo para mecanismo de ação de fármacos antileishmania (GRANT et al., 1998, 2004; HASSAN et al., 2001; XINGI et al., 2009).

HASSAN et al. (2001), comprovaram que a CRK3 é essencial para replicação e sobrevivência do parasito *L. mexicana* através da deleção do gene da proteína, porém de apenas um alelo, pois a deleção de ambos causava mudanças significativas quanto a mudanças de ploidia nas células transfectadas. Eles concluíram que o gene é essencial para o pleno funcionamento do ciclo celular do parasito. Apenas os parasitos que possuíam ao menos uma cópia do gene sobreviveram, pois quando foi adicionado CRK3 extracromossômico no parasito antes da interrupção do segundo alelo de CRK3 nativo, não houve alteração de ploidia, mostrando que o problema seria da ausência de ao menos uma cópia do gene e não do produto da transfecção. Para testar se a CRK3 atuava como essencial para o parasito, HASSAN et al., (2001) ainda testaram como seria a reação do parasito quando exposto a um inibidor de CDK, o Flavopiridol, um fármaco já utilizado em testes clínicos como droga anti-câncer. Nos testes *in vitro* o Flavopiridol foi capaz de inibir a atividade da proteína CRK3 purificada e impedir o crescimento do parasito. Através de ensaios de citometria foi capaz de identificar que a ação do fármaco sobre o parasito foi através da paralisação do mesmo na fase G2/M do ciclo celular (HASSAN et al., 2001).

GRANT et al. (2004) também comprovaram que a ação dos inibidores contra a CRK3 foram muito bem-sucedidos quanto a inibição do crescimento do parasito, inclusive demonstrando que a inibição da CRK3 pode induzir a redução da viabilidade do parasito internalizado no macrófago, fazendo com haja redução da infecção, sendo extremamente promissor o estudo de inibidor seletivos. Desta forma pode-se concluir que a CRK3 é um excelente alvo para se estudar quanto possível ação de compostos com atividade leishmanicida, visto sua fundamental importância no ciclo celular do parasito.

3.6.3. Caseína cinase (CK)

As caseína cinases fazem parte de uma família de proteínas cinases Ser/Thr multifuncionais que são caracterizadas por um domínio cinase altamente conservado e um domínio C-terminal específico implicado na sua regulação e localização (KRÖBER-BONCARDO et al., 2020; RACHIDI et al., 2014). A isoforma CK 1.2 é a mais abundante em *Leishmania* e a mais estudada. Rachidi et al. (2014) realizaram a comparação das sequências da isoforma CK 1.2 entre as espécies de *L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. mexicana* e *L. braziliensis* que apresentam 99% de identidade entre si, o que foi relatado de que há uma alta conservação na sequência de aminoácidos, apresentando uma maior sensibilidade contra mutações neste gene para manutenção da funcionalidade, que poderia indicar uma função fisiológica essencial para a sobrevivência do parasito (ALLOCCO et al., 2006; RACHIDI et al., 2014).

A utilização de inibidores específicos contra a CK1 testados nas formas amastigota e promastigota, apresentou atividade citotóxica e citostática, nas respectivas formas (ALLOCCO et al., 2006). Porém em análise quanto a morfologia e densidade celular, evidenciou-se que a CK1 não é tão relevante no estágio de vida da forma promastigota, mas em relação a forma amastigota, a ação contra a proteína CK1 possivelmente está relacionada com uma relevância crucial no estágio de diferenciação para a forma amastigota, o que se mantém ao longo do processo (RACHIDI et al., 2014).

Em testes realizados por (HOMBACH et al., 2014) com a deleção do gene de HSP23^{-/-} uma pequena proteína de choque térmico, comprovada como substrato da proteína CK1, foi identificado que os parasitos sofreram perda da viabilidade na temperatura de 37° C, redução da tolerância ao estresse químico e crescimento reduzido, mostrando que esta proteína é um requisito crucial para a sobrevivência do parasito nas condições de temperatura do hospedeiro mamífero. KRÖBER-BONCARDO et al., em 2020, testou como a superexpressão da CK1.2 poderia alterar o comportamento das cepas de *Leishmania* mutante com HSP23^{-/-}, e foi identificado uma reversão espontânea do fenótipo sensível à temperatura, mostrando que a HSP23 age como substrato da CK1.2, mostrando uma ligação entre a sinalização mediada pela proteína cinase e a maquinaria de chaperonas de *Leishmania*.

Estes dados comprovam a importância da proteína caseína cinase no ciclo de vida e sobrevivência do parasito, sendo desta forma, de extrema importância a análise de compostos com atividade leishmanicida com alvo nesta cinase.

3.6.4. Glicogênio sintase cinase (GSK)

A proteína Glicogênio sintase cinase é uma proteína da classe *Serine-threonine kinase* que foi identificada como uma proteína cinase que inativa a glicogênio sintase, além desta funcionalidade, ela também atua com um importante papel nas vias de sinalização Wnt e Hedgehog e regulam o ciclo de divisão celular, renovação e diferenciação de células-tronco, apoptose, ritmo circadiano, transcrição e ação da insulina em eucariotos superiores, sendo utilizada como alvo de diversas doenças como diabetes melittus e Alzheimer (MEIJER; FLAJOLET; GREENGARD, 2004; OJO et al., 2008; STAMBOLIC; WOODGETT, 1994).

OJO et al. (2008) mostraram que o parasito *T. brucei*, causador da Tripanossomíase africana, possui duas formas da proteína GSK, divididas em gene curto e gene longo, a porção do gene curto foi validado genética e quimicamente como um bom possível alvo para tratamento da doença. Experimentos realizados pela equipe com a utilização de RNAi demonstraram significava inibição de crescimento do parasito na forma sanguínea, o que representa uma interferência quanto a infecção. O estudo ainda apresentou que uma série de inibidores de cinase direcionados contra GSK3 tiveram resultado positivo quanto a atividade celular anti formas sanguíneas de *T. brucei*, porém não podiam afirmar com total certeza se a ação estaria sendo direcionada apenas a GSK, visto que possui evidências de ação contra CDK, por estes mesmos inibidores. (GRANT et al., 2004; OJO et al., 2008; POLYCHRONOPOULOS et al., 2004; TU; WANG, 2005)

XINGI et al. (2009) mostraram que para *L. donovani* também há evidências que inibidores de GSK promoveram a morte do parasito induzido por mecanismo semelhante à apoptose, sendo responsável pela inibição do crescimento tanto de formas promastigotas, quanto nas formas amastigota intracelular. Este estudo apresentou ainda que os inibidores de GSK também atuaram sobre a proteína CRK3, evidenciado pelo acúmulo dos parasitos nas fases G2/M do ciclo celular, mostrando a possibilidade de participação da proteína GSK na progressão do ciclo celular, e que a maior ação sobre a fase amastigota internalizada comprova a proteína GSK como um excelente alvo para um possível tratamento para a leishmaniose.

3.6.5. Mitogen-activated protein cinase (MAPK)

Proteína cinase ativada por mitógeno, são proteínas membros da família de serina-treonina cinase comum em todos os eucariotos com função de mediador da transdução de sinal de estímulos externos, como mitógenos, citocinas pró-inflamatórias, choque térmico.

Estando presente em diversas vias de sinalização, regulando atividades celulares críticas, como proliferação celular, diferenciação, mortalidade, resposta ao estresse e apoptose (KAUR et al., 2017; MANNING et al., 2002).

Em *Leishmania* 15 genes de MAPK já foram identificadas, porém somente algumas delas foram associadas às funções específicas no ciclo de vida do parasito. Na espécie *L. mexicana* encontraram formas de MAPK apresentando diferentes tipos de funções como: manutenção da sobrevivência de amastigotas dentro de macrófagos de mamíferos, regulação do comprimento do flagelo, além de participar da resistência ao antimônio, controle da diferenciação e nível de virulência, dentre outros (ASHUTOSH et al., 2012; ERDMANN et al., 2006; KAUR et al., 2017; KUHN; WIESE, 2005). Porém não havia informações sobre os possíveis substratos destas enzimas. KAUR et al. (2017), analisaram a proteína MAPK1 de *L. donovani* que possivelmente age na regulação de proteínas de choque térmico, e identificaram pela primeira vez que HSP70 e HSP90 agem como substratos da MAPK.

AIEBCHUN e associados, (2023) mostraram que drogas anticâncer apresentaram atividade inibitória contra a MAPK3 de *L. donovani*, que é uma proteína essencial na regulação do tamanho do flagelo, com fundamental importância na transmissão da doença. As duas drogas utilizadas no estudo conseguiram inibir a atividade *in vitro* tanto de *L. donovani*, quanto da *L. martiniquensis* em ambos os estágios do ciclo de vida, promastigota e amastigota. O estudo ainda realizou a análise *in silico* da interação da proteína MAPK3 com os fármacos afatinib e lapanitinib mostrando que ambos apresentavam fortes interações, o que foi comprovado através da expressão da MAPK3 de *L. donovani* com teste da atividade de inibição relativa da proteína expressa na presença das drogas, o que comprova que a MAPK3 é fundamental para a sobrevivência do parasito, sendo um excelente alvo farmacológico.

3.6.6. Proteína Serina-arginina cinase (SRPK)

SRPK é uma importante proteína presente em diferentes organismos, pertencente à família das proteínas serina treonina cinase. Essa classe de enzimas possui a função de fosforilar resíduos de serina e arginina em proteínas-alvo, proteínas SR, desempenhando um papel crucial na regulação do processo de *splicing* do pré-mRNA. É conhecido que a ação das SRPKs ocorre pelo processamento do RNA por *cis-splicing* em humanos, processo este que não ocorre em tripanossomatídeos, que ocorre através de *trans-splicing*. No entanto, PORTAL et al. (2003) comprovaram pela primeira vez a presença de proteína SRPK em *T. cruzi*, altamente conservada com a SRPK de *Homo sapiens*, inclusive sendo homólogas funcionalmente comprovado através de testes *in vitro*. O que poderia indicar que não há

diferenças entre qualquer outra SRPK, e que a função foi conservada através da evolução apesar das diferenças do tipo de *splicing* desempenhado pelos organismos. (PORTAL et al., 2003)

Apesar de não ser da família dos tripanossomatídeos, o estudo de proteínas SRPK de *Plasmodium* evidencia que esta proteína seria responsável pelo controle do processamento do mRNA do parasito, com função conservada também da PfSRPK1 na participação no processo, assim como em *Homo sapiens* (DIXIT et al., 2010). Em 2012, ESHAR et al. comprovaram que a PfSR era responsável pela replicação do parasito em hemácias humanas e que a superexpressão desta proteína poderia estar relacionada com um *splicing* alternativo, além de levar a uma forte inibição do crescimento do parasito, mostrando que há a necessidade de uma forte regulação da proteína para o correto funcionamento.

Em *Leishmania* não se possui informações de como poderia ser a ação das SRPKs, porém PIMENTEL et al., (2023) apresentaram as primeiras evidências de que a SRPK poderia ser uma proteína fundamental para a sobrevivência do parasito, pois em testes utilizando compostos sintéticos derivados do SRPIN340, um inibidor conhecido de SRPK, mostraram ação leishmanicida, sugerindo que a possível inibição de SRPK poderia levar a morte do parasito. Sendo assim, o estudo do padrão de expressão da SRPK em novos compostos com possível atividade leishmanicida poderia reforçar o conhecimento quanto a relevância destas proteínas para a sobrevivência do parasito.

3.7. Análise de bioinformática na modelagem de moléculas para utilização como possíveis fármacos

A utilização da bioinformática como ferramenta de busca e *design* de novos fármacos tem crescido cada vez mais na indústria, devido as inúmeras vantagens oferecidas e ao contínuo avanço da tecnologia. *Softwares* e servidores cada vez mais precisos estão sendo desenvolvidos e aprimorados. Para garantir a maior precisão dos dados gerados é utilizada a classificação *Critical Assessment of Structure Prediction* (CASP) para análise estrutural *in silico* de proteínas. CASP, traduzido para Avaliação Crítica da Predição de Estrutura é uma competição que ocorre a cada 2 anos em que desenvolvedores de *softwares* e grupos de pesquisa serão responsáveis por fornecer a predição da estrutura de uma proteína inédita, que está prestes a ser revelada a estrutura cristalizada. Realizando a comparação da maior proximidade entre a estrutura cristalizada e a estrutura predita, classificando a predição através da análise de diversos critérios a fim de definir o *rank* dos melhores *softwares*. Aqueles que se classificarem como os melhores serão identificados com o número da CASP

em que se classificaram, informando que possuem a capacidade de predição seguindo as tecnologias e inovações estipuladas no último CASP em que se classificaram.

Alguns *softwares* se destacam pela sua atuação nas edições anteriores, dentre eles: *Alphafold2*, classificado com CASP14, edição de 2020, como top 1 e CASP15, edição 2022, dentre os melhores. *Zhang group*, servidor do *iTASSER*, até a edição CASP 12 encontrava-se sempre dentre os primeiros e era utilizado como referência na modelagem de proteínas, porém não conseguiram evoluir com as inovações das edições posteriores. Servidores responsáveis por refinamento e predição de interação também participam das edições, como o *DeepRefiner* e o *Yasara*. (KRIEGER et al., 2009; MIRDITA et al., 2022)

A triagem *in silico* de uma série de compostos contra uma proteína alvo é uma das etapas cruciais no desenvolvimento de fármacos da atualidade. Esta forma de análise possibilita a predição de possíveis interações entre proteína e ligante, permitindo assim que compostos promissores possam ser destacados dos demais, agilizando de forma considerável futuros estudos, e de maneira cada vez mais confiável e reprodutível. As vantagens desta forma de triagem se dão não apenas pela agilidade do processo, que permite testar inúmeros compostos de uma só vez, mas também pelo ponto de vista econômico, que facilitará com que compostos sem potencial não sejam testados inutilmente, apenas gerando gastos financeiros, que podem ser então direcionados para alvos mais promissores (BITENCOURT-FERREIRA; VEIT-ACOSTA; DE AZEVEDO, 2019; BULUSU; DESIRAJU, 2020; HOPKINS; GROOM; ALEX, 2004; KITCHEN et al., 2004; KUMAR; MADISON, 2005; SCRUTTON; RAINE, 1996).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura celular

A cepa modificada de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904-GFP utilizada foi produzida por BASTOS et al., (2017) por meio da inserção do gene da proteína fluorescente verde (GFP) através do sistema pLEXSY-eGFP. A expressão do gene ocorre de maneira constitutiva, desta forma não há necessidade de induzir a fluorescência. Os parasitos foram gentilmente cedidos pela Prof^a. Dra. Juliana Lopes Rangel Fietto da Universidade Federal de Viçosa, e foram mantidos em nitrogênio, com análise de viabilidade a cada 6 meses.

A linhagem RAW 264.7 de macrófago foi utilizada e mantida em estoque em nitrogênio com análise de viabilidade a cada 6 meses.

4.2. Manutenção dos parasitos *in vitro*

Os parasitos *L. braziliensis* M2904-GFP foram mantidos em garrafa de cultura contendo meio Grace's completo pH 6,5 (Grace's Insect Medium, Sigma) suplementado com L-glutamina 2 mM e Penicilina 100 µg/mL com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB) Inativado, esterilizado em membrana de nitrocelulose de 0,22 µM. Os parasitos foram incubados em estufa B.O.D a 25° C.

Para congelamento os parasitos foram cultivados até a fase exponencial de crescimento, transferindo todo o volume da garrafa de cultivo para um tubo de fundo cônico novo estéril de 15 mL e centrifugado a 1600 g por 10 min. O *pellet* foi ressuscitado em 5mL de meio Grace's incompleto (sem SFB) e contados em câmara de Neubauer (diluição de 50x em formalina 4 %), para determinação da concentração de parasito/mL. Após contagem, 1×10^7 parasitos/mL foram adicionados em criotubo contendo 15 % SFB e 10 % dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. Para congelamento rápido os criotubo foram armazenados 30 min em -20° C e *overnight* em -80° C, com armazenamento permanente em nitrogênio líquido.

Para o descongelamento o criotubo armazenado em nitrogênio foi incubado a 37° C por 2 min, para descongelamento rápido. Em seguida, foi diluído por gotejamento, em cabine de segurança biológica, na proporção de 10:1 em meio Grace's incompleto e centrifugado em 1600 g por 10 min para remoção do DMSO. O *pellet* foi ressuscitado em meio Grace's completo com 20 % de SFB para melhor recuperação dos parasitos e transferido para garrafa de cultivo estéril de 25 cm², incubado em estufa B.O.D a 25° C. Após 5 a 8 dias de

recuperação dos parasitos foram realizadas novas contagens em câmara de Neubauer para realização de subculturas a cada 4 a 5 dias com concentração inicial de 1×10^5 parasitos/mL.

4.3. Manutenção dos macrófagos RAW 264.7

A linhagem de macrófago RAW 264.7 foi mantida em garrafas de cultivo contendo meio RPMI completo (RPMI-1640, Sigma-Aldrich), suplementado com Bicarbonato de Sódio 2 g/L, L-glutamina 2 mM, Hepes 25 mM e Penicilina 100 μ g/mL, com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB) Inativado, esterilizado em membrana de nitrocelulose de 0,22 μ M. As células foram incubadas em estufa de CO₂ a 37° C.

Para congelamento as células foram cultivadas até atingir de 80 a 100 % de confluência na garrafa de cultivo, o meio metabolizado foi removido e realizado a lavagem com PBS estéril para remoção das células não aderidas, em seguida foi adicionado meio RPMI incompleto e realizado a raspagem das células com *Cell Scraper* (rodinho). As células em solução dentro da garrafa foram transferidas para um tubo de fundo cônico de 15 mL e contados em câmara de Neubauer (diluição de 20x em PBS estéril e azul de tripan para coloração vital, proporção 180:10:10) para determinação da concentração de células/mL.

Após contagem, 5×10^6 células/mL foram adicionadas em criotubo contendo 15 % SFB e 10 % DMSO estéril. Para congelamento rápido os criotubo foram armazenados 30 min em -20° C e overnight em -80° C, com armazenamento permanente em nitrogênio líquido.

Para o descongelamento o criotubo armazenado em nitrogênio foi incubado a 37° C por 2 min, para descongelamento rápido. Em seguida, foi diluído por gotejamento, em cabine de segurança biológica, na proporção de 10:1 em meio RPMI incompleto e centrifugado em 700 g por 10 min para remoção do DMSO. O *pellet* foi ressuscitado em meio RPMI completo com 20 % de SFB para melhor recuperação das células, transferindo para garrafa de cultivo estéril de 75 cm², e incubado em estufa a 5 % de CO₂ a 37° C. A recuperação das células foi observada através de visualização de microscópio óptico invertido da camada de células aderidas na parede da garrafa, trocando o meio quando o mesmo já se apresentar metabolizado, e realizando o repique ao se observar confluência entre 80 a 100 %.

4.4. Curva de crescimento da *L. braziliensis GFP*

Para identificação das fases de desenvolvimento dos parasitos em cultura, três garrafas de cultivo foram preparadas, partindo do repique de uma garrafa com 4 dias de cultura, estando os parasitos na fase *log*, com concentração inicial de 1×10^5 céls/mL em meio Grace's

completo. Durante o período de 10 dias foi realizada contagem em câmara de Neubauer em triplicata de cada garrafa, com utilização de solução de formalina 4% estéril, diariamente, realizados sempre no mesmo horário. As garrafas foram incubadas a 25°C em estufa B.O.D.. A curva foi então analisada e definida quanto às fases de desenvolvimento: Fase *lag*, *log* e estacionária. Sendo escolhida a fase *log* para manutenção de cultura e a fase Estacionária para os experimentos de infecção.

4.5. Detecção da viabilidade celular em macrófago

A viabilidade celular foi definida com utilização do método de resazurina para os testes de citotoxicidade em macrófagos. A solução de resazurina foi preparada na concentração de 1 mM, dissolvida em PBS e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm (LAVOGINA et al., 2022), mantendo armazenada em geladeira 4°C com proteção da luz. Após o tratamento com os compostos foi aplicado o correspondente a 10% do volume total do poço, faltando 1 h para finalização do tempo do tratamento. A placa permaneceu incubada em estufa 37° C a 5% CO₂ durante 1 h, a revelação da placa foi realizada em espectrofotômetro Spectramax M5 com intervalos de 1 em 1 hr durante 3 h, com leituras simultâneas nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm. As absorbâncias obtidas foram empregadas nas equações:

Primeiro calculou-se a redução de resazurina:

$$\text{Redução} = [A_{570} - (A_{600} \times R_0)]$$

Com A_{570} correspondendo à absorbância no comprimento de onda de 570nm e A_{600} à absorbância no comprimento de onda de 600 nm. R_0 corresponde à média da divisão das absorbâncias do branco nos diferentes comprimentos de onda:

$$R_0 = \frac{A_{570}}{A_{600}}$$

Para cálculo da porcentagem de células viáveis, foi empregado os valores de redução tanto da média das células não tratadas, quanto do cálculo de redução individual de cada poço de tratamento e o valor de R_0 na seguinte fórmula:

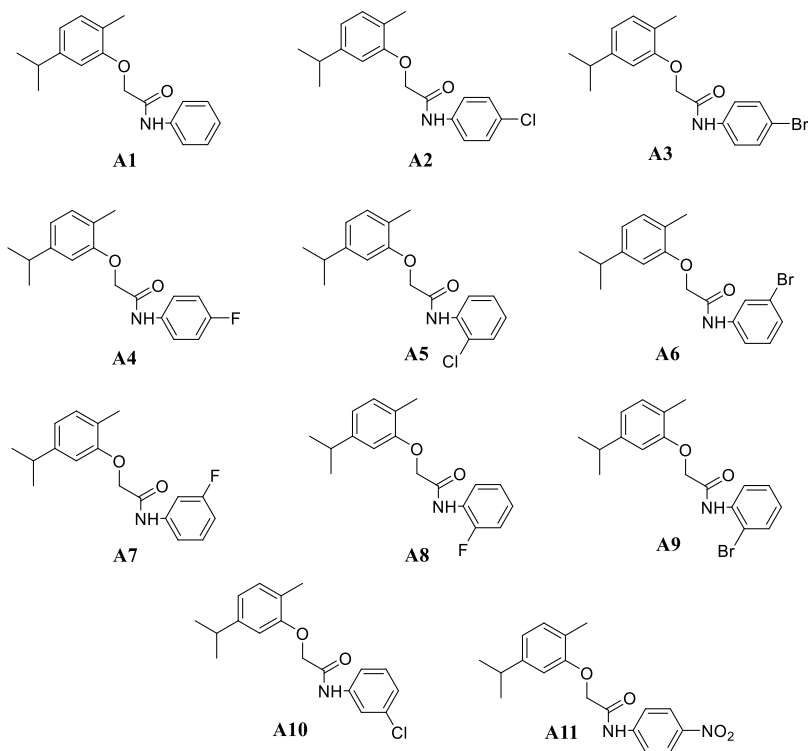
$$\% \text{ Células Viáveis} = \frac{\text{Redução Tratamento} * 100}{\text{Redução não tratado}}$$

4.6. Preparação dos compostos

Os compostos semissintéticos utilizados no presente estudo, foram sintetizados e cedidos pela Prof^ª. Patrícia Fontes do Departamento de Química da Universidade Federal de

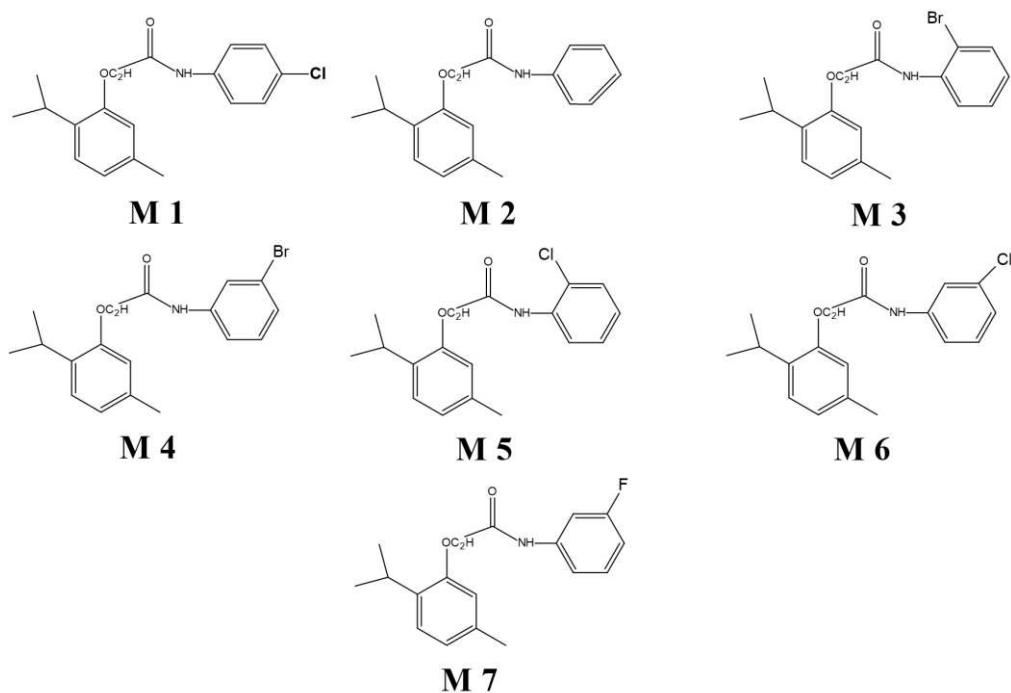
Viçosa, identificados nas Figura 6 e Figura 7.

Figura 6 - Fórmulas químicas estruturais dos compostos classe A.



Legenda: Moléculas derivadas do Carvacrol, abaixo de cada fórmula consta código correspondente do composto.

Figura 7 - Fórmulas químicas estruturais dos compostos classe M.



Legenda: Moléculas derivadas do Timol, abaixo de cada fórmula consta código correspondente do composto.

Os compostos foram recebidos na forma de cristal, e sua massa molar e a massa pesada foram informadas. Todos eles foram direcionados para diluição com o solvente polar Dimetilsulfóxido (DMSO) para a concentração de estoque de 100 mM, e realizou-se diluições subsequentes nas concentrações de 50 mM e 25 mM, em todas estas concentrações o DMSO apresentava-se em 100%. Porém devido à alta insolubilidade em água ou meio de cultivo dos compostos, a solução de trabalho precisou ser calculada de forma a manter uma maior concentração de DMSO possível para reduzir a probabilidade de precipitação dos compostos na solução de trabalho de 0,5 mM. Para isso, preparou-se uma solução de 51% de DMSO em meio RPMI incompleto, aplicando 196 μL desta solução com 4 μL do composto na concentração de 25 mM, colocou-se esta solução em vórtex por 2 min, e deixou armazenada em freezer -20°C . A concentração máxima de DMSO usada nos testes de citotoxicidade foi de 1%, reduzindo à medida que se era realizado as diluições seriadas. Porém para o experimento de infecção a concentração de DMSO foi reduzida, uma vez que a concentração de 1% de DMSO apresenta toxicidade ao parasito, sendo, portanto, utilizado 0,04% de DMSO, como a menor concentração possível no poço, para que houvesse solubilização dos compostos na concentração máxima de 10 μM . O óleo essencial (OE) de carvacrol comercial foi preparado em questão da sua massa, com concentração inicial de 10 mg/mL em 100% de DMSO, passando para diluições subsequentes terminando em 100 $\mu\text{g/mL}$ do óleo com 1% de DMSO.

4.7. Ensaio de citotoxicidade em macrófago RAW 264.7

Partindo de uma garrafa de cultivo com 80 a 100% de confluência e viabilidade acima de 75 % verificada por contagem em câmara de Neubauer com aplicação de azul de Tripán para coloração vital. Cultivou-se 5×10^4 macrófagos por poço, em placa de 96 poços, com volume total de 200 μL por poço, contendo meio RPMI pH 7,2 completo com 10% SFB, e mantido em estufa 37°C com 5 % CO_2 por 24 h. Após este período a placa foi lavada 3 vezes com 100 μL de PBS estéril pH 7,4, para remoção das células que não estivessem aderidas. Em seguida, foi aplicado os tratamentos na placa, sendo os compostos definidos no item 4.6, tendo separado em quadruplicata poços de controle de: meio RPMI completo (branco); macrófago sem tratamento; macrófago tratado com DMSO 1%; macrófago tratado com Anfotericina B (3,125 μg). Os compostos foram testados na triagem na concentração de 10 μM e nos testes de definição da concentração citotóxica de 50% (CC_{50}) as concentrações

testadas foram por diluição seriada a partir de 200 μM até 1,56 μM , o OE de carvacrol, foi utilizado na triagem a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com diluição seriada partindo de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ até 6,10 ng/mL . A placa foi lacrada com parafilme e incubada por 48 h, em estufa 37° C a 5 % CO_2 . Após 47 h de tratamento fez-se aplicação de 20 μL de resazurina 1 mM e deixou incubada em estufa 37° C por 1 h, em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro de hora em hora, durante 3 h. Os dados foram analisados de acordo com o item 4.5.

4.8. Ensaio de infecção *in vitro* de macrófago RAW 264.7 por *L. braziliensis*-GFP

Seguindo o protocolo modificado, definido por BASTOS et al., (2017), a partir de uma garrafa de cultivo de macrófago com 80 a 100 % de confluência e viabilidade acima de 75 % verificada por contagem em câmara de Neubauer com aplicação de azul de Tripán para coloração vital. Foi cultivado 1×10^5 macrófagos por poço, em placa de 96 poços, com volume total de 200 μL por poço, contendo meio RPMI pH 7,2 completo com 10 % SFB, e incubando em estufa 37° C – 5 % CO_2 por 4 h para adesão das células. Enquanto isto, uma garrafa de cultura de *L. braziliensis* GFP no 7° dia de cultivo, estando na fase estacionária foi centrifugada para remoção do meio Grace's por 1600 x g por 10 min, e o pellet foi ressuspendido com meio RPMI completo e feito a contagem com diluição em formalina 4 %. Após o tempo para adesão dos macrófagos, o meio metabolizado foi removido e substituído com 200 μL de meio RPMI completo, novo, contendo $2,0 \times 10^6$ *Leishmania* por poço, fazendo a proporção de 20:1 de *Leishmania* por macrófago para garantir que a infecção ocorra de forma mais efetiva. A infecção ocorreu por 24 h, incubada em estufa 5 % CO_2 – 37° C. Após este período lavou-se a placa 3 vezes com 100 μL de PBS estéril pH 7,4, para remoção das células e parasitos que não aderiram. Após lavagem, foi adicionado meio RPMI completo em todos os poços e incubada por 24 h em estufa 37° C – 5% CO_2 . Em seguida, o meio metabolizado foi descartado e realizou-se a aplicação dos compostos, definido no item 4.6, na concentração de 10 μM por poço no ensaio de triagem, e com os compostos que apresentaram atividade antileishmania foi realizado a diluição seriada a partir da maior concentração permitida de 50,0 μM a 2,93 μM para definição da concentração inibitória de 50% (IC_{50}), tendo realizado todos os testes em triplicata técnica e triplicata biológica. Foi aplicado em quadruplicata técnica poços de controle de: meio RPMI completo (branco); macrófago infectado por *Leishmania* sem tratamento; macrófago infectado por *Leishmania* tratado com DMSO 0,04 %; macrófago infectado por *Leishmania* tratado com Anfotericina B (3,125 μg); macrófago não infectado sem tratamento e macrófago não infectado tratado com Anfotericina. A placa foi lacrada com parafilme e incubada por 48 h, em estufa 37° C – 5% CO_2 . Após 48 h

de tratamento, a placa foi lavada 3 vezes para garantir a remoção completa dos compostos utilizados para o tratamento. Em seguida adicionou-se 50 μ L de meio de lise, composto por meio RPMI pH 7,4 não suplementado, incompleto e com 0,1% de SDS, a lise ocorreu por 40 min, o tempo necessário para lise de aproximadamente 95-100% dos macrófagos. Com interrupção da lise com a aplicação de 150 μ L de meio Grace's completo com 10% de SFB. A placa foi transferida para a B.O.D a 25° C, que é a temperatura ótima de diferenciação dos parasitos para a forma promastigota, permanecendo incubada durante 5 dias. A revelação da placa foi realizada com leitura de fluorescência no equipamento Spectramax M5, com excitação em 490 nm e emissão em 520 nm.

4.9. Análise *in silico*

Baseando nas sequências pré-selecionadas definidas na Tabela 2, as proteínas foram preditas e modeladas com utilização do *software Colabfold* (MIRDITA et al., 2022), que realiza a predição através da análise rápida de homologia através da pesquisa utilizando *Alphafold2*, com alinhamento de sequência sendo gerada utilizando *MMseq2*. O *Alphafold2* foi escolhido por ser um *software online* gratuito de referência na modelagem proteica. Em seguida o resultado obtido foi empregado no *software Yasara* para minimização de energia livre, com a finalidade de se encontrar a estrutura mais estável energeticamente, que é importante para garantir a correta estereoquímica da proteína, a conformação correta, semelhante a conformação nativa e permitindo que a molécula esteja preparada para realização de interações, estando com a energia o mais próximo possível da proteína nativa e então seja realizado o *docking* molecular (KRIEGER et al., 2009).

Tabela 2 - Proteínas de *Leishmania braziliensis* selecionadas no banco de dados de tripanossomatídeos TriTrypDB para análises *in silico*.

Proteína	Código TriTrypDB
LbCKI	LbrM.34.1000
LbCRK3	LbrM.35.0660
LbGSK	LbrM.18.0290
LbMAPK	LbrM.10.0620
LbPKA	LbrM.18.1180
LbSRPK	LbrM.30.3610

Antes da realização do *docking* é necessário a validação da modelagem e minimização de energia, para garantir que o modelo criado e as análises realizadas estejam o mais próximas

possível da realidade. Para isso as proteínas minimizadas pelo *software Yasara* foram empregadas em 4 servidores online, que analisaram diferentes parâmetros para se garantir a maior compatibilidade da estrutura tridimensional modelada, com as estruturas tridimensionais das proteínas cristalizadas, obtendo uma visão da qualidade e confiabilidade dos modelos obtidos. Sendo estes os servidores:

- ERRAT – este servidor é responsável por diferenciar como correta ou incorreta determinadas regiões da proteína com base nas interações atômicas, em uma proteína há a distribuição não aleatória dos átomos, o servidor irá analisar de forma estatística possíveis erros na distribuição dos átomos durante a modelagem, que podem ocorrer de forma mais aleatória. Estabelecendo uma tabela de erro quadrática, com linha de corte em que o mínimo da porcentagem de erro deve ser de 90%. (COLOVOS; YEATES, 1993)
- PROSA-web – faz a análise por determinação de *Z-score*, que é representado pela qualidade geral do modelo medida pelo desvio da energia total da estrutura com relação a uma distribuição de energia derivada de conformações aleatórias, sendo extremamente utilizado como base para validação de estruturas depositadas no PDB (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007)
- PROCHECK – análise da estereoquímica da proteína por meio de análise dos comprimentos de ligação, ângulos, além de outros parâmetros relevantes para a estrutura tridimensional, gerando gráfico de Ramachandran do posicionamento dos resíduos de aminoácido, identificando porcentagem de resíduos em cada região, classificando como favorecida, permitidas e não permitida. É realizado a análise com mínimo de presença de 90% dos resíduos em regiões mais favorecidas. (LASKOWSKI et al., 1993)
- Verify3D – realiza a comparação da sequência primária de aminoácidos de uma proteína, com a sua estrutura tridimensional predita, avaliando o correto enovelamento da mesma, em comparação com outras proteínas molde, a avaliação é realizada através do cálculo da relação 1D/3D com $\text{score} \geq 0,1$ (LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992).

Para a ancoragem molecular foi realizado a padronização do protocolo através do *redocking*, que é a ancoragem molecular de uma proteína já cristalizada contendo um ligante co-cristalizado, que apresenta semelhança de no mínimo 40%, comparado por *Blastp*, com a proteína modelada que se pretende analisar. Este procedimento é realizado para se determinar

o melhor protocolo responsável por conseguir realizar a re-ancoragem do ligante na proteína cristalizada e quando se comparado a melhor pose encontrada com o ligante extraído estando na mesma conformação de quando estava ligada à proteína, deve-se observar o menor valor possível do Root-Mean-Square Deviation (RMSD), raiz quadrada do desvio quadrático médio, obtido através do cálculo da distância medida em angstroms do alinhamento das duas estruturas.

Para realização do protocolo de *redocking* as sequências das proteínas escolhidas, apresentadas na Tabela 2, foram empregadas para análise de *Blastp* com foco no banco de dados do PDB de proteínas cristalizadas. As melhores proteínas encontradas com similaridade de no mínimo 40% foram selecionadas e analisado a presença da co-cristalização com um ligante. Para definição se haveria possível compatibilidade de função entre as proteínas, após extração dos ligantes, foi realizado o alinhamento das estruturas no *software Pymol*, com análise do RMSD do alinhamento, tendo como referência que deveriam ser inferior a 1,0 Å.

Devido à similaridade estrutural, foi realizado a revisão de literatura quanto a possíveis relatos de resíduos de aminoácidos alvo, componentes do sítio ativo de cada proteína, para definição do centro de interação para o processo de *redocking*. Antes da ancoragem os ligantes extraídos foram zerados quanto a energia pelo *software Avogadro*, para remoção de quaisquer conformações que pudessem interferir no *redocking*. O *software* para *redocking* foi o GOLD empregando todas as quatro funções de pontuação, *ChemPLP*, *ChemScore*, *GoldScore* e *Astex Statistical Potential (ASP)*, testando cada uma delas com os cinco diferentes números de poses: 10, 50, 100, 150 e 200. Os demais parâmetros utilizados para o *redocking* foram os padrões definidos pelo próprio *software*. Após finalização do processo, o *software* GOLD define a classificação das melhores poses (melhor conformação do ligante para interação com a proteína, através de *rank* definido com base nos princípios de cada função de pontuação). Dos arquivos gerados das poses de cada análise foi selecionado apenas o *rank* 1, de cada interação proteína-ligante de cada função de pontuação com o seu determinado número de poses, estes arquivos foram reunidos e feita a comparação com a estrutura do ligante extraído da proteína cristalizada, na mesma conformação em que se encontrava quando ligado à proteína através do servidor *online LigRMSD*. Este servidor realizou o alinhamento entre as estruturas e determinou a distância em angstroms deste alinhamento, a seleção do melhor protocolo foi realizado pela comparação do menor valor de RMSD encontrado para a melhor função de pontuação realizada com o determinado número de poses, e este mesmo protocolo foi utilizado para o processo de *docking*. (LIEBESCHUETZ; COLE; KORB, 2012)

Para a execução do *docking* inicialmente foi realizado o alinhamento das estruturas cristalizadas e modeladas através do *software Pymol* para definição do resíduo de aminoácido que seria o alvo central da ancoragem molecular, tendo como referência as informações da literatura de cada proteína cristalizada utilizada como referência. Após finalização do *docking* a interação proteína-ligante foi analisada através do *software Discovery Studio*, com produção de diagrama 2D de cada uma das interações dos ligantes A6 e A8 com cada uma das proteínas de *Leishmania* e realizada as imagens 3D das ligações com suas respectivas distâncias.

4.10. Árvore Filogenética

A análise filogenética é muito importante para se conhecer a relação evolutiva e origem entre diferentes espécies, como o presente estudo tem como alvo a descoberta de novos possíveis alvos para tratamento de leishmaniose, foi realizado uma árvore filogenética para cada proteína escolhida para análise, tendo como comparação espécies do gênero *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium falciparum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Arabidopsis thaliana*, *Felis catus* e *Canis familiaris*. As sequências utilizadas para cada árvore foram selecionadas dos bancos de dados TritypDB para as sequências dos tripanossomatídeos, gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, enquanto os demais foram sequências provenientes do banco de dados Uniprot. As sequências utilizadas foram:

- **CKI:** *L. braziliensis* (LbrM.34.1000); *L. tarentolae* (LtaP35.1130); *L. mexicana* (LmxM.34.1010); *L. major* (LmjF.35.1010); *L. infantum* (LINF_350014800); *L. panamensis* (LPAL13_340015100); *L. donovani* (LdBPK_351030.1); *L. amazonensis* (LAMAPH8_000827400); *T. cruzi* (C4B63_111g42); *T. theileri* (TM35_000421030); *T. brucei* (Tb927.5.800); *T. vivax* (TvY486_0500400); *P. falciparum* (Q8IHZ9); *S. cerevisiae* (ScCKI1: P23291, ScCKI2: P23292, ScCKI3: P39962); *H. sapiens* (HsCKIA: P48729, HsCKID: P48730, HsCKIE: P49674, HsCKIG1: Q9HCP0, HsCKIG2: P78368, HsCKIG3: Q9Y6M4); *R. norvegicus* (RtCKIA: P97633, RtCKID: Q06486, RtCKIG1: Q62761, RtCKIG2: Q62762, RtCKIG3: Q62763); *M. musculus* (MmCKIA: Q8BK63, MmCKID: Q9DC28, MmCKIE: Q9JMK2, MmCKIG1: Q8BTH8, MmCKIG2: Q8BVP5, MmCKIG3: Q8C4X2); *A. thaliana* (AtCKI1: P42158, AtCKI2: Q9CAI5, AtCKI3: Q93Z18, AtCIPK7: Q9XIW0); *F. catus* (FcCKIA: M3WUY5, FcCKID: A0A2I2UFU8, FcCKIG1: M3W1Q7, FcCKIG3: A0A2I2UAC8) e *C. familiaris* (CfCKID: A0A8I3N1W2, CfCKIE: A0A8P0N4L0,

CfCKIG1: A0A8C0NRC3, CfCKIG3: A0A8C0Q7S6).

- CRK3:** *L. braziliensis* (LbrM.35.0660); *L. tarentolae* (LtaP36.0560); *L. mexicana* (LmxM.36.0550); *L. major* (LmjF.36.0550); *L. infantum* (LINF_360011000); *L. panamensis* (LPAL13_350010800); *L. donovani* (LdBPK_360600.1); *L. amazonensis* (LAMAPH8_000319000); *T. cruzi* (C4B63_13g190); *T. theileri* (TM35_000024800); *T. brucei* (Tb927.10.4990); *T. vivax* (TvY486_1005040); *P. falciparum* (P61075); *S. cerevisiae* (ScCDK1 P00546); *H. sapiens* (HsCDK1: P06493, HsCDK2: P24941, HsCDK3: Q00526, HsCDK4: P11802, HsCDK5: Q00535, HsCDK6: Q00534, HsCDK7: P50613, HsCDK8: P49336, HsCDK9: P50750, HsCDK10: Q15131, HsCDK11A: QUQ88, HsCDK14: O94921, HsCDK15: Q96Q40, HsCDK16: Q00536, HsCDK17: Q00537, HsCDK18: Q07002, HsCDK19: Q9BWU1, HsCDK20: Q8IZL9); *R. norvegicus* (RnCDK1: P39951, RnCDK2: Q63699, RnCDK4: P35426, RnCDK5: Q03114, RnCDK7: P51952, RnCDK9: Q631Z4, RnCDK10: Q4KM47, RnCDK11B: P46892, RnCDK14: D3ZSZ0, RnCDK15: M0R7D0, RnCDK16: Q63686, RnCDK17: O35831, RnCDK18: O35832, RnCDK19: D3ZDM6, RnCDK20: Q4KM34); *M. musculus* (MmCDK1: P11440, MmCDK2: P97377, MmCDK3: Q80YP0, MmCDK4: P30285, MmCDK5: P49615, MmCDK6: Q64261, MmCDK7: Q03147, MmCDK8: Q8R3L8, MmCDK9: Q99J95, MmCDK10: Q3UMM4, MmCDK11B: P24788, MmCDK14: O35495, MmCDK15: Q3V3A1, MmCDK16: Q04735, MmCDK17: Q8K0D0, MmCDK18: Q04899, MmCDK19: Q8BWD9, MmCDK20: Q9JHU3); *A. thaliana* (AtCDKC1 Q9LFT8, AtCDKC2 Q8W4P1, AtCDKD1 Q9C9U2, AtCIPK7: Q9XIW0); *F. catus* (FcCDK1: M3WLP7, FcCDK2: M3WJU6, FcCDK3: M3W4N5, FcCDK4: M3WUQ1, FcCDK5: M3X3E1, FcCDK6: A0A337ST42, FcCDK7: M3W2X7, FcCDK8: M3WW64, FcCDK9: A0A2I2U8H4, FcCDK10: M3WS27, FcCDK14: M3WT99, FcCDK15: M3VUX8, FcCDK16: M3VWK4, FcCDK17: M3WXZ5, FcCDK18: M3W6D9, FcCDK19: A0A337S3H9, FcCDK20: M3X769) e *C. familiaris* (CfCDK1: A0A8C0PV66, CfCDK2: A0A8C0NEG2, CfCDK3: A0A8I3PLD8, CfCDK4: A0A8C0T1I9, CfCDK5: A0A8C0PMC1, CfCDK6: A0A8C0TA97, CfCDK7: A0A8C0M946, CfCDK8: A0A8C0NY66, CfCDK9: A0A8C0N0A9, CfCDK10: A0A8C0N0J1, CfCDK11: A0A8I3NWZ4, CfCDK14: A0A8C0SUP7, CfCDK15: A0A8C0TQA9, CfCDK17: A0A8I3PY17, CfCDK18: A0A8I3Q0Q8, CfCDK19: A0A8I3NZB9, CfCDK20: A0A8C0RB59).
- GSK:** *L. braziliensis* (LbrM.18.0290); *L. tarentolae* (LtaP18.0290); *L. mexicana*

- (LmxM.18.0270); *L. major* (LmjF.18.0270); *L. infantum* (LINF_180007700); *L. panamensis* (LPAL13_180007600); *L. donovani* (LdBPK_180270.1); *L. amazonensis* (LAMAPH8_000280400); *T. cruzi* (C4B63_4g350); *T. theileri* (TM35_000033680); *T. brucei* (Tb927.10.13780); *T. vivax* (TvY486_1013940); *P. falciparum* (O77344); *S. cerevisiae* (Q12222); *H. sapiens* (HsGSK1: P49840, HsGSK1: P49841); *R. norvegicus* (RnGSK1: P18265, RnGSK1: P18266); *M. musculus* (MmGSK1: Q2NL51, MmGSK2: Q9WV60); *A. thaliana* (AtGSK9: Q39012, AtCIPK7: Q9XIW0); *F. catus* (FcGSK1: M3X6U4, FcGSK2: A0A337S9S1) e *C. familiaris* (CfGSK1: A0A8C0M9C6, CfGSK2: A0A8C0MPF2).
- **MAPK:** *L. braziliensis* (LbrM.10.0620); *L. tarentolae* (LtaP10.0900); *L. mexicana* (LmxM.10.0490); *L. major* (LmjF.10.0490); *L. infantum* (LINF_100011600); *L. panamensis* (LPAL13_100010700); *L. donovani* (LdBPK_100540.1); *L. amazonensis* (LAMAPH8_000154000); *T. cruzi* (C4B63_21g282); *T. theileri* (TM35_000251490); *T. brucei* (Tb927.8.3550); *T. vivax* (TvY486_0802980); *P. falciparum* (Q7KQK7); *S. cerevisiae* (Q00772); *H. sapiens* (HsMAPK1: P28482, HsMAPK3: P27361, HsMAPK4: P31152, HsMAPK6: Q16659, HsMAPK7: Q13164, HsMAPK8: P45983, HsMAPK9: P45984, HsMAPK10: P53779, HsMAPK11: Q15759, HsMAPK12: P53778, HsMAPK13: O15264, HsMAPK14: Q16539, HsMAPK15: Q8TD08); *R. norvegicus* (RnMAPK1: P63086, RnMAPK3: P21708, RnMAPK4: Q63454, RnMAPK6: P27704, RnMAPK7: P0C865, RnMAPK8: P49185, RnMAPK9: P49186, RnMAPK10: P49187, RnMAPK12: Q63538, RnMAPK13: Q9WTY9, RnMAPK14: P70618, RnMAPK15: Q9Z2A6); *M. musculus* (MmMAPK1: P63085, MmMAPK3: Q63844, MmMAPK4: Q6P5G0, MmMAPK6: Q61532, MmMAPK7: Q9WVS8, MmMAPK8: Q91Y86, MmMAPK9: Q9WTU6, MmMAPK10: Q61831, MmMAPK11: Q9WUI1, MmMAPK12: O08911, MmMAPK13: Q9Z1B7, MmMAPK14: P47811, MmMAPK15: Q80Y86); *A. thaliana* (AtMAPK1: Q39021, AtMAPK2: Q39022, AtMAPK3: Q39023, AtCIPK7: Q9XIW0); *F. catus* (FcMAPK3: M3WK78, FcMAPK4: M3WGF3, FcMAPK6: M3WH68, FcMAPK7: M3WAB7, FcMAPK13: A0A337S1L5, FcMAPK14: A0A337S6R4, FcMAPK15: A0A5F5Y3F5) e *C. familiaris* (CIMAPK1: A0A8C0TIJ2, CIMAPK3: A0A8C0LYL1, CIMAPK6: A0A8C0TRN7, CIMAPK7: A0A8C0MK52, CIMAPK13: A0A8I3NKJ3, CIMAPK14: O02812, CIMAPK15: A0A8C0PFP2).
 - **PKA:** *L. braziliensis* (LbrM.18.1180); *L. tarentolae* (LtaP18.1070); *L. mexicana* (LmxM.18.1080); *L. major* (LmjPKA LmxM.18.1080); *L. infantum*

(LINF_180016200); *L. panamensis* (LPAL13_180014100); *L. donovani* (LdBPK_181090.1); *L. amazonensis* (LAMAPH8_000289400); *T. cruzi* (C4B63_4g242); *T. theileri* (TM35_000034560); *T. brucei* (Tb927.10.13010); *T. vivax* (TVY486_1012660); *P. falciparum* (Q7KQK0); *S. cerevisiae* (ScPKA1: P06244, ScPKA2: P06245, ScPKA3: P05986); *H. sapiens* (HsPRKACA: P17612, HsPRKACB: P22694, HsPRAKACG: P22612); *R. norvegicus* (RnPRKACA: P27791, RnPRKAB: P68182); *M. musculus* (MmPRAKACA: P05132, MmPRAKACB: P68181); *A. thaliana* (AtPKA1: P42818, AtPKA2: Q39030, AtCIPK7: Q9XIW0); *F. catus* (FcPRKACA: M3WWL5, FcPRKACB: M3X610) e *C. familiaris* (CfPRKACA: Q8MJ44, CfPRKACB: A0A8C0NGV3).

- **SRPK:** *L. braziliensis* (LbrM.30.3610); *L. tarentolae* (LtaP30.3620); *L. mexicana* (LmxM.29.3580); *L. major* (LmjF.30.3580); *L. infantum* (LINF_300041600); *L. panamensis* (LPAL13_300040300); *L. donovani* (LdBPK_303640.1); *L. amazonensis* (LAMAPH8_000651200); *T. cruzi* (C4B63_18g170); *T. theileri* (TM35_000071190); *T. brucei* (Tb927.6.4970); *T. vivax* (TvY486_0604290); *P. falciparum* (O77306); *S. cerevisiae* (Q03656); *H. sapiens* (HsSRPK1: Q96SB4.2, HsSRPK2: P78362.3, HsSRPK3: Q9UPE1.2); *R. norvegicus* (RnSRPK1: A0A0U1RRU0, RnSRPK2: B1WBT4, RnSRPK3: A0A0G2KAH6); *M. musculus* (MmSRPK1 O70551, MmSRPK2 O54781, MmSRPK3 Q9Z0G2); *A. thaliana* (AtSRPK4: F4J982, AtCIPK7: Q9XIW0); *F. catus* (FcSRPK1: M3XD27, FcSRPK2: A0A2I2UJJ4, FcSRPK3: M3XB20) e *C. familiaris* (CfSRPK1: A0A8C0SVC4, CfSRPK2: A0A8I3QG01, CfSRPK3: A0A8C0T3N1).

Após coleta das sequências de proteínas nos bancos de dados, as mesmas foram inseridas no *software* MEGA11, realizado o alinhamento por ClustalW e construída as árvores individuais de cada tipo de proteína utilizando o teste Neighbor-Joining, com os parâmetros de análise filogenética por método Bootstrap, com 10000 replicações e modelo de substituição Poisson.

4.11. Análise estatística

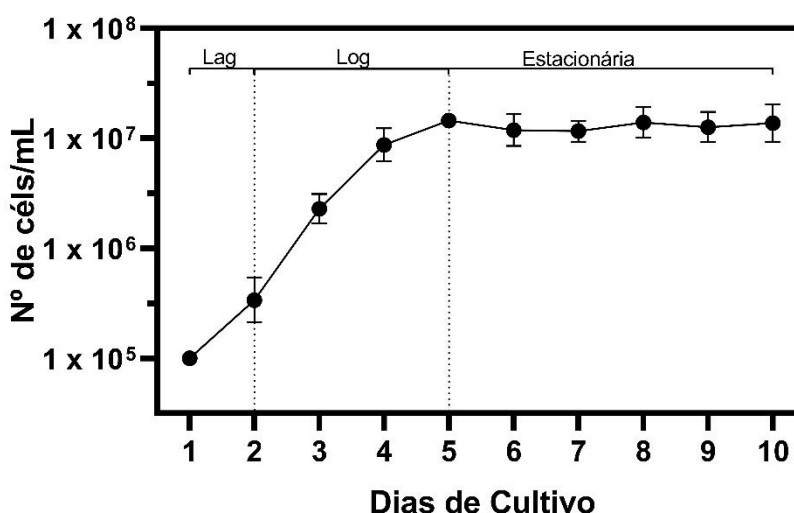
Os dados obtidos foram analisados empregando os valores em *software* GraphPad Prism 8.0, realizando a produção dos gráficos e análises estatísticas. A análise estatística foi realizada no *software* GraphPad Prism 8, com análise por ANOVA e teste estatístico para definição do p-valor por teste de Dunnett's de comparação múltipla.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Curva de Crescimento

Para início de todos os ensaios foi definida a curva de crescimento (Figura 8) dos parasitos, realizado através da contagem das células em triplicata biológica. Tendo definido como dias de fase *lag*, até o dia 2, como fase de adaptação. Entre os dias 2 e 5, encontra-se a fase *log* definida como a fase de crescimento exponencial, esta fase foi utilizada para realização das sub-culturas, pois nesta fase os parasitos estavam na fase promastigota procíclica. A partir do 6º dia, os parasitos já haviam evoluído para a fase estacionária, o que inclui a diferenciação para a forma promastigota metacíclica do parasito, que define-se como a modificação da estrutura do parasito, para tornar mais propício à infecção de células. Sendo assim escolhido o 7º dia para realização dos experimentos de infecção.

Figura 8 - Curva de crescimento de *L. braziliensis* M2904-GFP



Legenda: Dados apresentados com erro padrão analisado com intervalo de confiança de 95%.

5.2. Ensaios *in vitro*

Foi realizado a triagem dos compostos em macrófago RAW 264.7 na concentração única de $10 \mu\text{M}$, cada um dos testes foram empregados em triplicata técnica e biológica, e os controles foram empregados em quadruplicata técnica e triplicata biológica.

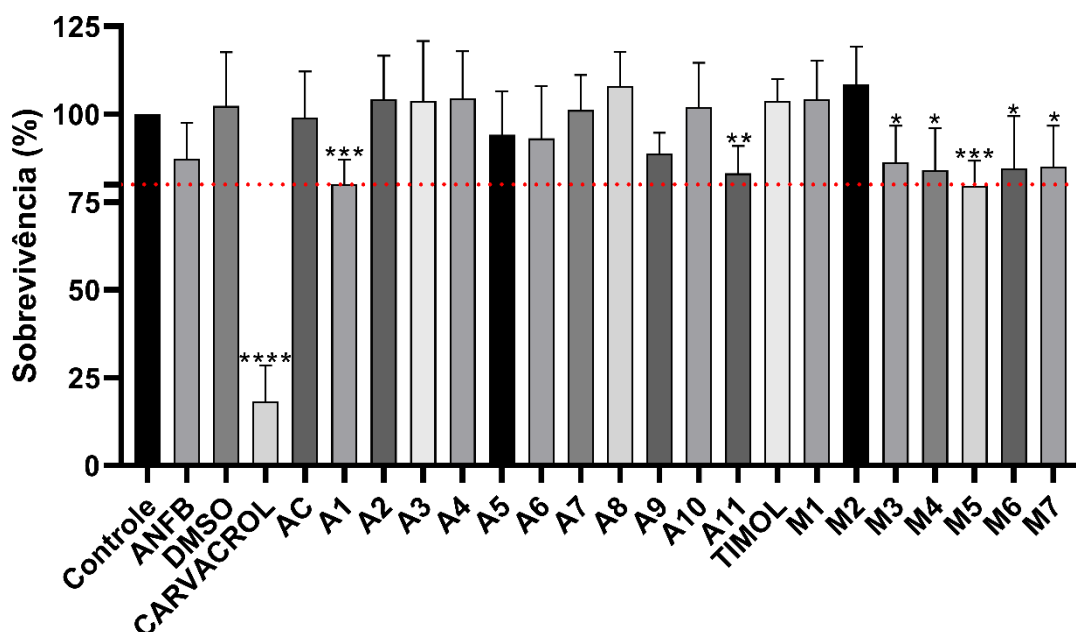
Os resultados do presente estudo foram obtidos de acordo com o determinado no item 4.7 e os dados de absorbância foram empregados sobre a fórmula da resazurina descrita no item 4.5 e a análise de estatística foi realizada no software *GraphPad Prism* 8.0, empregou-se o teste ANOVA de um parâmetro, com utilização do teste de Dunnet de comparação múltipla,

tendo como referência as células sem tratamento, com intervalo de confiança de 95% e o p-valor de cada uma das comparações múltiplas foi calculado, ilustrado e descrito o significado de cada símbolo na legenda na Figura 9.

Dos compostos testados apenas o A1, A11, M5, M6, M7, M8, M9 e M10, apresentaram diferença significativa em comparação com o controle, sendo assim, pode-se concluir que nestes compostos a concentração de 10 μM possui maior toxicidade às células de macrófago, porém não ultrapassando o limite de 80% de sobrevivência. Os precursores dos compostos analisados também foram testados, o AC, que refere-se ao ácido carvacroxiacético, que é o precursor direto dos compostos classe A, não apresentou nenhuma toxicidade na concentração de 10 μM , com estatística não significativa para a célula sem tratamento, assim como o Timol, que é o precursor dos compostos classe M. Enquanto o Carvacrol, o óleo essencial precursor da síntese dos compostos, foi altamente tóxico na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (665,78 μM), ficando em torno de 20% de viabilidade, necessitando o teste da concentração citotóxica para comparação da toxicidade do precursor com os compostos em questão.

Sendo os demais compostos testados atóxicos nas concentrações testadas, visto que a análise estatística determinou através do p-valor que não houve diferença significativa entre o tratamento e o controle. Dessa forma, todos os compostos foram encaminhados para testes de CC_{50} , responsável por definir a concentração citotóxica responsável pela morte de 50% das células.

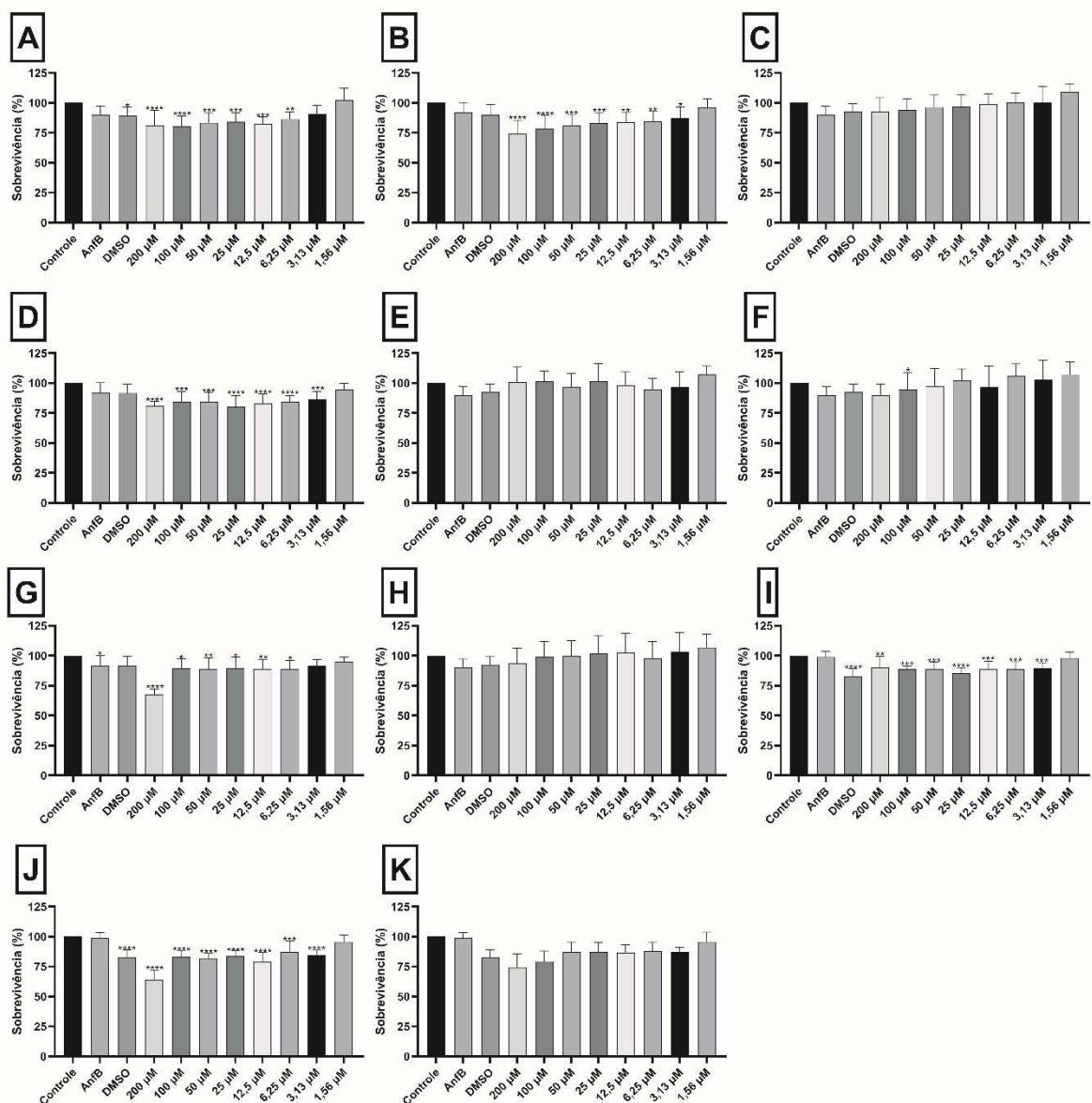
Figura 9 - Triagem dos compostos no experimento de citotoxicidade em macrófago RAW 264.7.



Legenda: CST - macrófago sem tratamento, ANFB - macrófago tratado com Anfotericina B (3,125 $\mu\text{g/mL}$), DMSO - macrófago tratado com DMSO 1%, demais compostos foram utilizados na concentração de 10 μM . AC – ácido carvacroxiacético. Estatística representada por: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Após finalização da triagem, os compostos que apresentaram sobrevivência igual ou superior a 80% foram encaminhados para a determinação da concentração citotóxica de 50% (CC50). Inicialmente, fez-se o ensaio partindo da maior concentração de 200 μM de cada composto em diluição seriada até a menor concentração de 1,56 μM , diluído em 1% DMSO. Os resultados dos tratamentos com os compostos da classe A são apresentados na Figura 10 e com os compostos da classe M, estão apresentados na Figura 11.

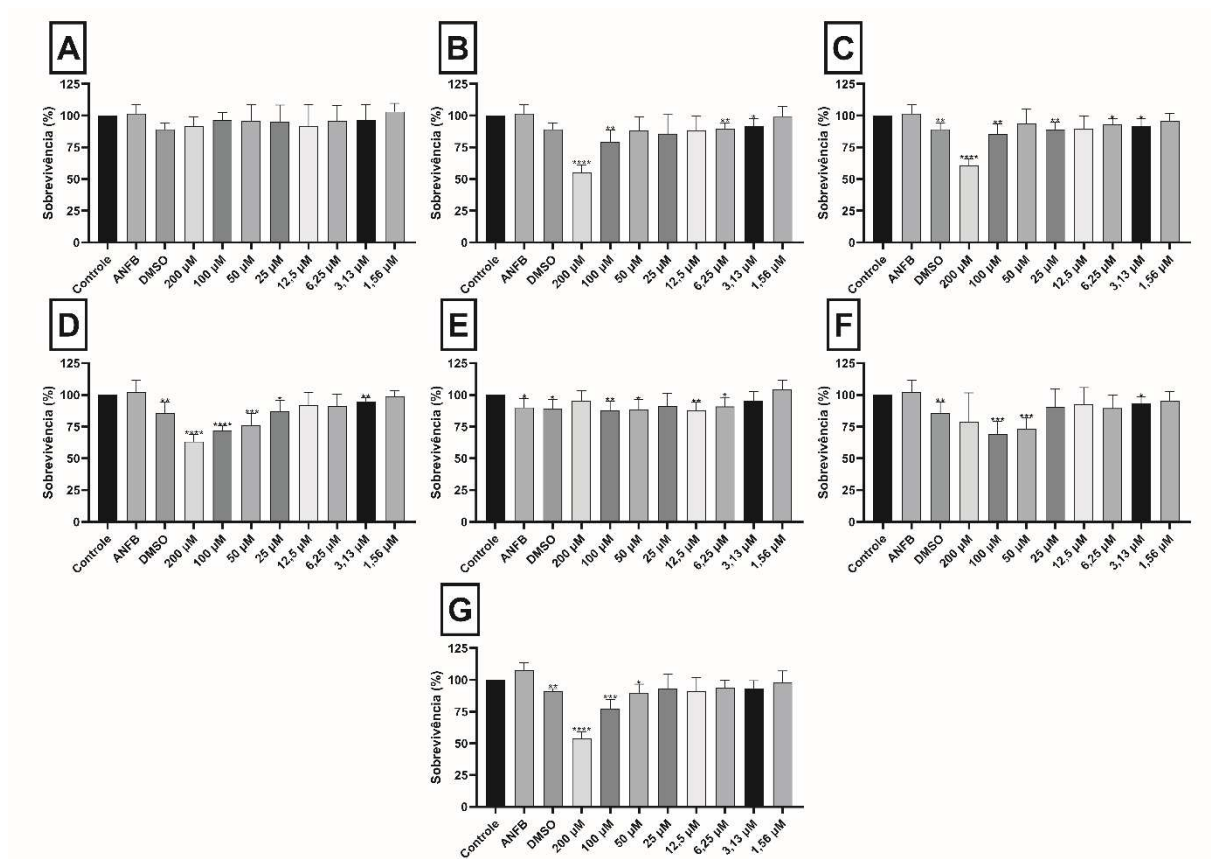
Figura 10 - Perfil de citotoxicidade em macrófago RAW 264.7 com tratamento com compostos classe A.



Legenda: Controle - macrófago sem tratamento, ANFB - macrófago tratado com Anfotericina B (3,125 $\mu\text{g/mL}$), DMSO - macrófago tratado com DMSO (1%), demais compostos foram utilizados nas concentrações indicadas

no eixo inferior. Cada gráfico foi definido para cada um dos compostos utilizados representados por A) A1; B) A2; C) A3; D) A4; E) A5; F) A6; G) A7; H) A8; I) A9; J) A10 e K) A11. Estatística representada por: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Figura 11 - Perfil de citotoxicidade em macrófago RAW 264.7 com tratamento com compostos classe M.

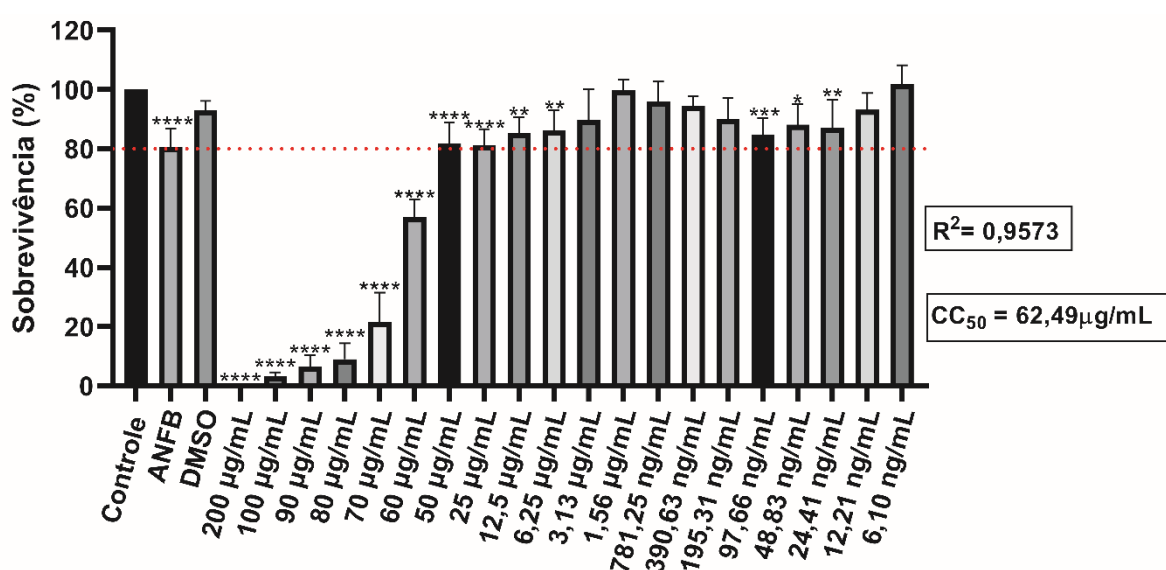


Legenda: Controle - macrófago sem tratamento, ANFB - macrófago tratado com Anfotericina B (3,125 µg/mL), DMSO - macrófago tratado com DMSO (1%), demais compostos foram utilizados nas concentrações indicadas no eixo inferior. Cada gráfico foi definido para cada um dos compostos utilizados representados por A) M1; B) M2; C) M3; D) M4; E) M5; F) M6; G) M7. Estatística representada por: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Os resultados obtidos com os testes de CC_{50} tanto dos compostos classe A (Figura 10), quanto classe M (Figura 11), são condizentes, visto que todos apresentaram $CC_{50} > 200 \mu\text{M}$, que é um valor semelhante aos encontrados em testes utilizando o próprio carvacrol presentes na literatura. Os ensaios realizados com o óleo essencial de Carvacrol (Figura 12) apresentaram $CC_{50} = 62,49 \mu\text{g/mL}$ (416,04 μM), que se assemelham aos encontrados em pesquisas anteriores. De acordo com estudos realizados por COSTA et al., (2023) a utilização de carvacrol nos testes de citotoxicidade em macrófago peritoneal de murino tiveram alta toxicidade de valores de $CC_{50} = 75,91 \mu\text{g/mL}$, que corresponde a 505,3 μM , com tratamento de 24 h e $CC_{50} = 40,23 \mu\text{g/mL}$, correspondente a 267,8 μM , com tratamento de 72 h. GALVÃO et al., (2020) testaram a citotoxicidade do carvacrol em linhagem celular de

monócito humano o valor de $CC_{50} = 64,10 \mu\text{g/mL}$, correspondente a $426,8 \mu\text{M}$ foi apresentado com tratamento de 48 h. Estes valores encontrados são considerados de alta toxicidade, além de ser relatado que havia ainda problemas de solubilidade do composto testado, para isso GALVÃO et al., (2020), testaram se a citotoxicidade do carvacrol reduziria utilizando o método de encapsulamento em nanocápsula lipídica e o valor obtido foi de apenas $CC_{50} = 73,50 \mu\text{g/mL}$, correspondendo a $489,5 \mu\text{M}$ com tratamento de 48 h, o que continua sendo baixo, indicando alta toxicidade, mesmo quando encapsulado.

Figura 12 - Perfil de citotoxicidade em macrófago RAW 264.7 com tratamento com óleo essencial comercial de Carvacrol.



Legenda: Controle - macrófago sem tratamento, ANFB - macrófago tratado com Anfotericina B ($3,125 \mu\text{g/mL}$), DMSO - macrófago tratado com DMSO (1%), demais compostos foram utilizados nas concentrações indicadas no eixo inferior. Cada gráfico foi definido para cada um dos compostos utilizados representados por A) M1; B) M2; C) M3; D) M4; E) M5; F) M6; G) M7. Estatística representada por: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

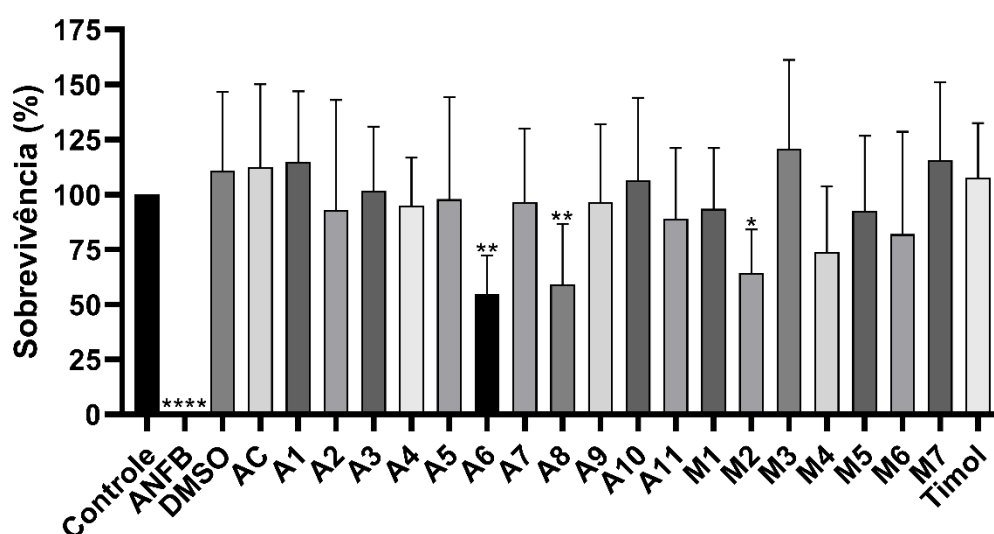
Devido a impossibilidade do cálculo do valor de CC_{50} dos compostos na concentração máxima de $200 \mu\text{M}$, houve necessidade da análise em novas concentrações que fossem superiores às anteriormente testadas, e inclusive superiores aos dados relatados pela literatura. Portanto com os resultados obtidos no ensaio de triagem e CC_{50} todos os compostos foram encaminhados para o ensaio de infecção em macrófago RAW 264.7 por *L. braziliensis*.

A utilização da cepa GFP em comparação com a cepa selvagem foi escolhida devido a comprovações realizadas por BASTOS et al., (2017), mostrando que apesar da utilização de Resazurina como método de análise de viabilidade ser amplamente utilizado e apresentar diversas vantagens quando se comparado aos demais, como MTT, por exemplo. Devido a ser um método mais sensível e preciso, com menor risco de interação dos grupamentos químicos

dos compostos utilizados no teste, reduzindo o risco de falso positivo. A utilização destes métodos de viabilidade comumente utilizados apresenta algumas falhas quando se trata da análise de viabilidade dos parasitos. Desta forma BASTOS et al. (2017) mostraram que a análise de viabilidade por fluorescência foi capaz de detectar concentrações de 8-16 vezes menor de *Leishmania* quando se comparado com a resazurina, comprovando assim, ser um teste muito mais sensível e confiável.

Devido a ser um experimento que para revelação do resultado é necessário a lise dos macrófagos para liberação dos parasitos, e que esta lise muitas vezes não é homogênea, os desvios do experimento são sempre superiores ao desejado, como observado na Figura 13, o experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica. Os compostos A6, A8 e M2 apresentaram os melhores resultados quando testados na concentração de 10 μ M, com análise estatística de p-valor significativo, dos compostos A6 e A8 menor que 0,01 e do composto M2 inferior a 0,05. O Manual do DNDi (LOSET et al., 2009) define como regra que o valor de IC₅₀ dos compostos deve ser $\leq 10 \mu$ M, com cálculo do índice de seletividade ≥ 10 , portanto, visto que no ensaio de citotoxicidade, como apresentado nas Figura 10 e Figura 11, a maior concentração testada de 200 μ M não foi capaz de ser tóxico à 50% das células. Dessa forma, como o valor de CC₅₀ estaria como sendo definido acima de 200 μ M, mesmo que o valor de IC₅₀ fosse acima de 10 μ M, o índice de seletividade ainda seria alto, acima da regra pré-definida, permitindo assim que fosse testado concentrações superiores a 10 μ M, para definição do IC₅₀.

Figura 13 - Triagem da Infecção de macrófago RAW 264.7 por *L. braziliensis*.

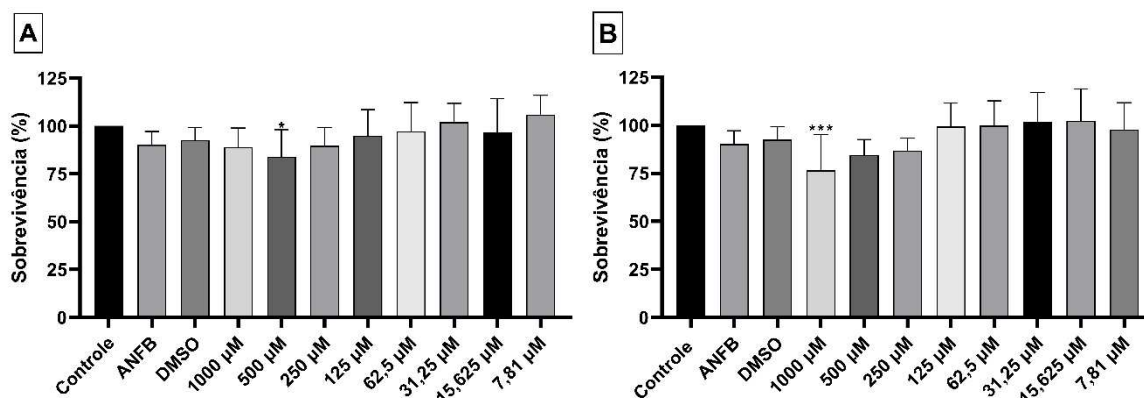


Legenda: Controle - macrófago sem tratamento, ANFB - macrófago tratado com Anfotericina B (3,125 μ g/mL), DMSO - macrófago tratado com DMSO (0,04%), compostos foram utilizados na concentração de 10 μ M.

Estatística representada por: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Os compostos que apresentaram atividade antileishmania nos testes de infecção, foram reanalisados quanto às concentrações superiores no ensaio de CC_{50} . Partindo de 1 mM, como a maior concentração possível testada *in vitro*, os compostos A6 e A8 ainda assim foram pouco tóxicos nas concentrações testadas como evidenciado na Figura 14. Mesmo com o aumento significativo da concentração dos compostos, ainda foi impossível realizar o cálculo do CC_{50} de ambos os compostos, tendo definido como $> 1\text{mM}$, permanecendo com média entre 75 a 90% de sobrevivência na maior concentração testada. Devido à observação que o composto M2, apesar de ter apresentado atividade antileishmania, mostrou maior toxicidade no ensaio de CC_{50} (Figura 11B) com média de sobrevivência próxima de 55% em 200 μM , enquanto os compostos A6 e A8 permaneceram em torno de 76 a 89% de sobrevivência mesmo em 1000 μM . Através de comparação estatística dos resultados obtidos na triagem da infecção (Figura 13) foi evidenciado que não houve diferença significativa, com análise de p-valor superior a 0,05, entre os compostos A6, A8 e M2, ficando ambos em torno de 55 a 60% de viabilidade, portanto, como a redução do valor da citotoxicidade é significativo entre os compostos, o M2, foi descartado para as demais análises. Pois esta redução indicaria uma menor seletividade para o parasito.

Figura 14 - Gráfico de Citotoxicidade compostos A6 e A8.

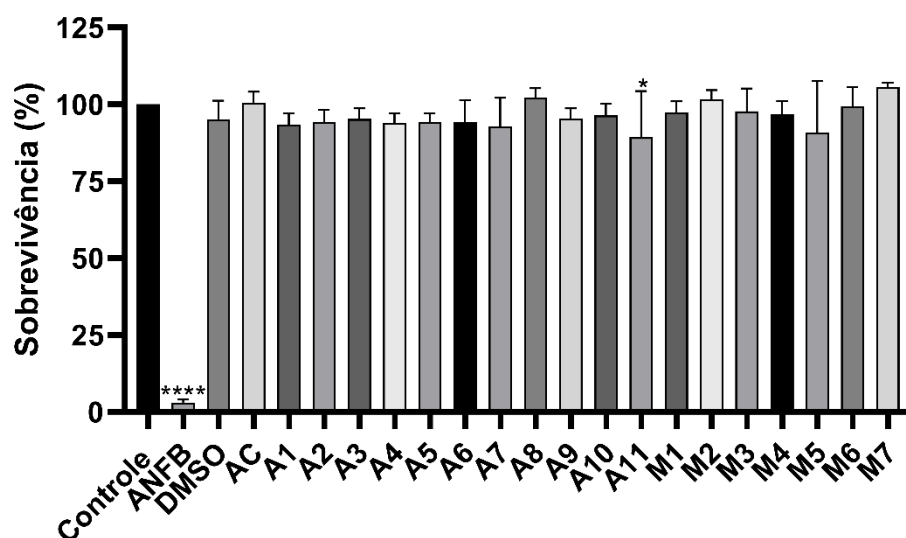


Legenda: Controle - macrófago sem tratamento, ANFB - macrófago infectado tratado com Anfotericina B (3,125 $\mu\text{g/mL}$), DMSO - macrófago infectado tratado com DMSO (0,04%), compostos foram utilizados na concentração de 10 μM . Em A) está representado o resultado do CC_{50} do tratamento do composto A6 e em B) o tratamento com o composto A8. Estatística representada por: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Para testar se haveria ação leishmanicida dos compostos contra outra espécie além da *L. braziliensis* foi realizado o mesmo ensaio com infecção de macrófago RAW 264.7 por *L. amazonensis* PH8 do tipo selvagem (WT), com realização de triplicata técnica e biológica e mantido as condições utilizadas para o teste com a *L. braziliensis*. Como na literatura

(COSTA et al., 2023; GALVÃO et al., 2020) já se esperava que o carvacrol e seus derivados apresentassem atividade leishmanicida contra *Leishmania amazonensis*, dada a abundância de estudos sobre o tema. No entanto, todos os compostos avaliados nesta pesquisa, na concentração de 10 μM , mostraram-se atóxicos para *L. amazonensis* (Figura 15). Esse resultado é interessante, visto que os compostos A6, A8 e M2 demonstraram toxicidade para *Leishmania braziliensis*, sugerindo uma maior especificidade dos compostos testados para essa espécie.

Figura 15 - Triagem da Infecção de macrófago RAW 264.7 por *L. amazonensis* PH8.



Legenda: Controle - macrófago sem tratamento, ANFB – macrófago infectado tratado com Anfotericina B (3,125 $\mu\text{g/mL}$), DMSO - macrófago infectado tratado com DMSO (0,04%), compostos foram utilizados na concentração de 10 μM . Estatística representada por: * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

Devido a possibilidade de aumento da concentração dos compostos no teste *in vitro* de infecção foi realizado o teste partindo da maior concentração de 50 μM . O ensaio foi realizado apenas com duplicata técnica. Os derivados de carvacrol A6 e A8 demonstraram potente atividade leishmanicida contra *Leishmania braziliensis* (Tabela 3), com valores de IC_{50} de 11,77 μM e 11,43 μM , respectivamente. Os valores de IC_{50} apresentados foram muito promissores, pois na literatura os valores encontrados em ensaio com *L. amazonensis* são em torno de 27,40 $\mu\text{g/mL}$ (182,4 μM) e 19,65 $\mu\text{g/mL}$ (130,8 μM) para o carvacrol puro e encapsulado em tratamento de 48 h de parasitos na fase amastigota (GALVÃO et al., 2020); em outro estudo também utilizando *L. amazonensis*, o IC_{50} encontrado foi entre 37 $\mu\text{g/mL}$ (246,4 μM) a 58 $\mu\text{g/mL}$ (386,2 μM) de hidrogel contendo carvacrol com tratamentos de 24hrs em macrófagos peritoneal murino infectados por *Leishmania* e 29 $\mu\text{g/mL}$ (193,1 μM) a 42 $\mu\text{g/mL}$ (279,7) com tratamentos de 72 h (COSTA et al., 2023). Desta forma, os compostos em estudo foram altamente promissores, devido aos valores obtidos terem sido 10 x menores do

que os da literatura, apresentando uma maior seletividade para a espécie *L. braziliensis*. A alta seletividade dos compostos foi evidenciada pelos elevados índices de seletividade (IS), estimados em >85 para o A6 e >87 para o A8. Esses valores são consideravelmente superiores aos relatados na literatura para o carvacrol puro e encapsulado, bem como para a anfotericina B (GALVÃO et al., 2020). Em outro estudo (COSTA et al., 2023), o carvacrol complexado em hidrogel apresentou IS mais baixos, variando de 1,37 a 9,5, dependendo das condições experimentais. Devido à maior prevalência de casos envolvendo a espécie *L. braziliensis* nas regiões endêmicas das leishmanioses no Brasil, a maior seletividade dos compostos analisados para a espécie em comparação à espécie *L. amazonensis*, torna o resultado consideravelmente promissor para estudos posteriores.

Tabela 3 - Concentração inibitória de 50% (IC₅₀) da *Leishmania braziliensis*, e Concentração Citotóxica de 50% (CC₅₀) dos macrófagos RAW 264.7. Cálculo do índice de seletividade (IS).

Tratamento	IC₅₀ <i>L. braziliensis</i> amastigota internalizada (µM)	CC₅₀ Macrófago RAW 264.7 (µM)	Índice de seletividade (CC₅₀/IC₅₀)
A6	11,77	> 1000	> 85
A8	11,43	> 1000	> 87

Portanto pode-se estabelecer que os compostos A6 e A8 são potenciais candidatos como possíveis fármacos pois superam a regra mínima definida pelo DNDi (LOSET et al., 2009) que determina que o índice de seletividade de um composto analisado como possível tratamento para a leishmaniose como devendo ser superior a 10. Além disso o valor de CC₅₀ encontrado também apresenta-se superior a regra, visto que é estipulado como devendo ser maior que 200 µM.

5.3. Análise *in silico*

Após modelagem das proteínas no software *AlphaFold2* e minimização no *Yasara* foi observado que algumas proteínas continham regiões não enoveladas. Para analisar a possibilidade de truncar essas proteínas, foi realizado o alinhamento das sequências das proteínas modeladas com a sequência da proteína cristalizada semelhante (Tabela 4) correspondente, no ClustalOmega (Apêndice A). As proteínas que necessitaram de serem truncadas foram: CKI: exclusão de 56 resíduos de aminoácidos na porção terminal, CRK3 exclusão de 20 resíduos na porção inicial; GSK e PKA não foi necessário truncar devido a alta similaridade com as proteínas de *Leishmania*, além de terem sido completamente

enoveladas, MAPK: exclusão de 25 resíduos na porção terminal e SRPK exclusão de 391 resíduos em diferentes porções da proteína. A modelagem e exclusão de resíduos da SRPK foram realizados por PIMENTEL et al.,(2023) e revalidada da mesma forma que as demais.

Tabela 4 - Análise da comparação de similaridade de sequência entre proteína de *L. braziliensis* modelada por *AlphaFold2* e proteínas cristalizadas armazenada no banco de dados PDB.

Proteína	Original	Truncada	Código NCBI	Espécie
CKI	69,52%	69,52%	3UZP – Hs	Homo sapiens
CRK3	58,48%	58,48%	8UV0 – Hs	Homo sapiens
GSK	93,52%	-----	7S6V – Li	<i>L. infantum</i>
MAPK	94,49%	94,49%	4O2Z – Ld	<i>L. donovani</i>
PKA	51,24%	-----	7Y1G – Hs	Homo sapiens
SRPK	40,86%	43,47%	4WUA – Hs	Homo sapiens

Após a minimização de energia pelo *software Yasara* foi necessário realizar a validação da estereoquímica, conformação da proteína estrutura tridimensional e posicionamento dos aminoácidos. Os resultados estão distribuídos na Tabela 5:

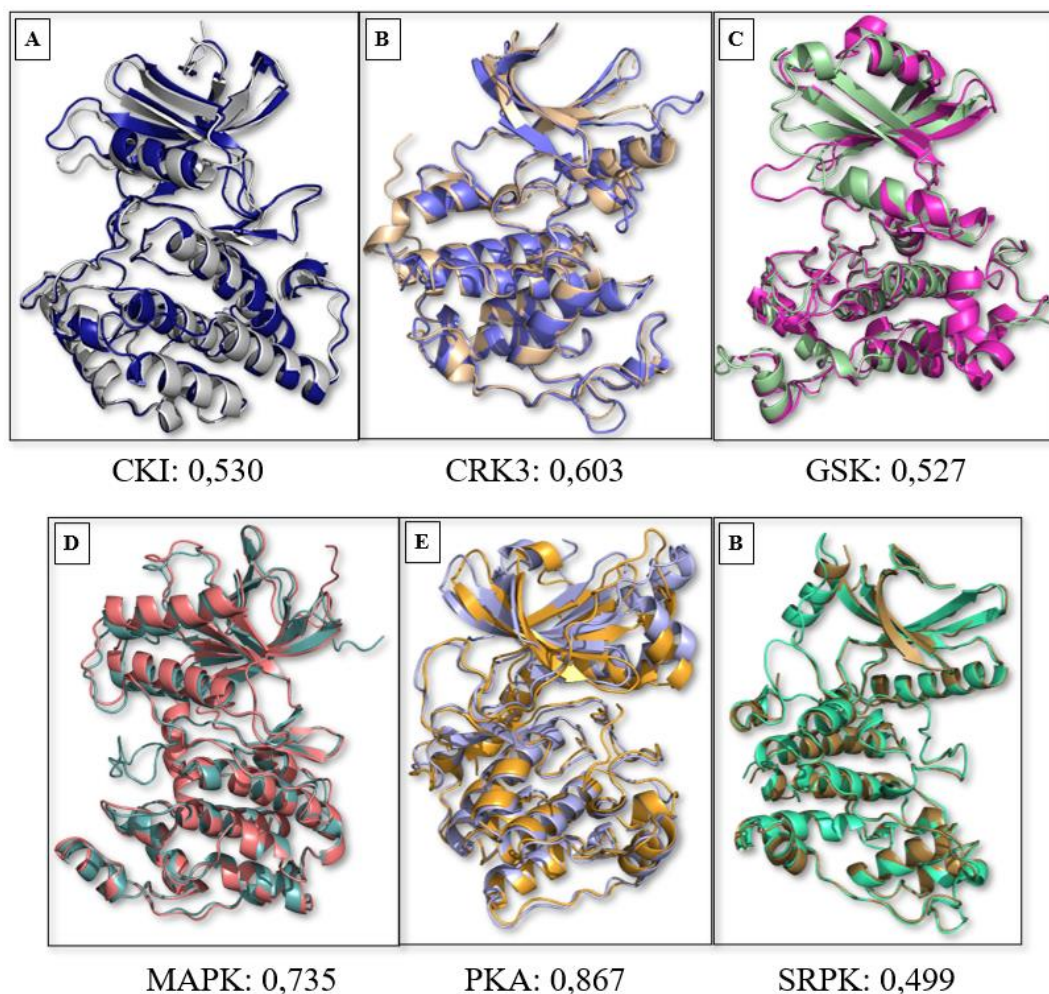
Tabela 5 - Validação das modelagens realizada nos 4 servidores.

Proteínas analisadas	Ramachandran plot				PROSA-web	ERRAT	Verify 3D
	Resíduos em regiões favorecidas (%)	Resíduos em regiões adicionais permitidas (%)	Resíduos em regiões generosamente permitidas (%)	Resíduos em regiões não permitidas (%)	Z - score	Overall quality fator (%)	% dos resíduos com pontuação 3D-1D \geq 0,1
CKIt	92,6	7,0	0,4	0,0	-7,71	95,139	92,64
CRK3t	89,5	8,6	1,2	0,8	-7,65	90,441	76,98
GSK	91,7	8,0	0,0	0,3	-9,09	94,864	77,18
MAPKt	91,5	6,9	1,3	0,3	-9,77	84,726	81,54
PKA	92,5	7,2	0,3	0,0	-8,8	92,163	80,72
SRPK	90,2	8,2	0,9	0,6	-8,22	93,878	72,36

O resultado apresentado na Tabela 5, mostra que no gráfico de Ramachandran somente a proteína LbCRK3 apresentou menor porcentagem de resíduos localizados em regiões favorecidas, equivalente a 89,5%, tendo regra de no mínimo 90% (LASKOWSKI et al., 1993). A análise feita pelo servidor *PROSA-web* faz análise por difrações de raio X da proteína, a regra que irá determinar a relação das proteínas e classificar como uma boa validação ou não. O *Z-score* do *PROSA-web* é definido como devendo estar entre -4,00 e -10,00, valores abaixo e acima deste limite é considerado reprovado na etapa de validação, dessa forma, todas as proteínas foram aprovadas nesta validação (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). O ERRAT irá realizar a avaliação da correção conformação dos resíduos de aminoácidos através da realização estatística de erro quadrático, impondo como uma estrutura de alta resolução aquelas que ficarem abaixo da linha de 95% de limite de rejeição, enquanto as proteínas de baixa resolução precisam ficar abaixo de 91%, nas predições realizadas a proteína MAPK ficou pouco abaixo do limite estipulado, juntamente com a CRK3 que ficou bem abaixo do esperado, enquanto as demais foram aprovadas (COLOVOS; YEATES, 1993). Por último foi realizado a verificação através do servidor *Verify3D* que analisa a relação sequência de aminoácidos 1D, com a estrutura tridimensional com pontuação de porcentagem dessa relação precisando estar acima de 80%. Avaliamos a consistência entre as sequências de aminoácidos e as estruturas tridimensionais das proteínas GSK e CRK3 utilizando o servidor *Verify3D*. Ambas as proteínas apresentaram pontuações inferiores a 80%, o que indica uma possível discrepância entre a sequência e a estrutura. No entanto, ao submeter a estrutura homóloga da HsCRK3 ao *Verify3D*, obtivemos um resultado similar. Considerando que a análise realizada pelo servidor *PROSA-web* não indicou problemas significativos na estrutura da LbCRK3, decidimos prosseguir com as análises subsequentes para ambas as proteínas (LbGSK e LbCRK3).

A estrutura tridimensional de uma proteína é um fator de fundamental importância na definição de sua função biológica, portanto para visualização se haveria a possibilidade de manutenção da função da proteína modelada em comparação com as proteínas cristalizadas, em que já se é conhecido o funcionamento, foi realizado o alinhamento das estruturas no *software Pymol* e cálculo do RMSD deste alinhamento, como mostrado na Figura 16. Quanto mais próximo de 0, melhor é o alinhamento e, por consequência, maior é a similaridade entre as estruturas analisadas, o que foi observado em todos os alinhamentos foi que a distância do alinhamento entre as estruturas, foi sempre inferior a 1,0 Å.

Figura 16 - Comparação de similaridade estrutural entre as proteínas de *Leishmania* que foram modeladas e as proteínas cristalizadas que apresentaram similaridade de sequência por Blastp.



Legenda: A) CKI, em cinza LbCKI e em azul HsCKI; B) CRK3 em bege HsCDK2 e em azul claro LbCRK3; C) GSK, em rosa LiGSK e em verde LbGSK; D) MAPK, em salmão LdMAPK e em azul turquesa LbMAPK; E) PKA, em amarelo HsPKA e em lilás LbPKA; F) SRPK, em dourado HsSRPK1 e em verde claro LbSRPK. Abaixo de cada imagem é informado o valor do RMSD do alinhamento das proteínas, obtido através do *software Pymol*.

Dessa forma, fez-se o *redocking* das proteínas cristalizadas, todas contendo um ligante co-cristalizado, o que permite criar um protocolo de ancoragem a fim de se encontrar a melhor função de pontuação com a determinação do número de poses ideal (Tabela 6) para o melhor *docking* molecular (LIEBESCHUETZ; COLE; KORB, 2012). Todos os valores de RMSD encontrados nas melhores poses estipuladas pelo protocolo foram abaixo de 2,0 Å, como orienta a literatura, com exceção da proteína LiGSK que apresentou uma distância um pouco maior, de 3,51 Å, com base na literatura. Isso pode ser explicado, pois o ligante co-cristalizado utilizado era maior que os demais, o que poderia interferir fortemente na re-ancoragem, talvez necessitando de um refinamento pós *redocking*, que não foi realizado, mas

que não inviabiliza a utilização do protocolo utilizado (HEVENER et al., 2009). Devido à similaridade estrutural entre as proteínas, o protocolo definido no *redocking* foi utilizado para realização do *docking* molecular proteína-ligante entre as proteínas modeladas e os ligantes A6 e A8 desenhados no *Avogadro* (Figura 17).

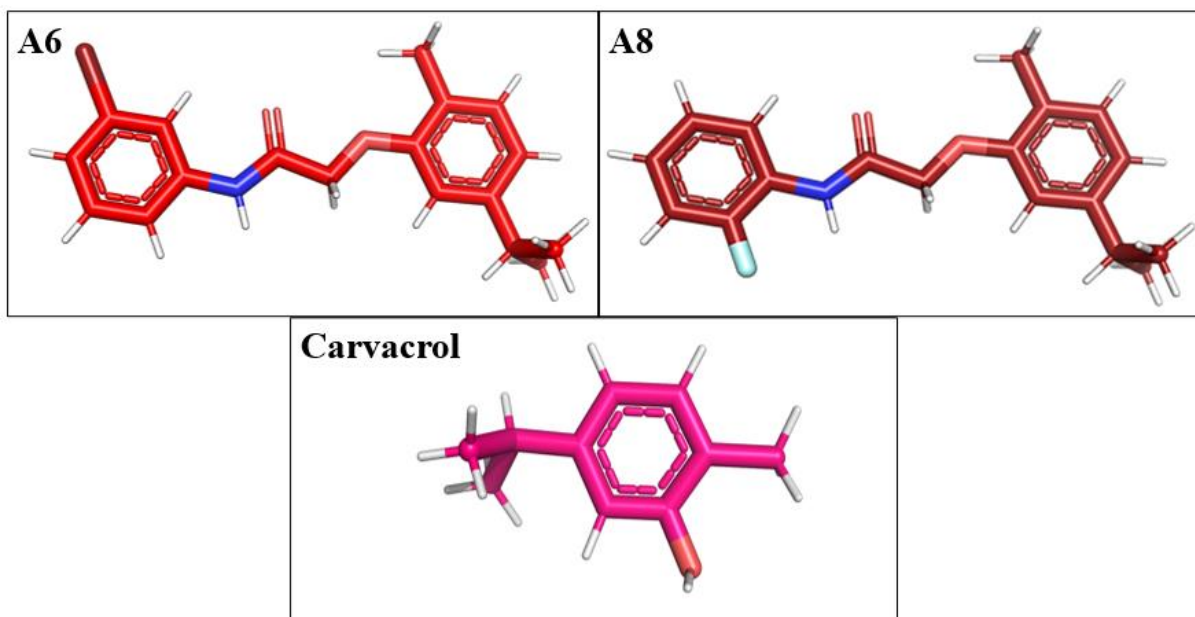
Como forma de comparação para poder garantir que a interação dos derivados com as proteínas poderia representar uma maior afinidade quando se comparado com o precursor, carvacrol. Foi realizado o *docking* molecular utilizando as mesmas funções de pontuação, número de poses e o mesmo resíduo de aminoácido central de interação, para se garantir que todas as condições seriam as mesmas. Realizando uma comparação da interação proteína-ligante entre os compostos A6 e A8 e o precursor Carvacrol (Figura 17).

Tabela 6 - Dados do *redocking* das 6 proteínas.

Proteína Cristalizada	Função de Pontuação	Nº de poses	Menor RMSD	Resíduo da interação
HsCKI	<i>ASP</i>	150	1,46	MET80
HsCRK3	<i>GoldScore</i>	50	0,75	LEU83
LiGSK	<i>ChemScore</i>	150	3,51	THR106
LdMAPK	<i>ASP</i>	50	0,77	GLU94
HsPKA	<i>GoldScore</i>	150	1,11	VAL123
HsSRPK	<i>ASP</i>	200	0,56	LEU168

Legenda: Tabela informa a melhor função de pontuação e número de poses ideal, o que significa, o protocolo responsável por oferecer as melhores condições para obtenção do menor valor de RMSD quando comparado com o ligante extraído da proteína cristalizada.

Figura 17 – Representação 3D dos compostos A6, A8 e Carvacrol utilizados para o *docking* molecular



Legenda: Em vinho está representado os átomos de Oxigênio, em azul os átomos de Nitrogênio e em branco os átomos de Hidrogênio. Cada ligante é representado em uma cor única nas cadeias carbônicas, sendo: vermelho para o A6, marsala para A8 e rosa para o carvacrol.

Para definição do resíduo de aminoácido que comporia o centro do sítio ativo para realização do *docking* molecular, foi realizado o alinhamento das estruturas da proteína de *Leishmania* com a proteína cristalizada para escolha do aminoácido da proteína modelada correspondente ao resíduo escolhido da cristalizada para o protocolo de *redocking*, ou no caso de incompatibilidade dos ligantes analisados e co-cristalizados, fez-se a análise dos resíduos presentes no sítio ativo, para definição do melhor alvo de interação.

Na interação proteína-ligante existem diversos tipos de ligações que irão realizar a formação do complexo, estas interações ocorrem através de ligações fracas, quando comparadas com as ligações covalentes. Porém há uma diferença na força entre cada tipo de ligação, ligações de hidrogênio são de força moderada a intermediária, com papel fundamental na estabilização do complexo; ligações eletrostáticas, do tipo pi-cátion e pi-ânion, são ligações de força moderada a forte, sendo a do tipo pi-cátion a mais forte, devido a repulsão que ocorre nas ligações pi-ânion; ligações hidrofóbicas são o tipo mais fraco. Já é conhecido a importância e relevância da força das ligações de hidrogênio nas interações proteína-ligante, apresentando diferentes formas de ligação, entre nitrogênio, oxigênio e flúor com o hidrogênio, sendo os tipos mais fortes, e o mais fraco entre carbono e hidrogênio (BULUSU; DESIRAJU, 2020; DU et al., 2016).

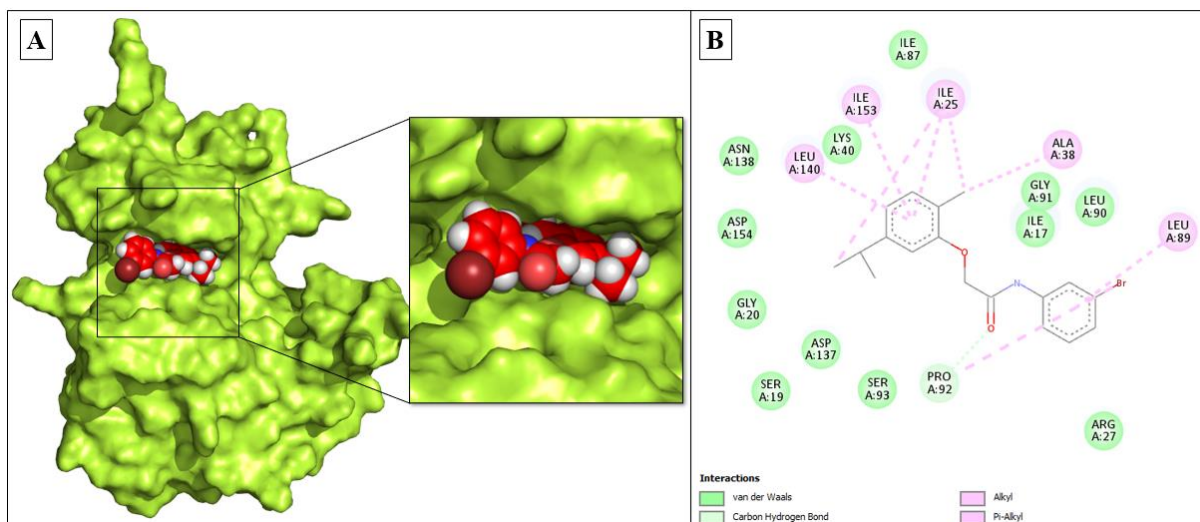
Outros tipos de ligações são consideradas altamente relevantes para força da interação

proteína-ligante, aumento da afinidade do ligante ao alvo e para a estabilização do complexo, como ligações eletrostática pi-cátion e pi-ânion, além das ligação hidrofóbicas envolvendo anel aromático, como *pi-pi stacked*, *pi-pi T-shaped* e amida *pi-stacked*. Estes tipos de interações já foram relatados em estudos anteriores que apresentavam importância fundamental para a arquitetura das proteínas, e por apresentarem menor força de ligação são consideradas dinâmicas pela facilidade de serem formadas e destruídas constantemente, o que reduz a energia de ligação favorecendo a redução da energia de ativação. A maior força de interação promovida pelas ligações eletrostáticas aumenta a afinidade da interação proteína-ligante. As interações de van der Waals são consideravelmente mais fracas quando se comparadas as demais interações intermoleculares, porém quando se observado o número de resíduos que interagem por van der Waals quanto maior o número maior será a força que o conjunto exerce sobre o complexo. Estudos indicam que de 5 a 20 resíduos interagindo por van der Waals quando se comparado a ligações convencionais de hidrogênio, estes apresentarão em conjunto uma força superior, sendo assim uma interação mais forte, visto como critério de comparação entre diferentes interações proteína-ligante (BULUSU; DESIRAJU, 2020; NELSON; COX, 2014; OKIYAMA et al., 2020; PANIGRAHI, 2008; SCRUTTON; RAINE, 1996).

5.3.1. LbCKI

Através da padronização realizada pelo *redocking* com a proteína cristalizada HsCKI, código de acesso do PDB: 3UZP, representado os melhores parâmetros na Tabela 6, foi realizado o *docking* molecular com a proteína modelada LbCKI no *software* GOLD, na função de pontuação ASP com 150 poses com ambos os ligantes A6 e A8. Na Figura 18 está representada a melhor pose do ligante A6, mostrando que o composto está encaixado na região do sítio ativo. Diferentemente das outras proteínas a LbCKI não houve possibilidade de seleção do resíduo de aminoácido central para *docking* através do alinhamento das estruturas pelo *Pymol* e seleção do resíduo correspondente da proteína cristalizada, devido a diferença da estrutura dos ligantes analisados em comparação com o co-cristalizado. Portanto foi necessário a análise dos resíduos componentes do sítio ativo e o que apresentou a melhor possibilidade de interação foi selecionado, neste caso foi a Asparagina 138, com centralização do *docking* concentrado no átomo de oxigênio.

Figura 18 - LbCKI + A6.

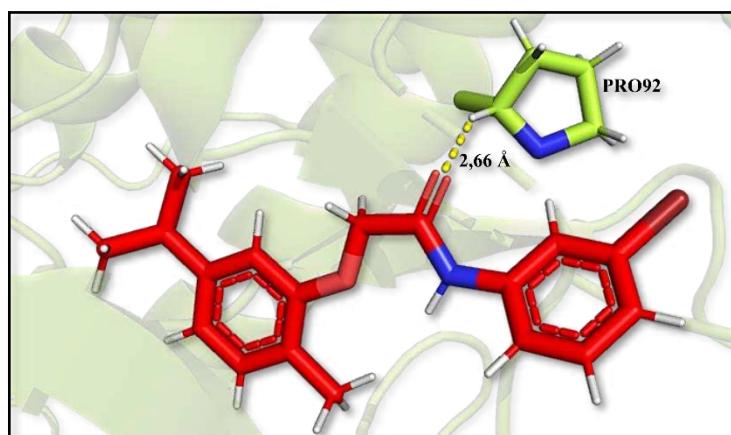


Legenda: Em A) representação em esferas do composto A6 ligado no sítio ativo da enzima LbCKI representada em superfície. B) Diagrama 2D das interações proteína-ligante do sítio ativo.

A análise das interações no sítio ativo da proteína com o ligante, apresentada nas Figuras 18 e 19, revela um cenário interessante. Embora a ligação de hidrogênio não convencional identificada na Figura 19 seja considerada fraca, com uma distância de 2,66 Å, estudos anteriores BULUSU & DESIRAJU, (2020), demonstraram que essas interações podem ser dinâmicas e contribuir para a estabilidade do complexo.

A ausência de ligações de hidrogênio convencionais mais fortes é compensada pela presença de muitas interações de van der Waals e ligações hidrofóbicas, como detalhado no Apêndice C. Essas interações, embora individuais sejam fracas, contribuem de forma significativa para a afinidade global do complexo proteína-ligante, como descrito por diversos autores (BITENCOURT-FERREIRA; VEIT-ACOSTA; DE AZEVEDO, (2019); BULUSU; DESIRAJU, (2020) e PANIGRAHI, (2008)).

Figura 19 - LbCKI + A6

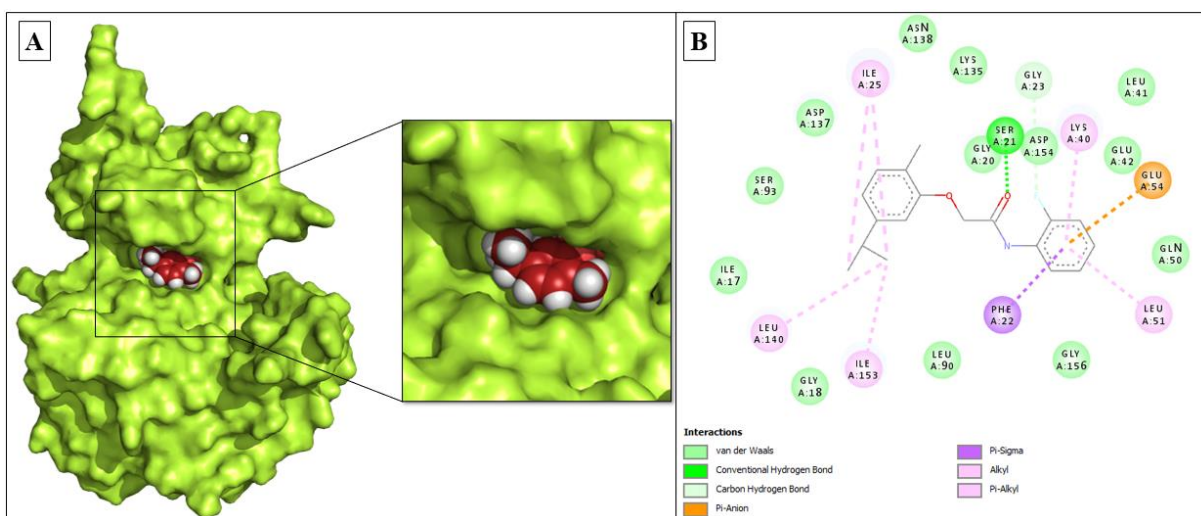


Legenda: ligação não convencional de hidrogênio com o resíduo Prolina (PRO) 92

A análise da interação entre a proteína LbCKI e o composto A8, apresentada nas Figuras 20 e 21, revela um perfil de ligação significativamente mais favorável em comparação com o composto A6. A Figura 21 destaca a presença de uma variedade de interações fortes e estabilizantes, incluindo ligações de hidrogênio convencionais e não convencionais, além de uma importante interação eletrostática do tipo pi-ânion. Essa última interação, conforme descrito por Bulusu e Desiraju (2020), contribui significativamente para a estabilidade e especificidade do complexo proteína-ligante.

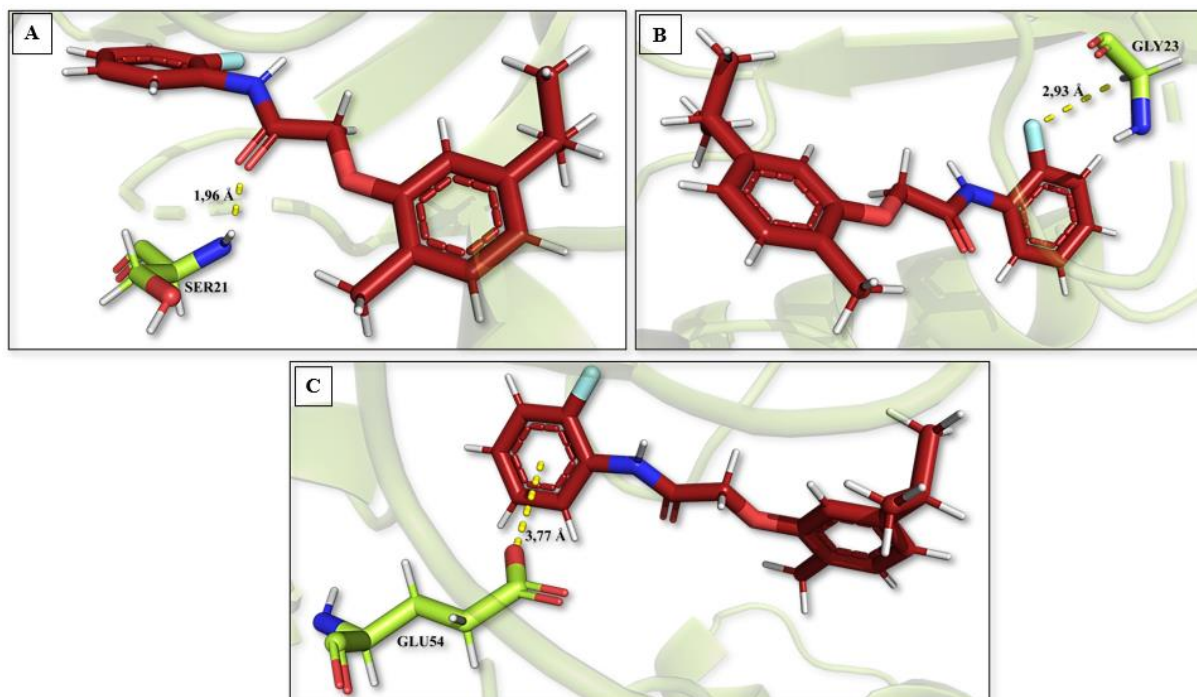
Além das ligações específicas, a presença de um número considerável de interações de van der Waals e ligações hidrofóbicas, como alquil-alquil e pi-alquil, reforça a afinidade entre as moléculas. Essa combinação de interações, que atende aos critérios descritos por Bulusu e Desiraju (2020) para uma interação forte e estável, confere ao composto A8 uma maior afinidade pela proteína LbCKI.

Figura 20 - LbCKI + A8.



Legenda: Em A) representação em esferas do composto A8 ligado no sítio ativo da enzima LbCKI representada em superfície. B) Diagrama 2D das interações proteína-ligante do sítio ativo.

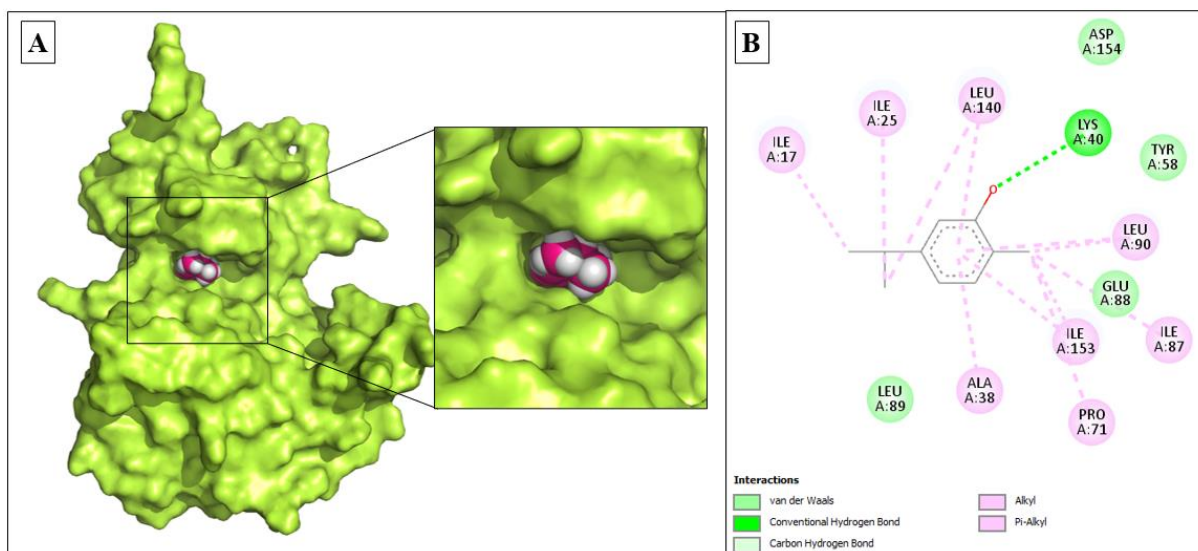
Figura 21 - LbCKI + A8.



Legenda: A) ligação de hidrogênio convencional com o resíduo Serina (SER) 21; B) ligação de não convencional de hidrogênio com o resíduo Glicina (GLY) 23; C) ligação iônica pi-ânion com o resíduo de Glutamato (GLU) 54.

Diferentemente dos derivados A6 e A8, o precursor carvacrol, apesar de possuir ancoragem no sítio ativo corretamente, os números de interações por forças de van der Waals, exibidas na Figura 22, foram consideravelmente inferiores aos apresentados pelos compostos A6 e A8, na interação com a proteína LbCKI. Representando que a interação com o precursor possuiria menor afinidade do que se comparada com os seus derivados. Evidenciada através da observação do score obtido no *docking* molecular, utilizando a função de pontuação ASP, confirma a superioridade da interação com o composto A8, corroborando os resultados da análise visual das interações. A maior pontuação obtida para o composto A8 indica uma maior energia de ligação e, conseqüentemente, uma interação mais favorável, com o menor score observado tendo sido da interação com o carvacrol, apresentado na Tabela 7 (LIEBESCHUETZ; COLE; KORB, 2012).

Figura 22 - LbCKI + Carvacrol.



Legenda: Em A) representação em esferas do composto carvacrol ligado no sítio ativo da enzima LbCKI representada em superfície. B) Diagrama 2D das interações proteína-ligante do sítio ativo.

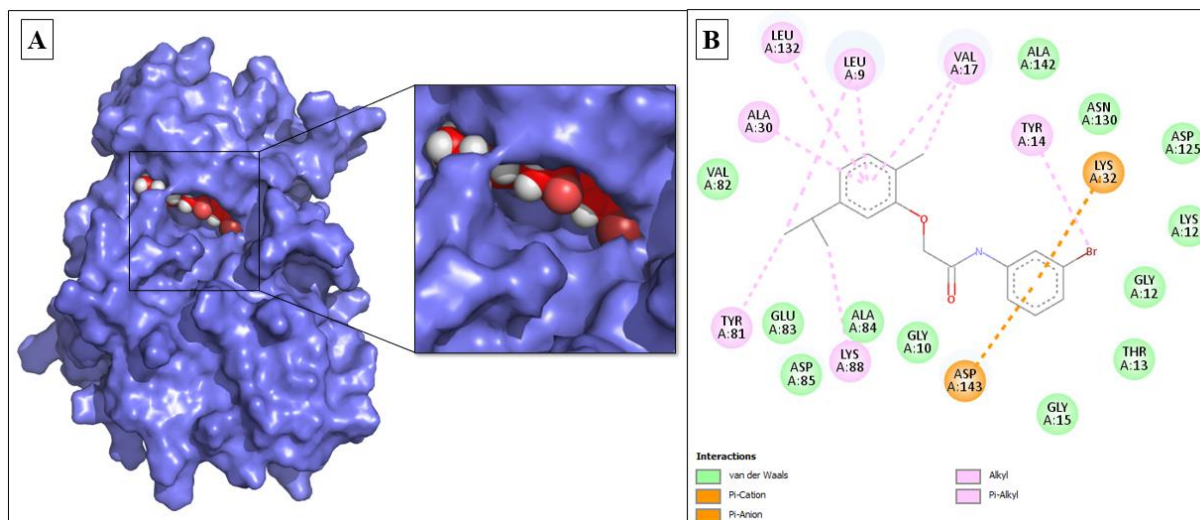
5.3.2. LbCRK3

Para validar o protocolo de *docking* utilizado neste estudo, realizamos um *docking* de validação utilizando a proteína CRK3 como alvo e a estrutura cristalizada da proteína HsCDK2 (código PDB: 8UV0) como referência. A escolha da HsCDK2 se justifica pela alta similaridade estrutural entre as duas proteínas, especialmente na região do sítio ativo. A função de pontuação *Goldscore* foi empregada, gerando 50 poses para cada composto.

Antes do *docking*, as estruturas cristalizada e modelada da CRK3 foram alinhadas, com foco na superposição do resíduo de valina 82 da LbCRK3 com a leucina 83 da HsCDK2. A escolha desse resíduo foi baseada nos resultados de HUMMEL et al., (2024) que identificaram a leucina 83 como um resíduo chave na interação com inibidores de CDK2.

A Figura 23 apresenta a pose mais favorável do composto A6 no sítio ativo da enzima LbCRK3, obtida através do *docking*. A validação do protocolo de *docking* e a identificação do resíduo de valina 82 como um ponto de ancoragem importante para os ligantes corroboram a confiabilidade dos resultados obtidos neste estudo.

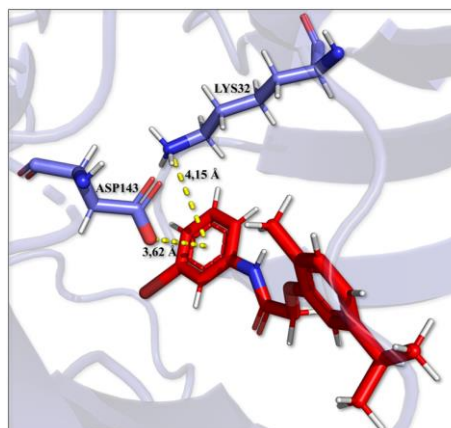
Figura 23 - LbCRK3 + A6 .



Legenda: Em A) representação em esferas do composto A6 ligado no sítio ativo da enzima LbCRK3 representada em superfície. B) Diagrama 2D das interações proteína-ligante do sítio ativo.

O diagrama 2D apresentado na Figura 23B mostra todas as interações proteína-ligante, tendo apenas interações fortes como, ligações eletrostáticas (Figura 24) do tipo pi-cátion com o resíduo de Lisina 32 e do tipo pi-ânion com o Aspartato 143. De acordo com SCRUTTON; RAINE, (1996) essas são ligações importantes para a arquitetura e estabilidade da proteína, além de relatarem que muitas amins biologicamente ativas apresentam ligações pi-cátion, representando a capacidade de interação dos compostos com proteínas, o que mostra que este tipo de interação é recomendada para o *design* de fármacos. Reforçando ainda mais essa interação tem-se a presença de diversas interações do tipo van der Waals por toda a estrutura do composto, além de ligação hidrofóbicas do tipo alquil e pi-alquil na região do anel aromático sem presença de halogênio, estabilizando a ligação do restante da estrutura do composto. Essas interações são fundamentais para a estabilidade de complexos proteína-ligante e são frequentemente encontradas em compostos biologicamente ativos.

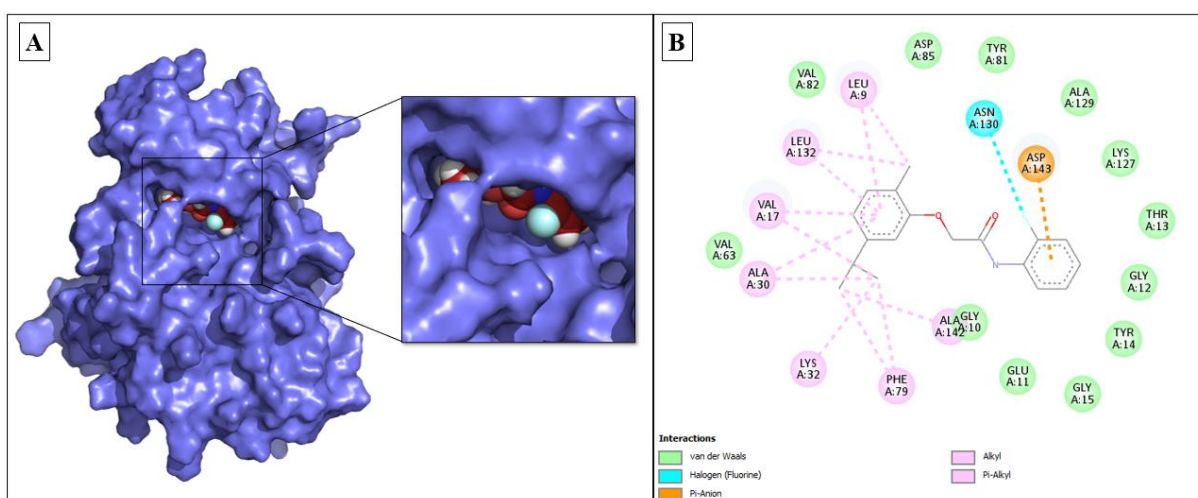
Figura 24 – LbCRK3 + A6.



Legenda: Ligação pi-cátion com o resíduo Lisina (LYS) 32, e ligação pi-ânion com o resíduo Aspartato (ASP) 143.

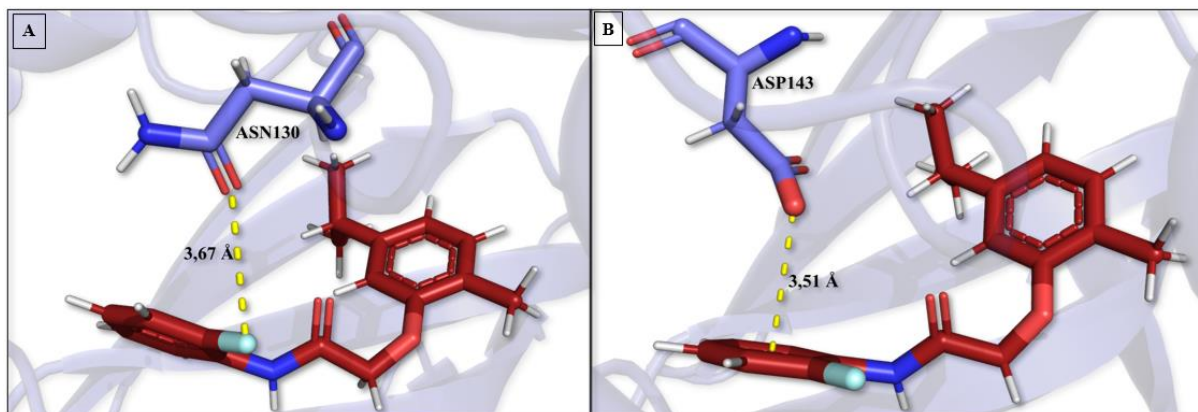
O composto A8, por sua vez, apresenta um perfil de interação mais diversificado (Figura 25). Além das interações eletrostáticas, observam-se ligações de halogênio entre o átomo de flúor do composto e o resíduo de asparagina da proteína, essas principais interações são representadas na Figura 26. Essas interações, juntamente com as ligações de hidrogênio e as forças de van der Waals, contribuem para uma forte e específica interação entre o composto A8 e a proteína LbCRK3. Em ambos os casos, as interações hidrofóbicas, como as ligações alquil-alquil e pi-alquil, desempenham um papel importante na estabilização do complexo, contribuindo para a complementaridade estrutural entre o ligante e o sítio ativo da proteína (BULUSU; DESIRAJU, 2020; OKIYAMA et al., 2020).

Figura 25 - LbCRK3 + A8.



Legenda: Em A) representação em esferas do composto A8 ligado no sítio ativo da enzima LbCRK3 representada em superfície. B) Diagrama 2D das interações proteína-ligante do sítio ativo.

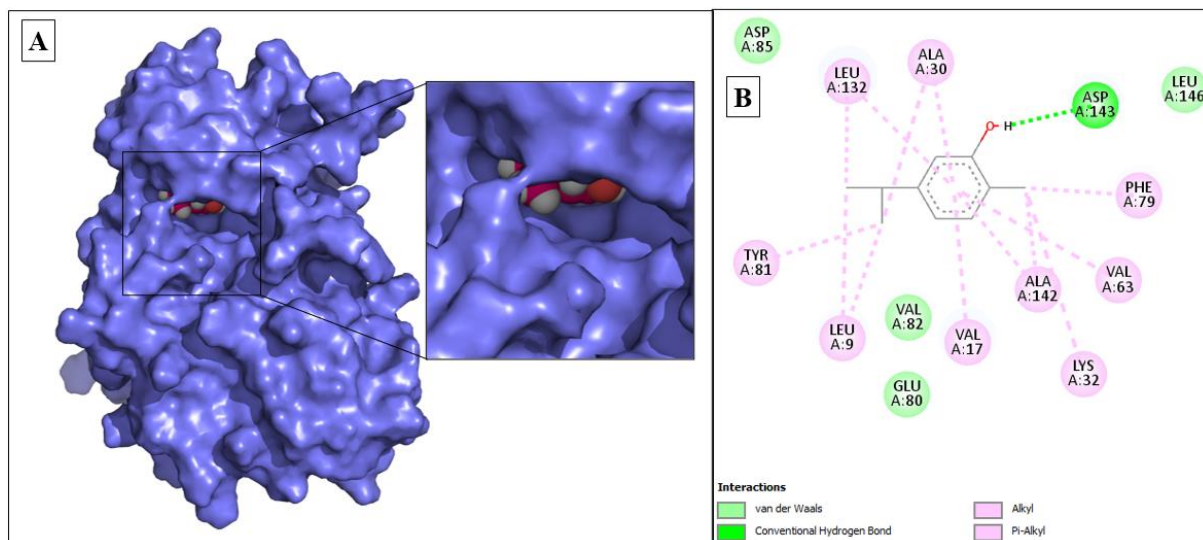
Figura 26 - LbCRK3 + A8.



Legenda: Em A) ligação de halogênio com o resíduo Asparagina 130; B) ligação pi-ânion com o resíduo Aspartato 143

Em resumo, os resultados indicam que tanto o composto A6 quanto o composto A8 formam interações estáveis com a proteína LbCRK3. No entanto, o composto A8 apresenta um perfil de interação mais diversificado e robusto, com destaque para as ligações de halogênio e as interações hidrofóbicas. Essa combinação de interações sugere que o composto A8 possui uma maior afinidade e seletividade pela proteína. Enquanto a interação com o precursor carvacrol (Figura 27), foi mais fraca, com poucas interações por forças de van der Waals e maior predominância por ligações mais fracas, reduzindo a afinidade e seletividade da proteína pelo ligante. A função de pontuação utilizada para o *docking* da LbCRK3 (Tabela 7) foi o *GoldScore*, que classifica o melhor score gerado através do *docking* como aquele que for maior, e a comparação entre o melhor score da melhor pose dos compostos A6 e A8, foi definido como o A8, novamente como o melhor, indicando que este composto, seria possivelmente um melhor ligante para a proteína LbCRK3 do que o A6, sendo ambos os derivados sendo consideravelmente melhor que o carvacrol, com score obtido de quase metade do valor dos derivados (LIEBESCHUETZ; COLE; KORB, 2012).

Figura 27 - LbCRK3 + Carvacrol.

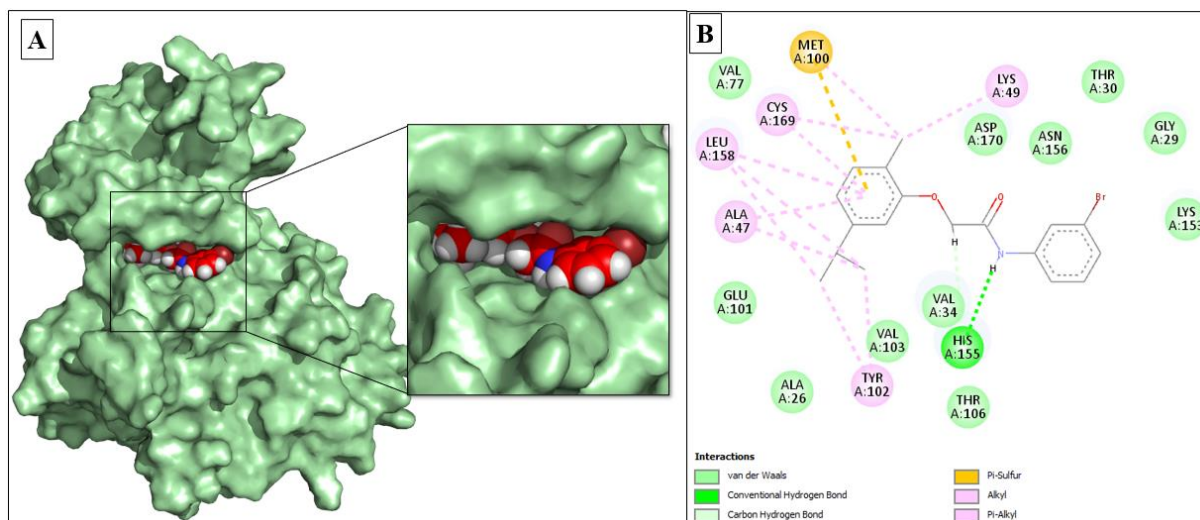


Legenda: Em A) representação em esferas do composto carvacrol ligado no sítio ativo da enzima LbCRK3 representada em superfície. B) Diagrama 2D das interações proteína-ligante do sítio ativo.

5.3.3. LbGSK

A padronização do *redocking* para a proteína GSK foi realizada utilizando a LiGSK, código de acesso PDB: 7S6V. Sendo a melhor função de pontuação utilizada para o protocolo de *docking* o *ChemScore*, com 150 poses, para ambos os ligantes. Devido a padronização ter sido realizada com uma proteína cristalizada de *Leishmania infantum* há uma enorme conservação tanto de estrutura, quanto de sequência, portanto nos dois casos, *redocking* e *docking*, foi utilizado o resíduo de Treonina 106 como centro da interação no *software* GOLD. Na Figura 28A, temos a representação do composto A6 encaixado no sítio ativo da enzima LbGSK, pela imagem pode-se observar que o ligante está bem encaixado, com comprovação através de B, que é apresentado o diagrama 2D de todas as interações proteína-ligante.

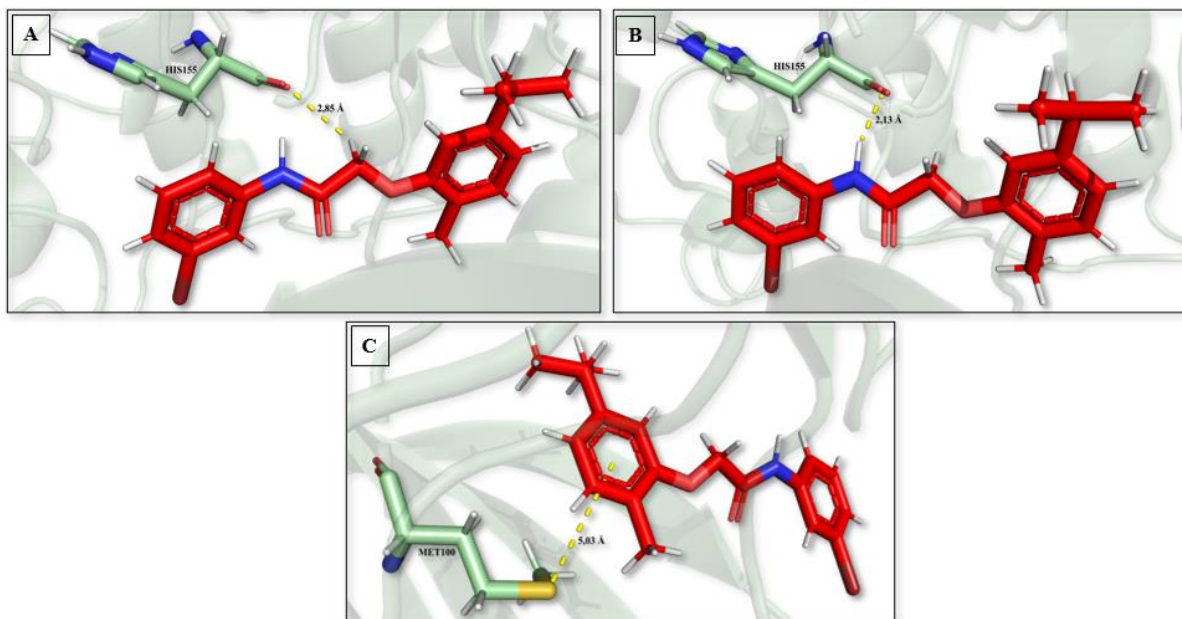
Figura 28 - LbGSK + A6.



Legenda: Em A) representação em esferas do composto A6 ligado no sítio ativo da enzima LbGSK representada em superfície. B) Diagrama 2D das interações proteína-ligante do sítio ativo.

Diferentemente das proteínas anteriores há interação pi-sulfur com o resíduo de Metionina 100, que é um tipo de ligação que já foi comprovada em estudos anteriores ser muito importante a ser considerada no *design* de fármacos, como no exemplo de um potencial fármaco anti-malária, testado contra *Plasmodium falciparum*, que apresentou um interação importante com resíduo de cisteína que também possui o átomo de enxofre realizando ligação pi-sulfur (MACDONALD; BOYD, 2015; OKIYAMA et al., 2020). A presença de ligações de hidrogênio convencionais e não convencionais com um mesmo resíduo de aminoácido, como no caso da Histidina 155 mostrado na Figura 29 A e B, aumentam a força de interação do ligante, apesar que a distância de ligação apresentada em A por ser uma ligação de hidrogênio não convencional está acima do ideal, tendo como parâmetro que um boa geometria desse tipo de ligação é relatado como até 2,0 Å, enquanto a ligação convencional em B, com 2,13 Å está excelente, representando uma ligação forte, estável e com geometria correta de acordo com BULUSU; DESIRAJU, (2020) e OKIYAMA et al., (2020).

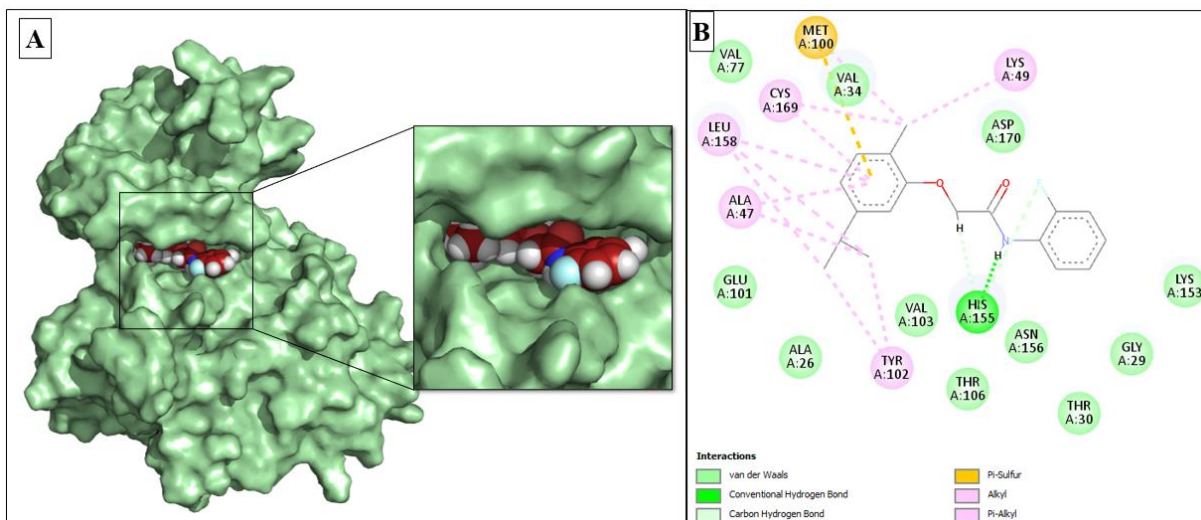
Figura 29 - LbGSK + A6.



Legenda: Em A) ligação não convencional de carbono hidrogênio com o resíduo de Histidina (HIS) 155; B) ligação convencional de hidrogênio com o resíduo Histidina (HIS) 155; C) ligação pi-sulfur com o resíduo Metionina (MET) 100.

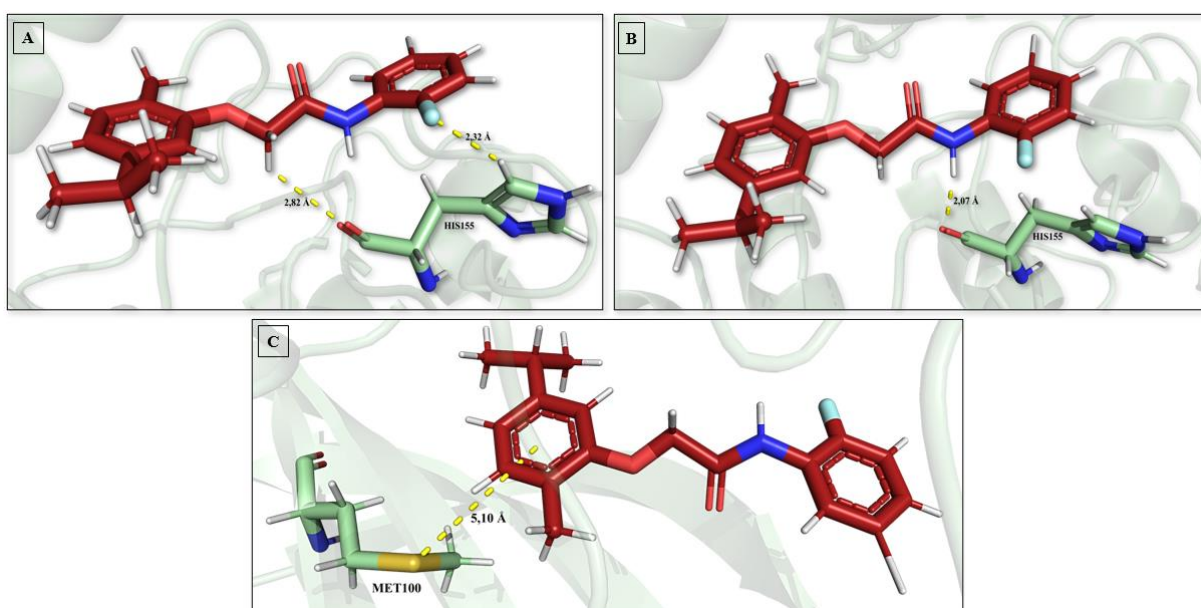
Na Figura 30 é apresentado o composto A8 representado em esferas encaixado no sítio ativo da LbGSK, com o diagrama 2D das interações em B, comparando a interação com os dois compostos, a enzima LbGSK, possui praticamente as mesmas ligações com ambos, porém aparentando possuir maior afinidade pelo A8. A razão para essa possível vantagem do composto A8, pode ser mostrada na Figura 31, que mostra que a distância de ligação de hidrogênio convencional é inferior à apresentada com o composto A6, o que indicaria uma maior força de ligação, além de que o composto A8 apresenta duas interações de hidrogênio não convencional, em comparação com apenas uma, do composto A6 (BULUSU; DESIRAJU, 2020). Porém, não apenas as ligações mais fortes são fundamentais para a predição de interação entre proteínas e ligantes, ligações fracas como ligações hidrofóbicas e interações de van der Waals, podem ser de suma importância para definição da melhor possível interação, o que é analisado pelo score apresentado pós *docking* molecular. Portanto com a análise do score das duas interações, apesar de apresentar um cenário, que parecia ser mais estável e melhor, a predição da interação LbGSK-A6 se sobressaiu em relação ao ligante A8 (Tabela 7).

Figura 30 - LbGSK + A8.



Legenda: Em A) representação em esferas do composto A8 ligado no sítio ativo da enzima LbGSK representada em superfície. B) Diagrama 2D das interações proteína-ligante do sítio ativo.

Figura 31 - LbGSK + A8.

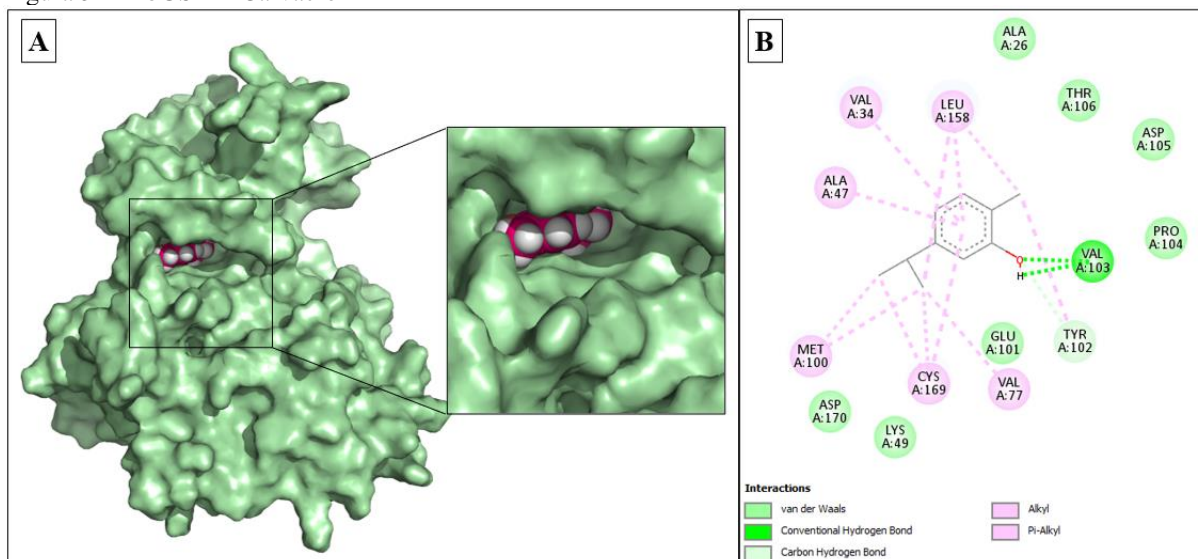


Legenda: Em A) ligação não convencional de carbono hidrogênio com o resíduo de Histidina (HIS) 155; B) ligação convencional de hidrogênio com o resíduo Histidina (HIS) 155; C) ligação pi-sulfur com o resíduo Metionina (MET) 100.

De acordo com o score (Tabela 7) gerado após o docking e devido a função de pontuação utilizada ter sido ChemScore, que define como a melhor ancoragem é aquela que apresentar o maior score, o composto A6 se sobressaiu em comparação com o A8 (LIEBESCHUETZ; COLE; KORB, 2012). A interação LbGSK-Carvacrol (Figura 32), apresentou o menor score, portanto predizendo que poderia haver menor afinidade da proteína

pelo precursor do que pelos derivados. Os tipos de interações que são demonstrados no diagrama 2D na Figura 32, são predominantemente mais fracas, com o único tipo de ligação mais forte sendo a ligação convencional de hidrogênio com a Valina, enquanto os demais compostos apresentaram além dessa, interações do tipo pi-sulfur.

Figura 32 - LbGSK + Carvacrol



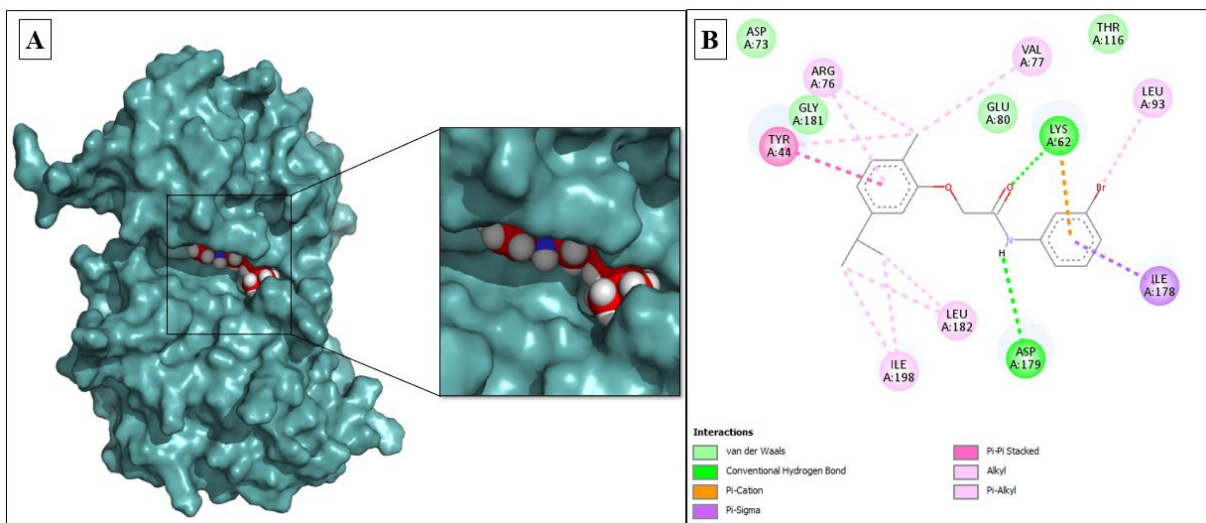
5.3.4. LbMAPK

A proteína LbMAPK assim como a anterior LbGSK, possui maior similaridade com uma proteína cristalizada do mesmo gênero, porém neste caso foi com a LdMAPK, código de acesso PDB: 4O2Z. A melhor função de pontuação definida no *redocking* foi ASP, com 50 poses. Por ter como referência a proteína de outra espécie do parasito, do mesmo gênero há uma certa conservação de sequência entre as proteínas, e após o alinhamento foi definido como o resíduo Glutamato 80, como centro da ancoragem molecular. Apesar da representação do composto A6 em esferas (Figura 33) aparentar estar bem encaixado no sítio ativo da enzima LbMAPK, como apresentado no diagrama 2D de interação à direita, a interação proteína-ligante embora apresente ligações fortes, possui poucas interações do tipo van der Waals, e poucas ligações estabilizantes hidrofóbicas do tipo alquil e pi-alquil. O que no contexto geral é caracterizado por uma interação mais fraca, pouco estável e com baixa afinidade.

As interações mais fortes são apresentadas na Figura 34, a distância de ligação mostrada em A é favorável e dentro do limite com o resíduo de Lisina, mostrando que é uma ligação muito forte, porém devido a interação com o Aspartato apresentar ligação com distância de 2,79 Å, este valor é superior ao determinado, de 2,30 Å, e portanto apesar de ser

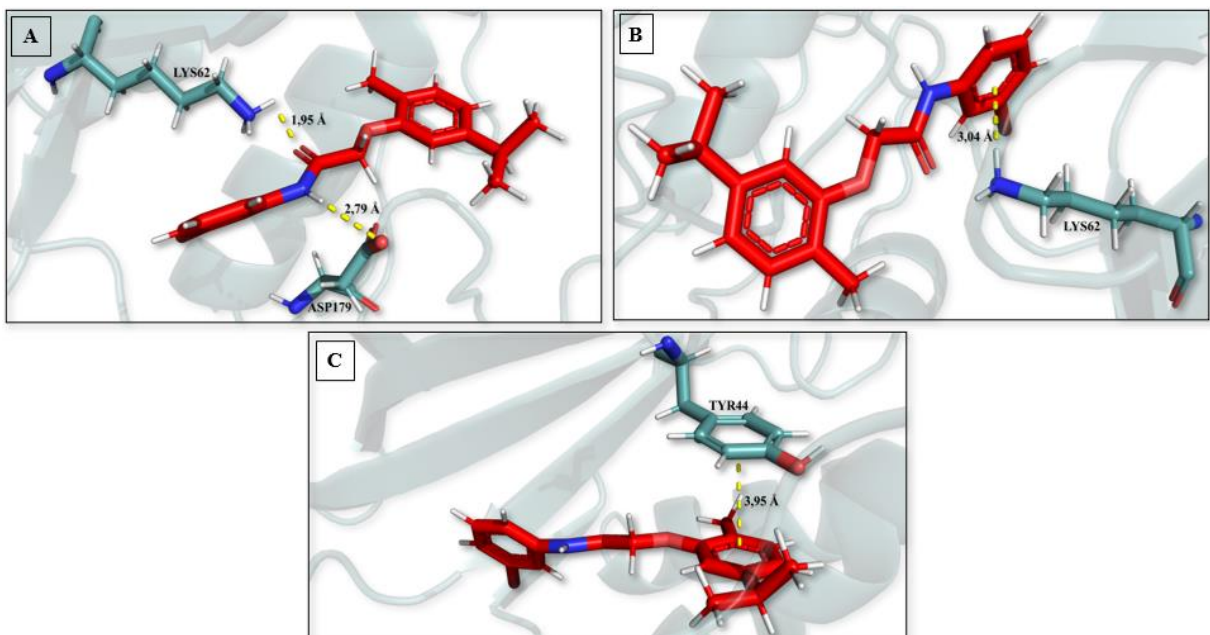
uma ligação convencional de hidrogênio, apresenta força de ligação consideravelmente menor (BULUSU; DESIRAJU, 2020; OKIYAMA et al., 2020). A ligação apresentada em C, é uma ligação hidrofóbica mais forte e relevante que as demais, a ligação do tipo *pi-pi stacked* é um tipo de ligação altamente recomendada como alvo no desenvolvimento de fármacos, sendo um tipo de interação muito atrativa, por questão da importância na estabilização da ligação e estando dentre uma das principais ligações responsáveis pelo aumento da afinidade proteína-ligante (OKIYAMA et al., 2020).

Figura 33 - LbMAPK + A6.



Legenda: Em A) representação em esferas do composto A6 ligado no sítio ativo da enzima LbMAPK representada em superfície. B) Diagrama 2D das interações proteína-ligante do sítio ativo.

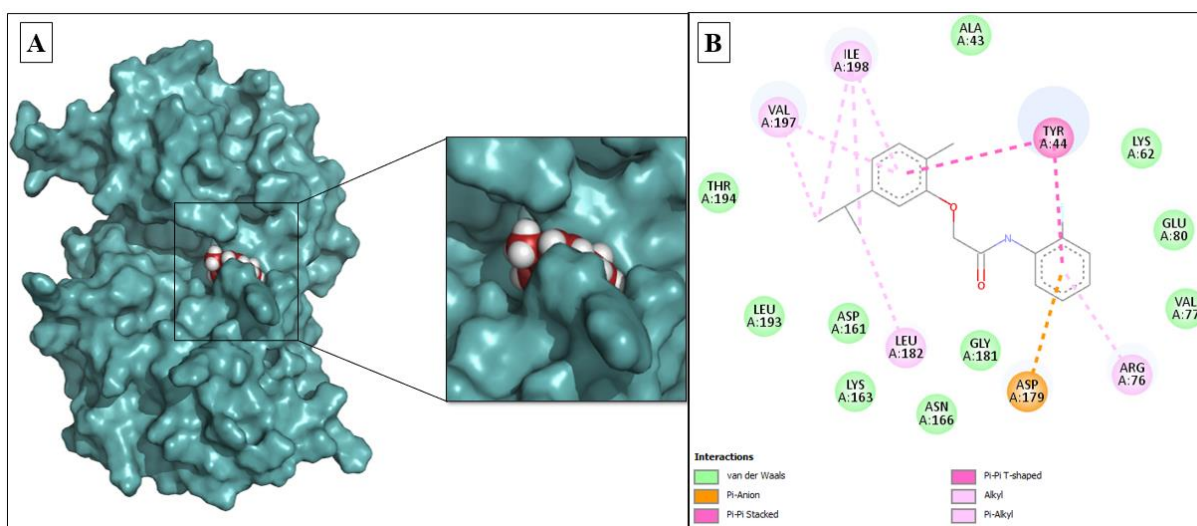
Figura 34 - LbMAPK + A6.



Legenda: Em A) ligação convencional de hidrogênio com o resíduo Lisina 62 e com a Aspartato 179; B) ligação pi-cátion com o resíduo Lisina 62; C) ligação *pi-pi stacked* com o resíduo Tirosina 44.

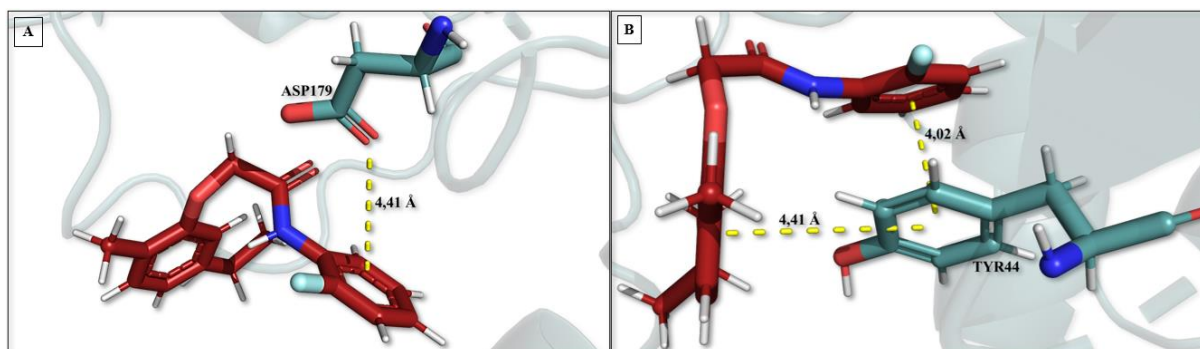
A interação LbMAPK com o composto A8 comprova a importância que se dá pelo número de interações de van der Waals apresentada no diagrama 2D na Figura 35. É possível perceber que por toda extensão da estrutura do composto A8 há uma distribuição das interações moleculares. Comparando o score (Tabela 7) obtido pelo *software* GOLD, a interação com o ligante A8 foi o melhor, mostrando maior afinidade do que o composto A6. Sendo resultado da maior presença das interações mais fracas de van der Waals que aumentaram a estabilidade da interação e também a presença das ligações *pi-pi stacked* e *T-shaped* (Figura 36) que são responsáveis por promover a maior afinidade entre proteína e ligante (OKIYAMA et al., 2020; SCRUTTON; RAINE, 1996).

Figura 35 - LbMAPK + A8.



Legenda: Em A) representação em esferas do composto A8 ligado no sítio ativo da enzima LbMAPK representada em superfície. B) Diagrama 2D das interações proteína-ligante do sítio ativo.

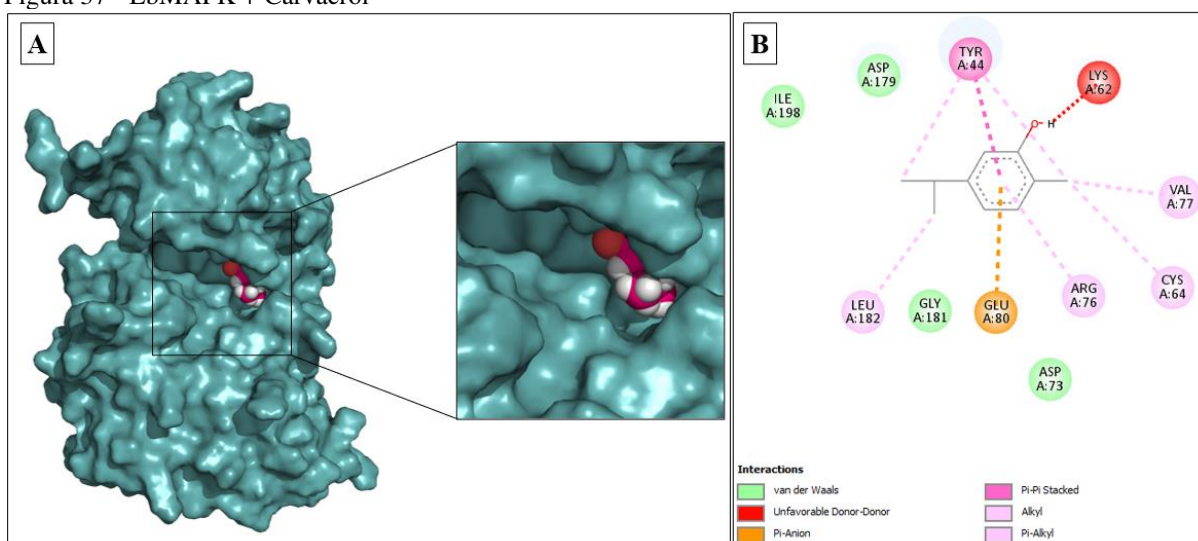
Figura 36 - LbMAPK + A8.



Legenda: Em A) ligação pi-ânion com o resíduo Aspartato 179; B) ligação *pi-pi stacked* entre o resíduo Tirosina 44 com distância 4,02Å e ligação *pi-pi T-shaped* com o resíduo Tirosina 44 com distância 4,41 Å.

A interação da proteína LbMAPK com o precursor carvacrol (Figura 37) , como apresentado pelo diagrama 2D na Figura 37B, foi consideravelmente pior do que a interação da proteína com os derivados. Pois apresentou redução em números de interações do tipo van der Waals em comparação com o composto A8, o que promove uma menor afinidade com a proteína. Apesar da manutenção das interações do tipo eletrostática – pi-ânion e hidrofóbica do tipo pi, a interação com o precursor carvacrol prediz a interação desfavorável do tipo doador-doador, que faz com que a interação fosse instável, e portanto com menor chance de ocorrer idealmente. Dessa forma, ao observar o score (Tabela 7) obtido pós docking, como já se era esperado, o valor obtido da interação com o carvacrol foi bem menor que os derivados.

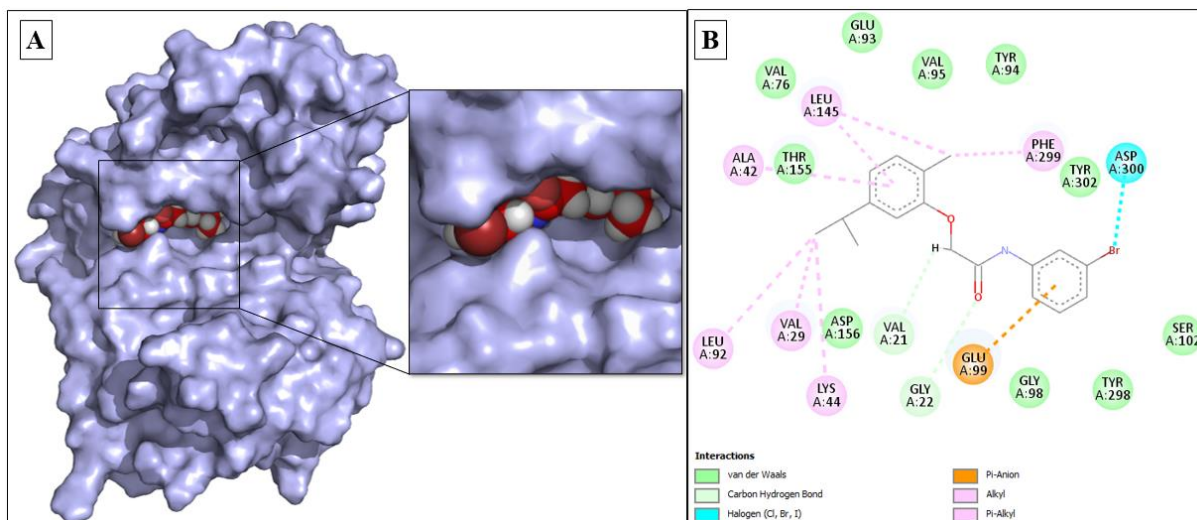
Figura 37 - LbMAPK + Carvacrol



5.3.5. LbPKA

A proteína LbPKA apresentou maior similaridade com a proteína HsPKA, código de acesso PDB: 7Y1G. E o protocolo de *redocking* definido foi com a função de pontuação *Goldscore*, 150 poses, o resíduo de aminoácido escolhido como centro da interação foi a Valina 123, de acordo com o determinado por (TOYOTA et al., 2022) , após alinhamento com a estrutura da LbPKA o resíduo correspondente foi a Asparagina 112, que, portanto, foi o alvo para o *docking* molecular. Na Figura 38 temos a representação do composto A6 em esferas encaixado perfeitamente no sítio ativo da enzima, em B, é apresentado o diagrama 2D das interações proteína-ligante, mostrando boa distribuição por toda superfície do composto.

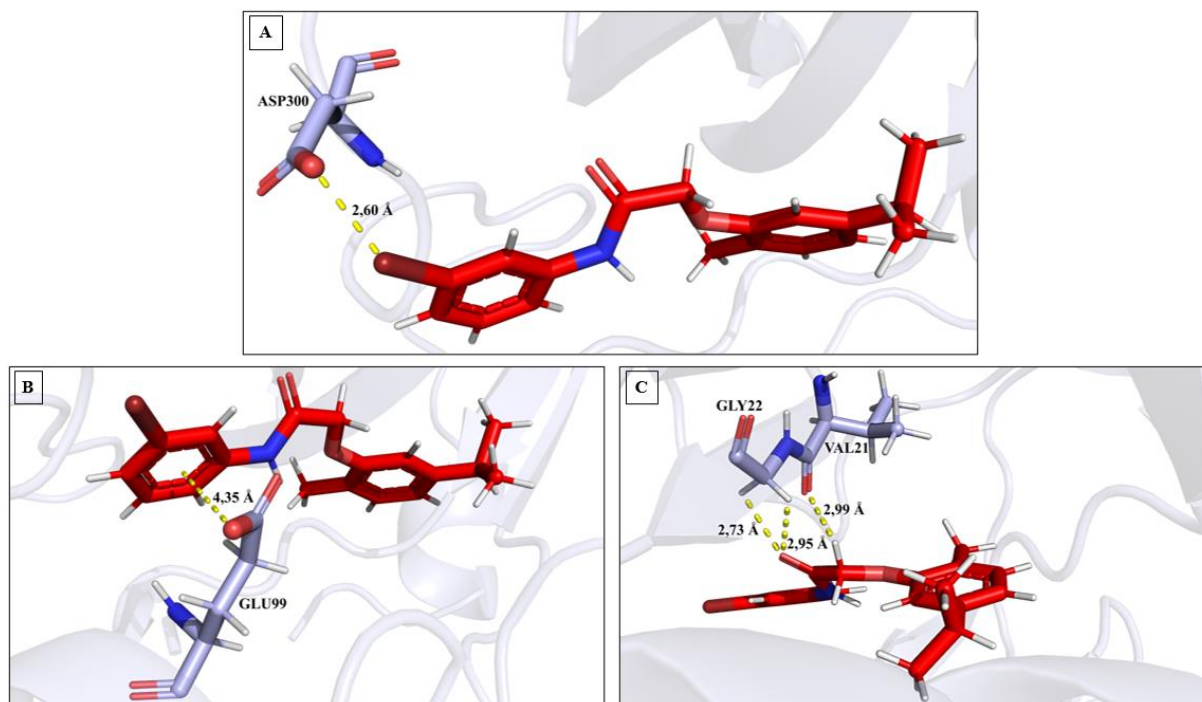
Figura 38 - LbPKA + A6.



Legenda: Em A) representação em esferas do composto A6 ligado no sítio ativo da enzima LbPKA representada em superfície. B) Diagrama 2D das interações proteína-ligante do sítio ativo.

Na Figura 39 é mostrado as ligações mais fortes e relevantes para a interação, a ligação do tipo halogênio que ocorre com o resíduo de Aspartato possui distância inferior a 3,0 Å, o que representa uma ligação mais forte, aumentando a especificidade da proteína pelo ligante (OKIYAMA et al., 2020). Além da ligação pi-ânion na extremidade oposta do mesmo anel em que há interação com o halogênio, o que representa uma maior estabilização da interação. As interações do tipo ligação de hidrogênio não convencional que ocorre com os resíduos de Glicina e Valina, devido a maior distância de ligação são caracterizadas com ligações mais fracas, auxiliando na estabilidade e contribuindo para a afinidade proteína-ligante (BULUSU; DESIRAJU, 2020). O número de resíduos com interações por forças de van der Waals foi visto como comum, quando comparado com a interação com outras proteínas deste mesmo estudo, e as ligações alquil, pi-alquil que ocorrem apenas no anel aromático com as ramificações auxiliam na afinidade da interação (representação em 3D no Apêndice C –).

Figura 39 - LbPKA + A6.



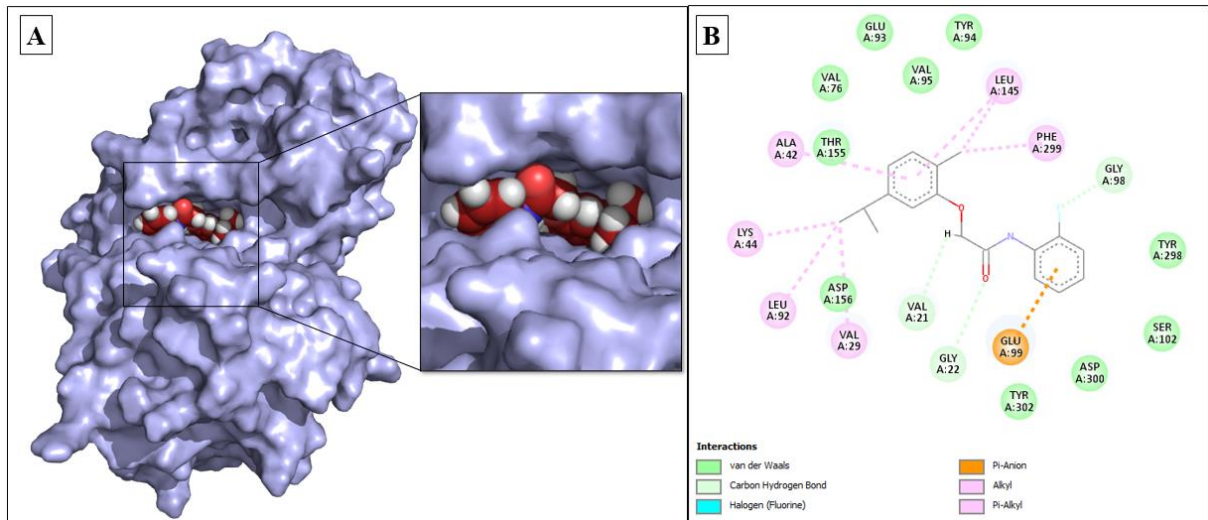
Legenda: Em A) ligação de halogênio com o resíduo Aspartato 300; B) ligação pi-ânion com o resíduo Glutamato 99; C) ligação não convencional de hidrogênio com os resíduos Glicina 22 e Valina 21

A análise das interações entre os ligantes A6 e A8 com a proteína LbPKA revela um perfil de ligação similar, com a presença de ligações de hidrogênio não convencionais, ligações de halogênio e interações de van der Waals. No entanto, existem diferenças importantes entre os dois complexos.

O ligante A8 (Figura 40) apresenta um maior número de ligações de hidrogênio não convencionais e uma ligação de halogênio com uma distância de 1,90 Å (Figura 41), indicando uma interação mais forte (OKIYAMA et al., 2020). Essas interações contribuem para uma maior especificidade e afinidade do ligante A8 pela proteína (BITENCOURT-FERREIRA; VEIT-ACOSTA; DE AZEVEDO, 2019; BULUSU; DESIRAJU, 2020). Apesar dessas características favoráveis do ligante A8, o composto A6 demonstra uma maior afinidade pela proteína LbPKA, conforme indicado pelo *score* de *docking*. Essa aparente contradição pode ser explicada pela conformação do ligante A6, que resulta em um arranjo espacial mais favorável das interações, levando a uma maior energia de ligação.

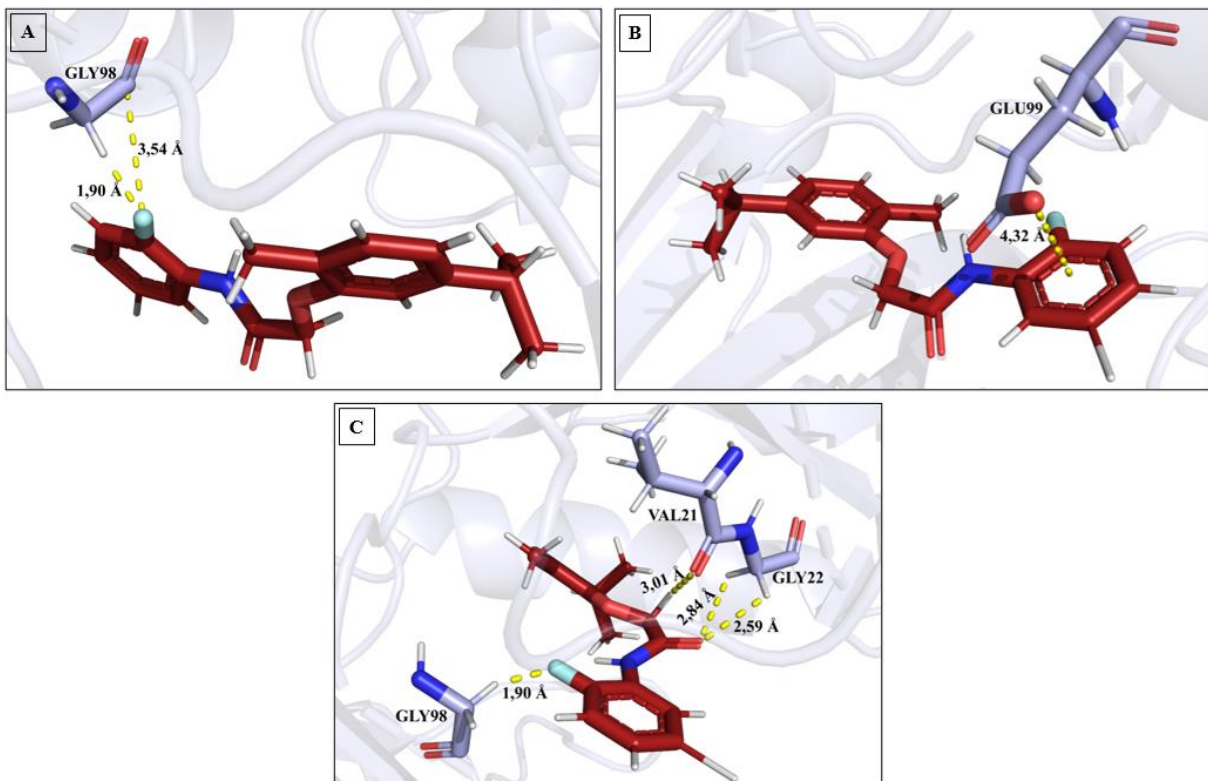
Em resumo, ambos os ligantes apresentam interações significativas com a proteína LbPKA, no entanto, o ligante A6 demonstra uma maior afinidade, sugerindo que a conformação do ligante e o arranjo espacial das interações desempenham um papel crucial na determinação da força de ligação (LIEBESCHUETZ; COLE; KORB, 2012).

Figura 40 - LbPKA + A8.



Legenda: Em A) representação em esferas do composto A8 ligado no sítio ativo da enzima LbPKA representada em superfície. B) Diagrama 2D das interações proteína-ligante do sítio ativo.

Figura 41 - LbPKA + A8.

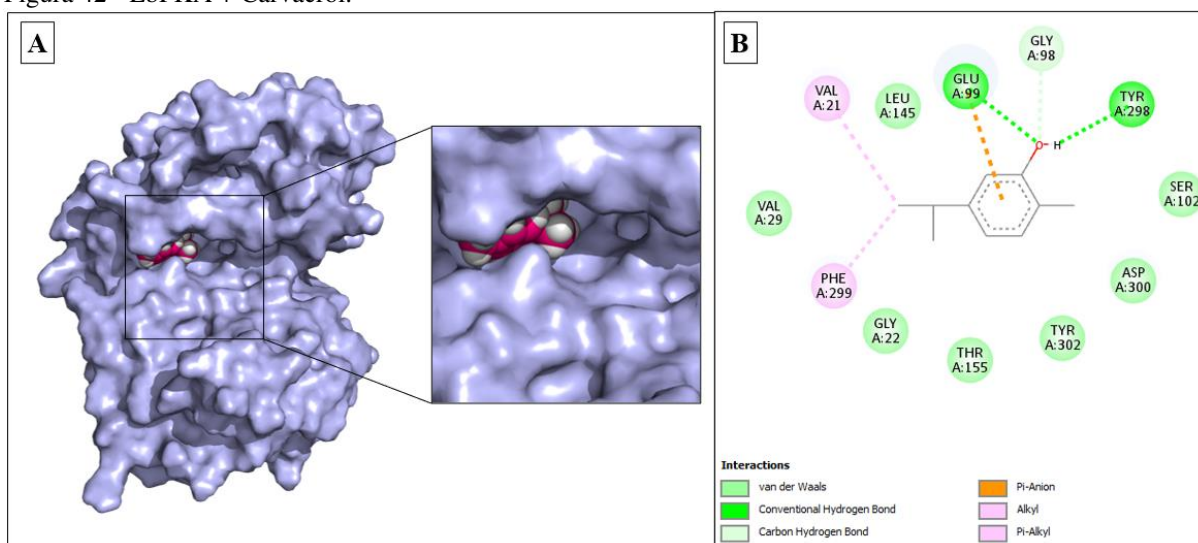


Legenda: Em A) ligação de halogênio com duas ligações com o resíduo de Glicina 98 ;B) ligação pi-ânion com o resíduo Glutamato 99; C) ligação não convencional de hidrogênio com os resíduos Glicina 98, Valina 21 e duas ligações com a Glicina 22.

Diferentemente da interação com os derivados, o docking com o precursor carvacrol praticamente não apresentou predição de possíveis interações com diversas ligações,

apresentando apenas possibilidade de 6 ligações distribuídas entre ligações de hidrogênio, eletrostáticas e hidrofóbicas, com 7 interações do tipo van der Waals, enquanto ambos os derivados apresentaram a predição de 11 ligações do tipo eletrostáticas, hidrofóbicas e de hidrogênio convencional ou de halogênio, com 10 interações do tipo van der Waals. Dessa forma, o precursor apresentou a menor possibilidade de interação, com menor afinidade e estabilidade, o que também foi representado através da análise dos valores de score, que também foi inferior em comparação com os derivados.

Figura 42 - LbPKA + Carvacrol.



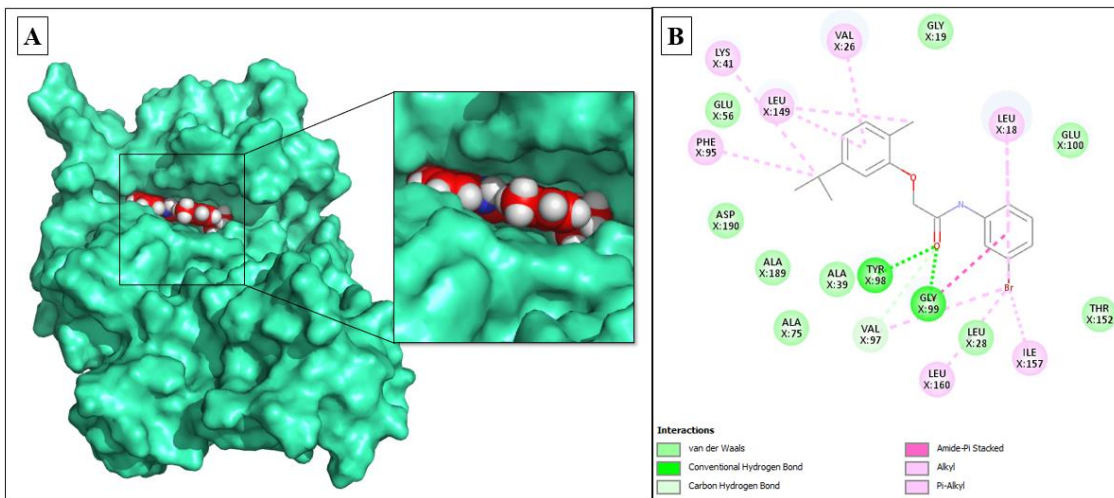
5.3.6. LbSRPK

A alta similaridade estrutural entre a proteína LbSRPK e a HsSRPK1 (PDB: 4WUA) permitiu a identificação do resíduo de tirosina 98 da LbSRPK como um ponto chave para a interação com o ligante A6, conforme sugerido por PIMENTEL et al., (2023). A Figura 43 mostra o encaixe do composto A6 no sítio ativo da LbSRPK, com o ligante bem internalizado na cavidade.

As principais ligações são representadas em 3D na Figura 44, a interação que ocorre com o resíduo de Glicina através da ligação amida *pi-stacked* é muito relevante para a estrutura da proteína e para a força da interação, visto que é um tipo de ligação que já foi relatado como fundamental em inibidores de proteínas como relatado no SCRUTTON; RAINE, (1996) em um inibidor de Tripsina. SCRUTTON; RAINE, (1996) evidenciam que a distância recomendada da interação deve ser entre 3,4 e 6,0 Å, e a distância encontrada no presente estudo foi de 4,32 Å, o que representa uma interação dentro dos parâmetros necessários, sendo fundamental para a afinidade da interação proteína-ligante. As ligações de hidrogênio presentes na interação apresentam distâncias acima do ideal, definindo como

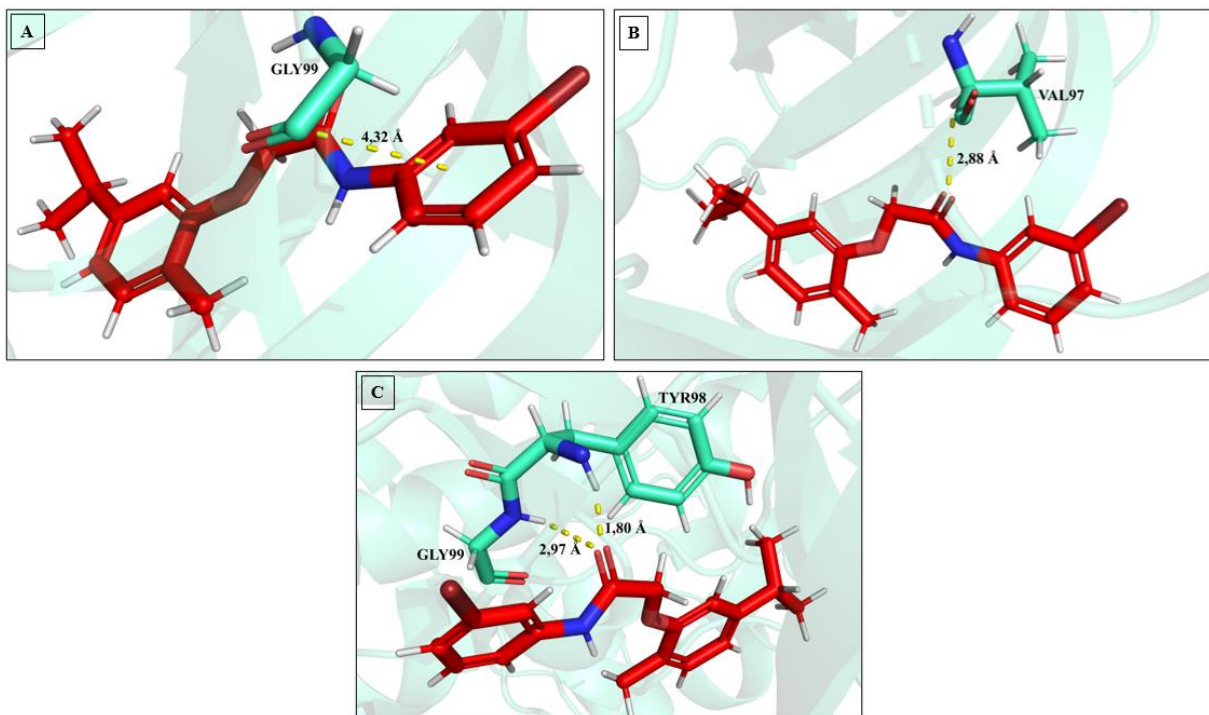
ligações de menor força, com exceção com o resíduo Tirosina 98, que apresenta distância de ligação de 1,80 Å, tendo como uma ligação mais forte, exercendo maior estabilidade (BITENCOURT-FERREIRA; VEIT-ACOSTA; DE AZEVEDO, 2019; BULUSU; DESIRAJU, 2020). O número de ligações e interações mais fracas como van der Waals e ligações hidrofóbicas são essenciais para estabilização da interação e contribuem em número com a afinidade com o ligante.

Figura 43 - LbSRPK + A6 .



Legenda: Em A) representação em esferas do composto A6 ligado no sítio ativo da enzima LbSRPK representada em superfície. B) Diagrama 2D das interações proteína-ligante do sítio ativo.

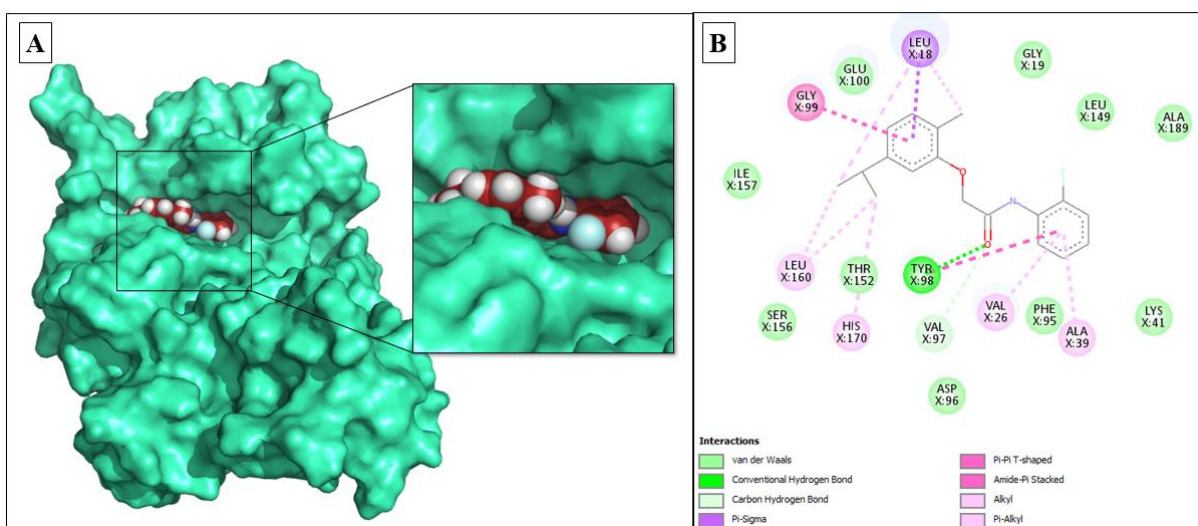
Figura 44 - LbSRPK + A6.



Legenda: Em A) ligação amida pi-stacked com o resíduo Glicina 99; B) ligação não convencional com o resíduo Valina 97; C) ligação convencional de hidrogênio com os resíduos de Glicina 99 e Tirosina 98

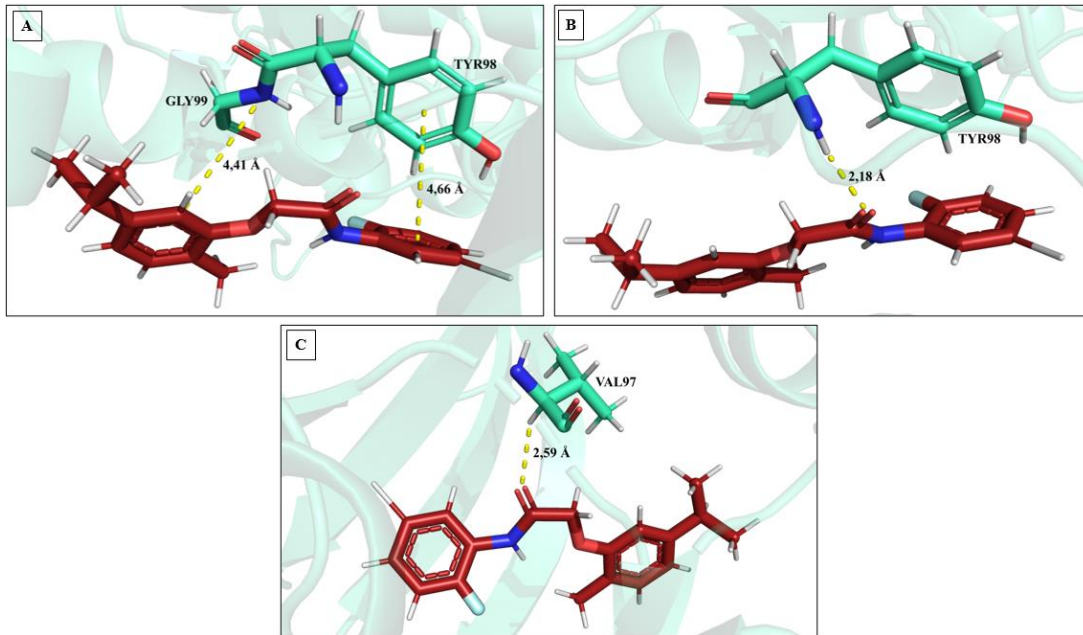
Diferentemente da interação com o ligante A6, a interação LbSRPK-A8 (Figura 45) possui uma melhor distribuição de suas principais ligações entre os 2 anéis aromáticos o que faz com que a interação com o ligante seja mais específica por toda a sua superfície, aumentando assim a sua afinidade. As ligações do tipo pi, que ocorrem entre os resíduos Glicina 99 e Tirosina 98 e o composto A8 formam uma espécie de ponte, que fortalece a interação, estando ambas dentro das distâncias de ligação corretas (Figura 46) e apresentando maior força de ligação, estabilização, afinidade e contribuição para a arquitetura da proteína (OKIYAMA et al., 2020; SCRUTTON; RAINE, 1996).

Figura 45 - LbSRPK + A8 .



Legenda: Em A) representação em esferas do composto A8 ligado no sítio ativo da enzima LbSRPK representada em superfície. B) Diagrama 2D das interações proteína-ligante do sítio ativo.

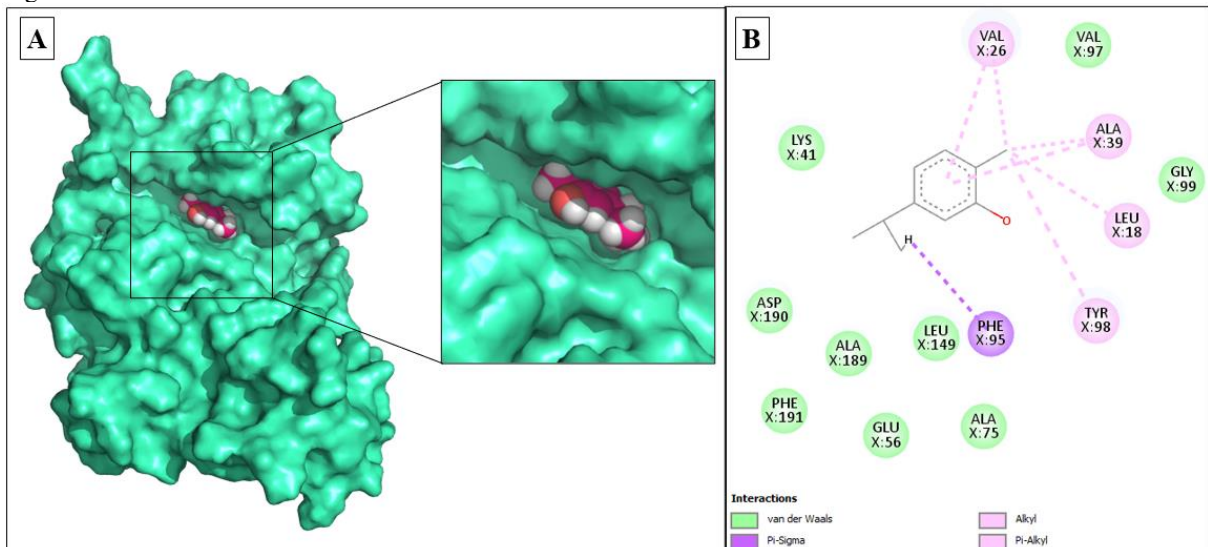
Figura 46 - LbSRPK + A8.



Legenda: Em A) ligação amida pi-stacked com o resíduo Glicina 99 e ligação *pi-pi T-shaped* com o resíduo de Tirosina 98; B) ligação convencional de hidrogênio com o resíduo Tirosina 98; C) ligação não convencional de hidrogênio com o resíduo Valina 97.

A interação LbSRPK-Carvacrol apresentou apenas ligações mais fracas do tipo hidrofóbica, alquil, pi-alquil e pi-sigma, que representam menor estabilidade de interação, e sendo menos possível a interação, do que quando se comparado com a interação da proteína com os derivados. O mesmo é observado e comprovado através da análise dos scores obtidos pelo docking (Tabela 7), que apresentou um valor inferior do precursor em relação a ambos os derivados.

Figura 47 - LbSRPK + Carvacrol.



Devido ao uso de diferentes funções de pontuação nos *dockings* das diversas proteínas, a comparação direta dos *scores* é limitada. No entanto, ao analisar as proteínas que utilizaram a mesma função de pontuação, é possível identificar tendências.

Entre as proteínas para as quais a função de pontuação ASP foi utilizada (LbCKI, LbMAPK e LbSRPK), a LbSRPK apresentou os maiores *scores* (Tabela 7) para ambos os compostos A6 e A8, indicando uma maior afinidade. E em todas essas proteínas o score da interação das mesmas com o precursor carvacrol foi inferior aos derivados. Similarmente, entre as proteínas que utilizaram a função *GoldScore* (LbCRK3 e LbPKA), a LbCRK3 apresentou os maiores *scores*, com o composto A8 apresentando a melhor interação.

Considerando as limitações da comparação entre diferentes funções de pontuação, pode-se concluir que, de forma geral, o composto A8 apresenta uma maior afinidade pelas proteínas estudadas. No entanto, é importante ressaltar que a comparação direta dos *scores* entre as diferentes funções de pontuação deve ser feita com cautela, devido às diferenças nas escalas e nos parâmetros utilizados por cada função.

Tabela 7 - Relação de *scores* dos ligantes A6, A8 e Carvacrol de cada proteína com as respectivas funções de pontuação utilizadas no *docking*.

Função de Pontuação	Proteínas	Score Carvacrol	Score A6	Score A8
<i>ASP</i>	CKI	16,39	20,72	27,62
<i>GoldScore</i>	CRK3	38,17	60,87	62,25
<i>ChemScore</i>	GSK	22,87	27,04	26,23
<i>ASP</i>	MAPK	19,61	28,18	28,70
<i>GoldScore</i>	PKA	33,91	52,00	50,97
<i>ASP</i>	SRPK	19,31	31,66	32,00

5.4. Árvore Filogenética

5.4.1. CKI

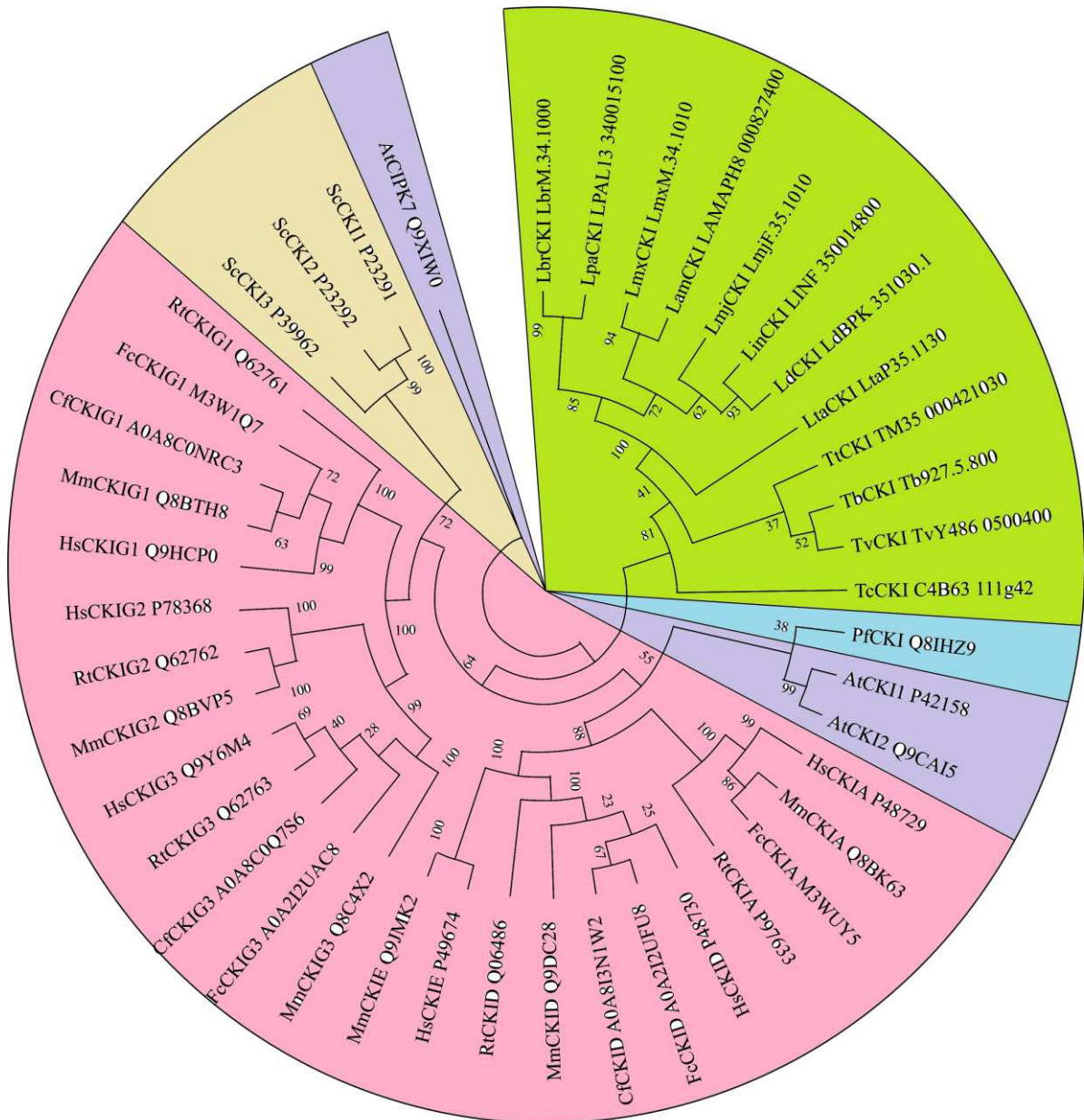
A árvore filogenética construída para a proteína CKI (Figura 48), utilizando 43 sequências de 20 espécies diferentes, revelou uma clara separação entre os clados de tripanossomatídeos (*Leishmania e Trypanosoma*) e mamíferos. A alta confiança nas relações filogenéticas é evidenciada pelos valores de *bootstrap* superiores a 70% na maioria dos nós.

As espécies de *Leishmania* formam um clado distinto, mais próximo filogeneticamente do clado dos *Trypanosoma* do que do clado dos mamíferos, corroborando as relações filogenéticas conhecidas entre esses grupos. De forma interessante, as sequências

de *Plasmodium*, *Arabidopsis* e *Saccharomyces* foram agrupadas com as sequências de mamíferos, indicando uma maior similaridade e possivelmente uma origem evolutiva comum para essas proteínas. Essa observação está em concordância com os resultados de DANGOOR et al., (2013), que também encontraram uma maior similaridade entre as proteínas de *Plasmodium* e mamíferos.

Em resumo, a análise filogenética da proteína CKI revelou padrões de relacionamento evolutivo complexos, com uma clara separação entre os tripanossomatídeos e os mamíferos, como mostrado na Figura 48, e um agrupamento de *Plasmodium*, *Arabidopsis* e *Saccharomyces* com os mamíferos já havia sido relatado anteriormente. Esses resultados contribuem para a compreensão da evolução e diversificação da proteína CKI em diferentes grupos de organismos.

Figura 48 - Árvore filogenética de seqüências da proteína Caseína cinase I (CKI) de protozoários, planta e mamíferos.



Legenda: Em rosa representado as seqüências de mamíferos, em lilás as seqüências de *Arabidopsis*, em bege representa as seqüências de levedura, em azul representado a seqüência de *Plasmodium* e em verde representado as seqüências da família de tripanossomatídeos. Descritos nas pontas dos ramos com a abreviação do nome da espécie, seguido do nome da proteína, com indicação do código de acesso. *Leishmania braziliensis* (LbrCKI), *Leishmania tarentolae* (LtaCKI), *L. mexicana* (LmxCKI), *Leishmania major* (LmaCKI), *Leishmania infantum* (LinCKI), *Leishmania panamensis* (LpaCKI), *Leishmania donovani* (LdoCKI), *Leishmania amazonensis* (LamCKI), *Trypanosoma cruzi* (TcCKI), *Trypanosoma theileri* (TtCKI), *Trypanosoma brucei* (TbCKI), *Trypanosoma vivax* (TvCKI), *Plasmodium falciparum* (PfCKI), *Saccharomyces cerevisiae* (ScCKI1, ScCKI2, ScCKI3), *Homo sapiens* (HsCKIA, HsCKID, HsCKIG1, HsCKIG2, HsCKIG3), *Rattus norvegicus* (RnCKIA, RnCKID, RnCKIG1, RnCKIG2, RnCKIG3), *Mus musculus* (MmCKIA, MmCKID, MmCKIE, MmCKIG1, MmCKI2, MmCKI3), *Arabidopsis thaliana* (AtCKI1, AtCKI2, AtCKI3, AtCIPK7), *Felis catus* (FcCKIA, FcCKID, FcCKIG1, FcCKIG3) e *Canis familiaris* (CfCKID, CfCKIE, CfCKIG1, CfCKI3).

5.4.2. CRK3

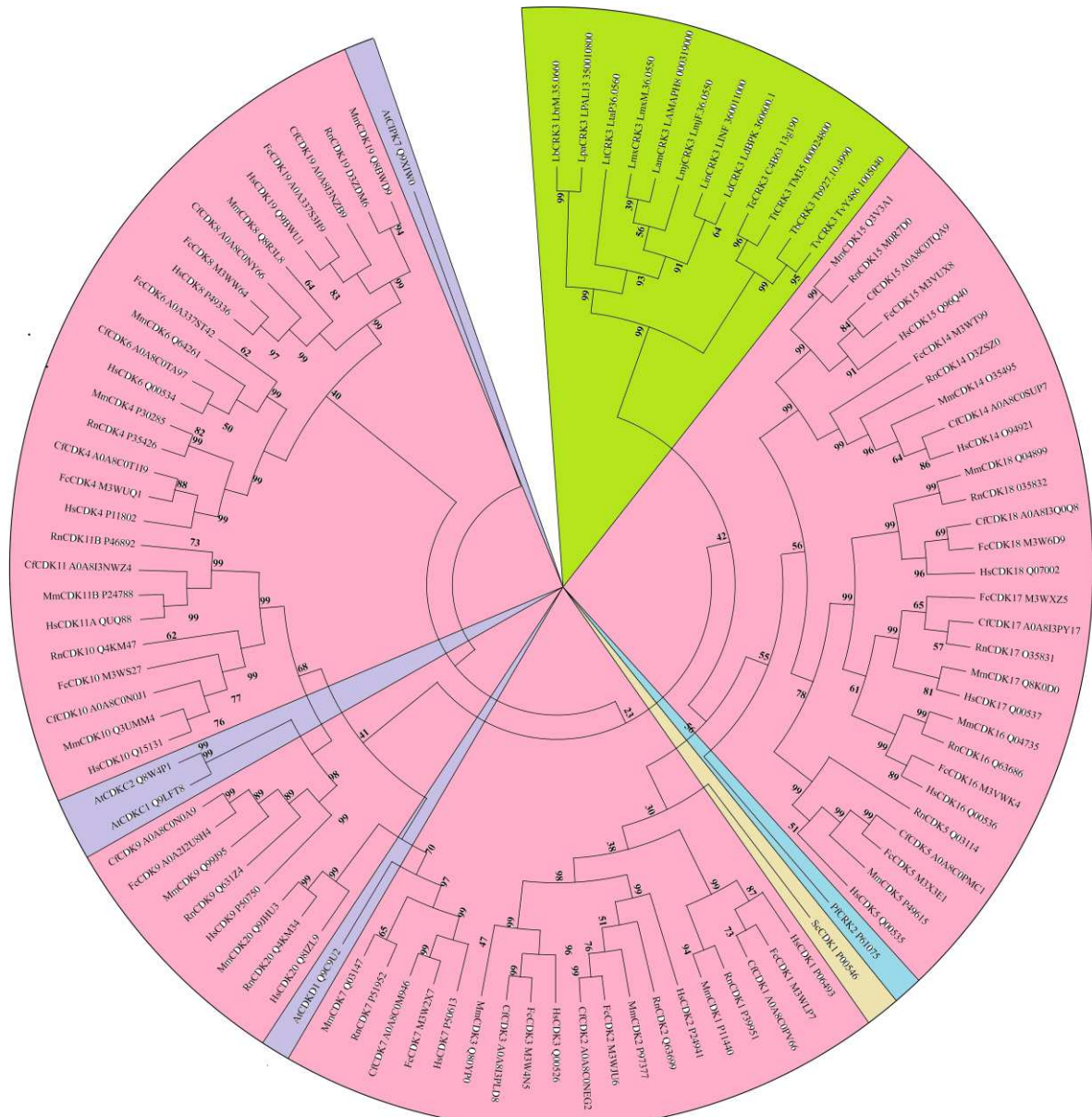
A árvore filogenética da proteína CRK3 (Figura 49), construída a partir de 101 sequências de 20 espécies, revela uma clara separação entre os clados de tripanossomatídeos e mamíferos, com valores de bootstrap robustos nos nós internos, indicando alta confiança nessas divisões. No entanto, os nós centrais da árvore apresentam valores de bootstrap mais baixos, sugerindo incertezas nas relações filogenéticas mais antigas. Essa menor confiança pode ser atribuída a eventos de divergência antiga, taxas de evolução variáveis ou falta de informação filogenética em algumas regiões do alinhamento (EFRON; HALLORAN; HOLMES, 1996).

A análise da diversidade de isoformas revela uma grande proximidade evolutiva entre as isoformas de cada espécie, com cada isoforma formando um clado distinto. Essa diversificação pode ser resultado de processos como duplicação gênica, splicing alternativo e mutação, e sugere que as diferentes isoformas desempenham funções especializadas.

A presença de *S. cerevisiae* e *A. thaliana* nos clados de mamíferos, foi condizente com análises filogenéticas realizadas anteriormente, como observado por HUGHES; DA SILVA; FRIEDMAN, (2001).

Em conclusão, a árvore filogenética da proteína CRK3 revela padrões de evolução complexos, com uma clara separação entre os tripanossomatídeos e os mamíferos, e uma diversificação significativa das isoformas dentro de cada espécie. A compreensão da evolução dessa proteína é fundamental para elucidar suas funções biológicas e suas relações com a evolução dos organismos.

Figura 49 - Árvore filogenética de seqüências da proteína Cinase Relacionada a Ciclina/ Cinase Dependente de Ciclina (CRK/CDK) de protozoários, planta e mamíferos.



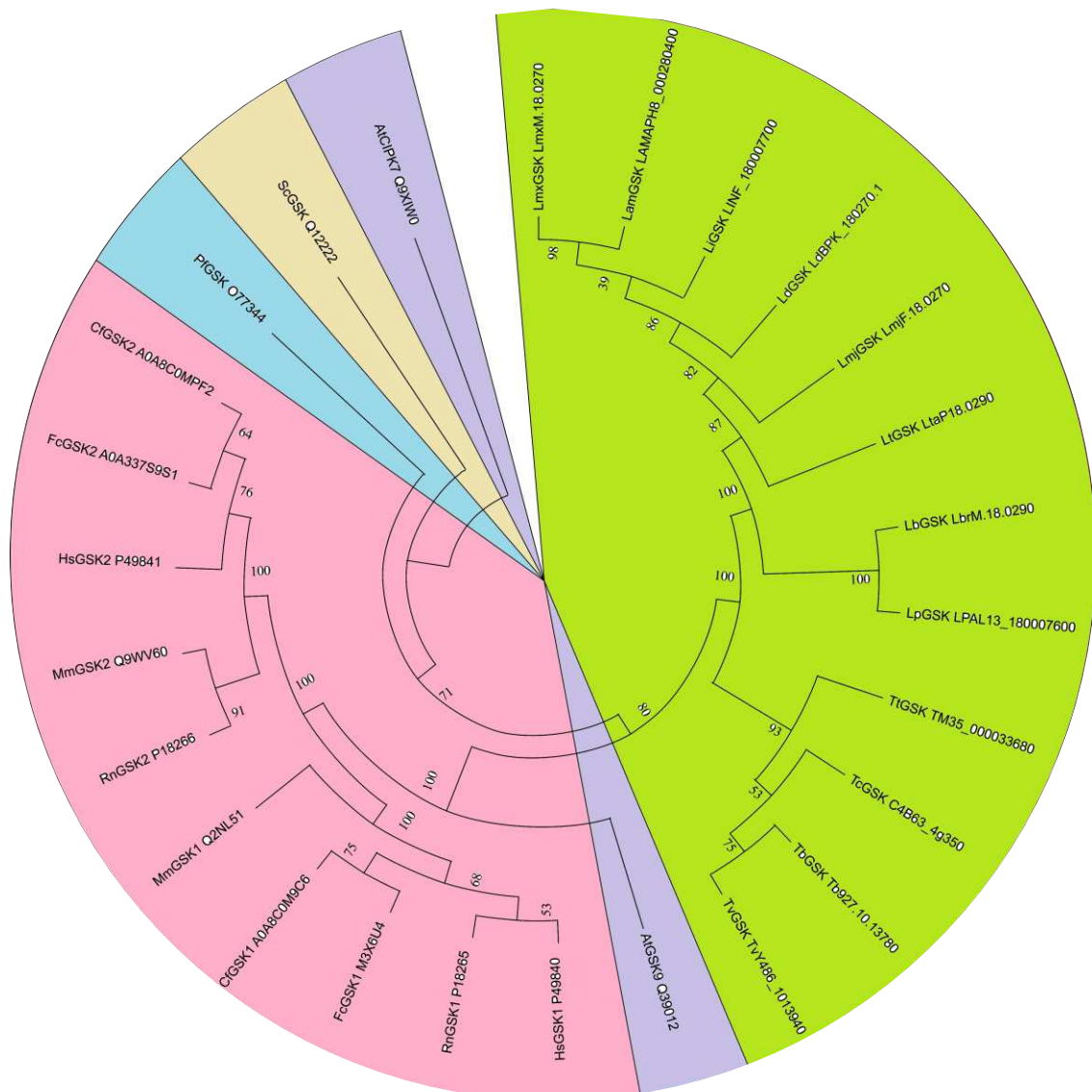
Legenda: Em rosa representado as seqüências de mamíferos, em lilás as seqüências de *Arabidopsis*, em bege representa as seqüências de levedura, em azul representado a seqüência de *Plasmodium* e em verde representado as seqüências da família de tripanossomatídeos. Descritos nas pontas dos ramos com a abreviação do nome da espécie, seguido do nome da proteína, com indicação do código de acesso. *Leishmania braziliensis* (LbrCRK3), *Leishmania tarentolae* (LtaCRK3), *L. mexicana* (LmxCRK3), *Leishmania major* (LmaCRK3), *Leishmania infantum* (LinCRK3), *Leishmania panamensis* (LpaCRK3), *Leishmania donovani* (LdoCRK3), *Leishmania amazonensis* (LamCRK3), *Trypanosoma cruzi* (TcCRK3), *Trypanosoma theileri* (TtCRK3), *Trypanosoma brucei* (TbCRK3), *Trypanosoma vivax* (TvCRK3), *Plasmodium falciparum* (PfCRK2), *Saccharomyces cerevisiae* (ScCDK1), *Homo sapiens* (HsCDK1, HsCDK2, HsCDK3, HsCDK4, HsCDK5, HsCDK6, HsCDK7, HsCDK8, HsCDK9, HsCDK11A, HsCDK15, HsCDK16, HsCDK17, HsCDK18, HsCDK19, HsCDK20), *Rattus norvegicus* (RnCDK1, RnCDK2, RnCDK4, RnCDK5, RnCDK7, RnCDK9, RnCDK10, RnCDK11B, RnCDK14, RnCDK15, RnCDK16, RnCDK17, RnCDK18, RnCDK19, RnCDK20), *Mus musculus* (MmCDK1, MmCDK4, MmCDK5, MmCDK7, MmCDK8, MmCDK9, MmCDK10, MmCDK11B, MmCDK14, MmCDK15, MmCDK16, MmCDK17, MmCDK18, MmCDK19, MmCDK20), *Arabidopsis thaliana* (AtCDK1, AtCDK2, AtCDK12, AtCIPK7), *Felis catus* (FcCDK1, FcCDK2, FcCDK3, FcCDK4, FcCDK5, FcCDK6, FcCDK7, FcCDK8, FcCDK9, FcCDK10, FcCDK14, FcCDK15, FcCDK16, FcCDK17, FcCDK18, FcCDK19, FcCDK20) e *Canis familiaris* (CfCDK1, CfCDK2, CfCDK3, CfCDK4, CfCDK5, CfCDK6,

CfCDK7, CfCDK8, CfCDK9, CfCDK10, CfCDK11, CfCDK14, CfCDK15, CfCDK16, CfCDK17, CfCDK18, CfCDK19, CfCDK20).

5.4.3. GSK

A árvore filogenética da proteína GSK é composta por um número bem menor de táxons, tendo sido realizada a análise com apenas 26 sequências de 20 espécies diferentes, divididas entre mamíferos e protozoários. Na Figura 50 é apresentado a árvore da proteína GSK, assim como as proteínas anteriores, há uma clara definição entre os clados de tripanossomatídeos e mamíferos, indicando a menor similaridade entre eles, e apresentando grupamentos externos bem delineados. Todos os valores de bootstrap ficaram acima dos 60% indicando maior confiança nas divisões representadas.

Figura 50 - Árvore filogenética de sequências da proteína Glicogênio sintase cinase (GSK) de protozoários, planta e mamíferos.



Legenda: Em rosa representado as sequências de mamíferos, em lilás as sequências de *Arabidopsis*, em bege representa as sequências de levedura, em azul representado a sequência de *Plasmodium* e em verde representado as sequências da família de tripanossomatídeos. Descritos nas pontas dos ramos com a abreviação do nome da espécie, seguido do nome da proteína, com indicação do código de acesso. *Leishmania braziliensis* (LbrGSK), *Leishmania tarentolae* (LtaGSK), *L. mexicana* (LmxGSK), *Leishmania major* (LmaGSK), *Leishmania infantum* (LinGSK), *Leishmania panamensis* (LpaGSK), *Leishmania donovani* (LdoGSK), *Leishmania amazonensis* (LamGSK), *Trypanosoma cruzi* (TcGSK), *Trypanosoma theileri* (TtGSK), *Trypanosoma brucei* (TbGSK), *Trypanosoma vivax* (TvGSK), *Plasmodium falciparum* (PfGSK), *Saccharomyces cerevisiae* (ScGSK), *Homo sapiens* (HsGSK1, HsGSK2), *Rattus norvegicus* (RnGSK1, RnGSK2), *Mus musculus* (MmGSK1, MmGSK2), *Arabidopsis thaliana* (AtGSK9, AtCIPK7), *Felis catus* (FcGSK1, FcGSK2) e *Canis familiaris* (CfGSK1, CfGSK2).

5.4.4. MAPK

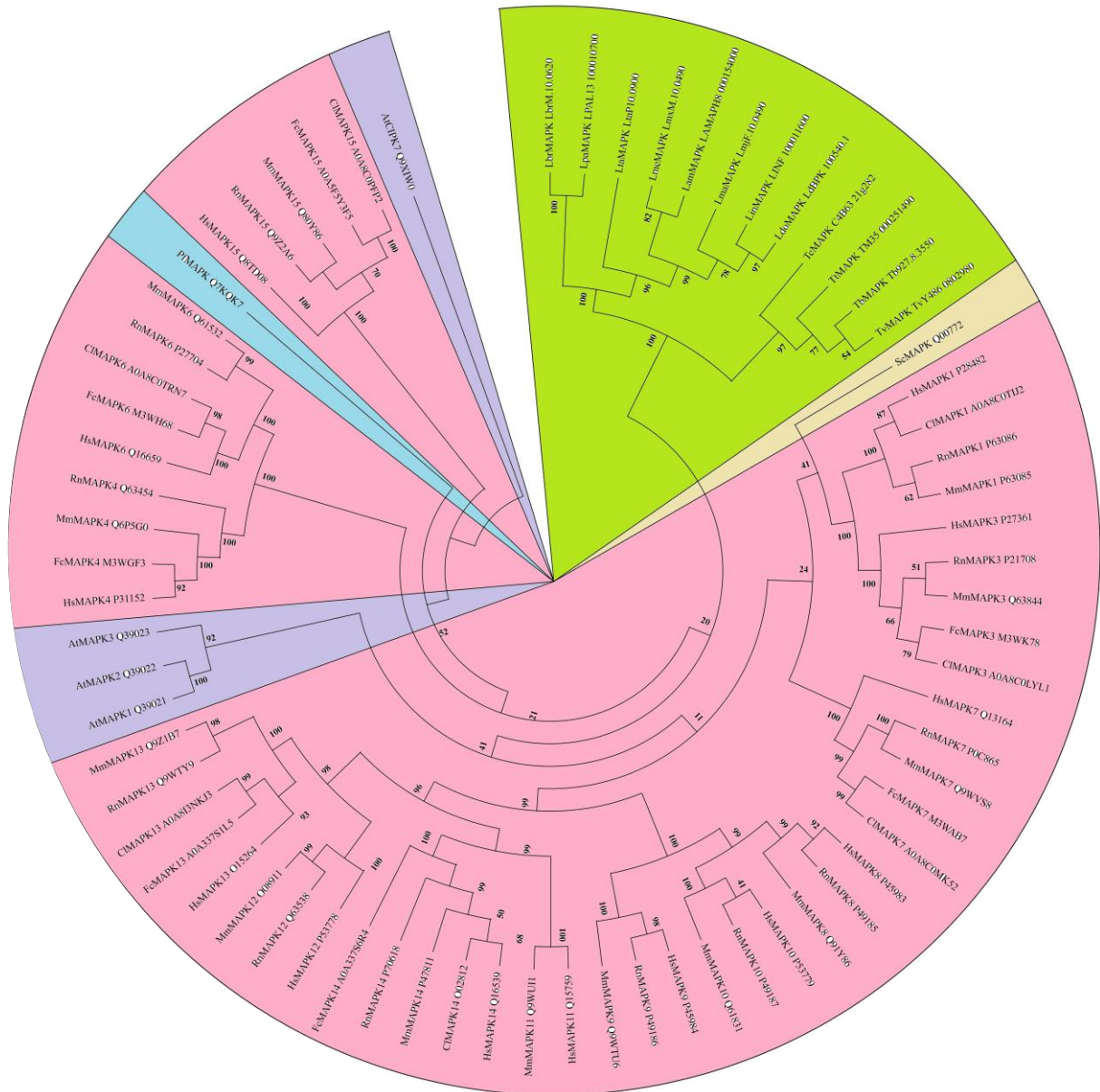
A árvore filogenética da MAPK, construída a partir de 70 sequências de proteínas, revela a separação entre os clados de mamíferos e tripanossomatídeos, com valores de *bootstrap* superiores a 70% em muitos nós internos, indicando alta confiança nessas divisões (Figura 51). Dentro de cada espécie, as diferentes isoformas da MAPK formam clados distintos, sugerindo uma alta conservação evolutiva e, possivelmente, funções especializadas.

A proximidade entre as MAPKs de *S. cerevisiae* e as MAPKs de mamíferos é intrigante e pode ser explicada por eventos de transferência horizontal de genes ou por convergência evolutiva devido a pressões seletivas semelhantes. Estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos que levaram a essa similaridade.

A alta conservação das isoformas da MAPK dentro de cada espécie sugere que essas proteínas desempenham funções essenciais e conservadas. A divergência entre as espécies pode estar relacionada à adaptação a diferentes ambientes e estilos de vida.

Em resumo, a análise filogenética da MAPK revela padrões de evolução complexos, com uma clara separação entre os eucariotos unicelulares e os mamíferos, e uma diversificação das isoformas dentro de cada espécie. Esses resultados contribuem para a compreensão da evolução e da função da MAPK em diferentes organismos.

Figura 51 - Árvore filogenética de seqüências da proteína MAPK de protozoários, planta e mamíferos.



Legenda: Em rosa representado as seqüências de mamíferos, em lilás as seqüências de *Arabidopsis*, em bege representa as seqüências de levedura, em azul representado a seqüência de *Plasmodium* e em verde representado as seqüências da família de tripanossomatídeos. Descritos nas pontas dos ramos com a abreviação do nome da espécie, seguido do nome da proteína, com indicação do código de acesso. *Leishmania braziliensis* (LbrMAPK), *Leishmania tarentolae* (LtaMAPK), *L. mexicana* (LmxMAPK), *Leishmania major* (LmaMAPK), *Leishmania infantum* (LinMAPK), *Leishmania panamensis* (LpaMAPK), *Leishmania donovani* (LdoMAPK), *Leishmania amazonensis* (LamMAPK), *Trypanosoma cruzi* (TcMAPK), *Trypanosoma theileri* (TiMAPK), *Trypanosoma brucei* (TbMAPK), *Trypanosoma vivax* (TvMAPK), *Plasmodium falciparum* (PfMAPK), *Saccharomyces cerevisiae* (ScMAPK), *Homo sapiens* (HsMAPK1, HsMAPK3, HsMAPK4, HsMAPK6, HsMAPK7, HsMAPK8, HsMAPK9, HsMAPK10, HsMAPK11, HsMAPK12, HsMAPK14, HsMAPK15), *Rattus norvegicus* (RnMAPK1, RnMAPK3, RnMAPK4, RnMAPK6, RnMAPK7, RnMAPK 8, RnMAPK9, RnMAPK10, RnMAPK12, RnMAPK13, RnMAPK14, RnMAPK15), *Mus musculus* (MmMAPK1, MmMAPK3, MmMAPK4, MmMAPK6, MmMAPK7, MmMAPK8, MmMAPK9, MmMAPK10, MmMAPK11, MmMAPK12, MmMAPK13, MmMAPK14, MmMAPK15), *Arabidopsis thaliana* (AtMAPK1, AtMAPK2 AtMAPK3, AtCIPK7), *Felis catus* (FcMAPK3, FcMAPK4, FcMAPK6, FcMAPK7, FcMAPK13, FcMAPK14, FcMAPK15) e *Canis familiaris* (CfMAPK1, CfMAPK3, CfMAPK6, CfMAPK7, CfMAPK13, CfMAPK14, CfMAPK15).

Legenda: Em rosa representado as sequências de mamíferos, em lilás as sequências de *Arabidopsis*, em bege representa as sequências de levedura, em azul representado a sequência de *Plasmodium* e em verde representado as sequências da família de tripanossomatídeos. Descritos nas pontas dos ramos com a abreviação do nome da espécie, seguido do nome da proteína, com indicação do código de acesso. *Leishmania braziliensis* (LbrPKA), *Leishmania tarentolae* (LtaPKA), *L. mexicana* (LmxPKA), *Leishmania major* (LmaPKA), *Leishmania infantum* (LinPKA), *Leishmania panamensis* (LpaPKA), *Leishmania donovani* (LdoPKA), *Leishmania amazonensis* (LamPKA), *Trypanosoma cruzi* (TcPKA), *Trypanosoma theileri* (TtPKA), *Trypanosoma brucei* (TbPKA), *Trypanosoma vivax* (TvPKA), *Plasmodium falciparum* (PfPKA), *Saccharomyces cerevisiae* (ScPKA1, ScPKA2, ScPKA3), *Homo sapiens* (HsPRKACA, HsPRKACB, HsPRKACG), *Rattus norvegicus* (RnPRKACA, RnPRKACB), *Mus musculus* (MmPRKACA, MmPRKACB), *Arabidopsis thaliana* (AtPKA1, AtPKA2, AtCIPK7), *Felis catus* (FcPRKACA, FcPRKACB) e *Canis familiaris* (CfPRKACA, CfPRKACB).

5.4.6. SRPK

Para a construção da árvore filogenética da proteína SRPK foram utilizadas 31 sequências de proteínas de 20 espécies diferentes, divididas entre mamíferos, protozoários e planta. Como podemos observar na Figura 53, os clados dos mamíferos e dos protozoários ficaram bem separados indicando que a árvore foi construída corretamente e indicando menor similaridade entre as sequências, apresentando nos nós valores de *bootstrap* acima de 70% indicando maior confiança na divisão representada. Todas as espécies de *Leishmania* analisadas foram inseridas em um mesmo clado, mais próximas filogeneticamente das espécies de *Trypanosoma* do que em comparação com as sequências de proteína dos mamíferos. A árvore filogenética criada ficou semelhante à realizada por PIMENTEL et al., (2023), com diferenças apenas na não inserção de algumas espécies na análise do presente estudo, que constavam no estudo de referência.

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o presente estudo descobriu compostos promissores, que poderão prosseguir para demais análises como possíveis fármacos, visto a reduzida toxicidade apresentada nas condições testadas. Os valores de CC_{50} encontrados em todos os compostos testados foram acima de 200 μM mostrando o potencial dos mesmos para outros estudos. Sendo todos os analisados melhores que o precursor carvacrol, devida à alta toxicidade com $CC_{50} = 62,49 \mu\text{g/mL}$ (416 μM), enquanto os compostos A6 e A8, que foram testados quanto a concentrações superiores, apresentaram $CC_{50} > 1000 \mu\text{M}$,

Os compostos A6 e A8 apresentaram atividade antileishmania importante contra *L. braziliensis*, com valores de IC_{50} muito inferiores aos encontrados na literatura com a utilização do Carvacrol e derivados e com índice de seletividade superior aos encontrados em estudos com Anfotericina B (fármaco de referência). E que foram consideravelmente superiores ao seu precursor ácido carvacroxiacético (AC) que não apresentou nenhuma atividade antileishmania, tanto contra *L. braziliensis*, quanto contra *L. amazonensis*.

A análise de *docking* comparou diferentes proteínas utilizando distintas funções de pontuação, o que impede uma comparação direta entre todas as proteínas. No entanto, comparações entre proteínas que usaram a mesma função de pontuação são válidas. A função ASP foi utilizada para LbCKI, LbMAPK e LbSRPK, com SRPK apresentando o maior *score*, especialmente na interação com o ligante A8. A função *GoldScore*, aplicada em LbCRK3 e LbPKA, destacou LbCRK3 com a melhor interação também com o composto A8. De forma geral, o composto A8 mostrou maior afinidade com todas as proteínas testadas, exceto LbPKA e LbGSK que apresentaram melhor *score* na interação com o composto A6. De todas as proteínas testadas nenhuma apresentou maior afinidade com o precursor carvacrol, o que poderia apresentar uma maior possibilidade de relevância dessas proteínas na sobrevivência do parasito. Visto que os compostos que apresentaram atividade antileishmania possuíram maior afinidade no *docking* do que em comparação com o precursor que foi atóxico para os parasitos nas concentrações testadas *in vitro*.

As árvores filogenéticas de diversas proteínas (CKI, CRK3, GSK, MAPK, PKA e SRPK) foram construídas utilizando sequências de proteínas de 20 espécies diferentes, incluindo mamíferos, protozoários, plantas e leveduras. Em geral, os clados de tripanossomatídeos e mamíferos ficaram bem separados, indicando menor similaridade entre as sequências. Os valores de *bootstrap*, em sua maioria acima de 70%, garantem maior confiança nas divisões representadas.

Especificamente, espécies do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma* se agruparam corretamente, mostrando proximidade evolutiva, enquanto outros organismos, como *S. cerevisiae* e *A. thaliana*, apresentaram proximidade com mamíferos em algumas árvores filogenéticas, o que está de acordo com estudos anteriores. As proteínas analisadas mostraram graus variados de similaridade entre espécies. A estrutura das árvores filogenéticas sugere uma clara distinção evolutiva entre os diferentes grupos de organismos analisados.

A análise filogenética das seis proteínas demonstra um claro distanciamento evolutivo entre as sequências de *Leishmania* e mamíferos. Essa divergência representa uma oportunidade única para o desenvolvimento de fármacos altamente específicos. Ao direcionar compostos para as proteínas exclusivas ou significativamente diferentes do parasito, é possível criar terapias mais eficazes contra leishmaniose, com menor probabilidade de causar efeitos adversos nos hospedeiros humanos.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Devido aos resultados apresentados quanto a citotoxicidade, potencial antileishmania, e predição de possíveis interações com proteínas cinase, estima-se realizar estudos posteriores de análise do padrão de expressão por meio da técnica de RT-qPCR para verificar se os compostos poderiam afetar a expressão do mRNA das proteínas estudadas.

O encapsulamento dos compostos ou a utilização de surfactantes, como lipopeptídeos, poderá facilitar a entrega das moléculas, ampliando o potencial antileishmania.

A Confirmação da interação dos compostos A6 e A8 com as proteínas-alvo poderá ser feita através do ensaio de *thermal shift*, onde poderá ser verificado a interação direta dos compostos com as proteínas.

Como o índice de seletividade foi alto, seria válido a análise do potencial antileishmania para outras espécies de *Leishmania*, além de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*.

8. REFERÊNCIAS

AIEBCHUN, T. et al. In Vitro and In Silico Studies of Kinase Inhibitor of MAPK3 Protein to Determine Leishmania martiniquensis Treatment. **Acta Parasitologica**, v. 68, n. 1, p. 240–248, 2023.

ALLOCCO, J. J. et al. Inhibitors of casein kinase 1 block the growth of Leishmania major promastigotes in vitro. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 12, 2006.

ARMAS, J. R.; AGÜERO, O. P.; PACHECO, M. P. Chemical composition and anti-Trypanosoma cruzi effect of Thymus vulgaris L. (thyme) essential oil and its main component, thymol, in mice. **American Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 21–27, 2015.

ARONSON, N. et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 96, n. 1, p. 24–45, 11 jan. 2017.

ASHUTOSH et al. Downregulation of mitogen-activated protein kinase 1 of Leishmania donovani field isolates is associated with antimony resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, 2012.

BAKER, N. et al. Systematic functional analysis of Leishmania protein kinases identifies regulators of differentiation or survival. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021.

BARRAL, A.; COSTA, J. M. L. **Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas**. 1ª ed. Salvador - BA: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 2011.

BATES, P. A. Revising Leishmania's life cycle. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 529–530, 24 abr. 2018.

BITENCOURT-FERREIRA, G.; VEIT-ACOSTA, M.; DE AZEVEDO, W. F. Hydrogen Bonds in Protein-Ligand Complexes. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. v. 2053p. 93–107.

BRUNI, N. et al. Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: a critical review. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 5289–5311, 26 jul. 2017.

BULUSU, G.; DESIRAJU, G. R. Strong and Weak Hydrogen Bonds in Protein-Ligand Recognition. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 100, n. 1, p. 31–41, 2020.

CARDONA-ARIAS, J. A. et al. Cost-effectiveness analysis of thermotherapy versus pentavalent antimonials for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of evidence-based medicine**, v. 10, n. 2, p. 81–90, maio 2017.

CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, 2022.

CHEN, Y. et al. Role of carvacrol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways. **European Journal of Pharmacology**, v. 796, n. December 2016, p. 90–100, 2017.

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

COSTA, A. M. B. et al. Thermosensitive system formed by poloxamers containing carvacrol: An effective carrier system against Leishmania amazonensis. **Acta Tropica**, v. 237, p. 106744, 1 jan. 2023.

COURTENAY, O. et al. Combining epidemiology with basic biology of sand flies, parasites, and hosts to inform leishmaniasis transmission dynamics and control. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 10, p. e1006571, 19 out. 2017.

DAN-GOOR, M. et al. Identification of a secreted casein kinase 1 in Leishmania donovani: Effect of protein over expression on parasite growth and virulence. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

DIXIT, A. et al. PfSRPK1, a Novel Splicing-related Kinase from Plasmodium falciparum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 49, p. 38315–38323, dez. 2010.

DU, X. et al. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 144, 26 jan. 2016.

E BASTOS, M. S. et al. Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp leishmania Braziliensis and its application as an alternative method for drug screening in vitro. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 2, p. 155–159, 2017.

EFRON, B.; HALLORAN, E.; HOLMES, S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 23, 1996.

ERDMANN, M. et al. Interacting protein kinases involved in the regulation of flagellar length. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 4, 2006.

ESHAR, S. et al. A novel Plasmodium falciparum SR protein is an alternative splicing

factor required for the parasites' proliferation in human erythrocytes. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 19, p. 9903–9916, out. 2012.

GALVÃO, J. G. et al. Carvacrol loaded nanostructured lipid carriers as a promising parenteral formulation for leishmaniasis treatment. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 150, n. March, 2020.

GRANT, K. M. et al. The *crk3* gene of *Leishmania mexicana* encodes a stage-regulated *cdc2*- related histone H1 kinase that associates with p12(*cks1*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 17, p. 10153–10159, 1998.

GRANT, K. M. et al. Inhibitors of *Leishmania mexicana* CRK3 cyclin-dependent kinase: Chemical library screen and antileishmanial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3033–3042, 2004.

HASSAN, P. et al. The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 189–198, 2001.

HEVENER, K. E. et al. Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 2, 2009.

HOMBACH, A. et al. A small heat shock protein is essential for thermotolerance and intracellular survival of *Leishmania donovani*. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 21, 2014.

HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. Ligand efficiency: A useful metric for lead selection. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 10, p. 430–431, 2004.

HUMMEL, J. R. et al. Discovery of (4-Pyrazolyl)-2-aminopyrimidines as Potent and Selective Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinase 2. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, n. 4, 2024.

KAUR, P. et al. MAPK1 of *Leishmania donovani* interacts and phosphorylates HSP70 and HSP90 subunits of foldosome complex. **Scientific Reports 2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 31 ago. 2017.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, 1 nov. 2004.

KRIEGER, E. et al. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 77, n. S9, p. 114–122, 22 jan. 2009.

KRÖBER-BONCARDO, C. et al. Casein kinase 1.2 over expression restores stress

resistance to *Leishmania donovani* HSP23 null mutants. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

KUHN, D.; WIESE, M. LmxPK4, a mitogen-activated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 5, 2005.

KUMAR, C. C.; MADISON, V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. **Oncogene**, v. 24, n. 50, p. 7493–7501, 14 nov. 2005.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, 1993.

LAVOGINA, D. et al. Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon. **Biosensors**, v. 12, n. 4, 2022.

LIEBESCHUETZ, J. W.; COLE, J. C.; KORB, O. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 6, p. 737–748, 28 jun. 2012.

LOSET, J. R. et al. Drug Screening for Kinetoplastid Diseases. **DNDi and Pan-Asian Screening Network**, n. April, p. DNDi, 2009.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, n. 6364, 1992.

MACDONALD, C. A.; BOYD, R. J. Computational insights into the suicide inhibition of *Plasmodium falciparum* Fk506-binding protein 35. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 16, 2015.

MAÇZKA, W. et al. Carvacrol—A Natural Phenolic Compound with Antimicrobial Properties. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 824, 27 abr. 2023.

MANNING, G. et al. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1912–1934, 6 dez. 2002.

MARCONDES, C. B. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. **Entomological News**, v. 118, n. 4, 2007.

MARQUARDT, W. C. et al. **Biology of Disease Vectors**. 2nd. ed. [s.l.] Elsevier, 2004.

MEIJER, L.; FLAJOLET, M.; GREENGARD, P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 9, p. 471–480, 2004.

MEJÍA, A. F. D. et al. AKT-like kinase promotes cell survival during nutritional stress in trypanosomatids. **bioRxiv**, p. 2020.07.25.218644, 15 out. 2020.

MIRDITA, M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature Methods**, v. 19, n. 6, p. 679–682, 30 jun. 2022.

MORSELLI, M. B. et al. Effects of thymol supplementation on performance, mortality and branchial energetic metabolism in grass carp experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, v. 139, p. 103915, 1 fev. 2020.

NAGOOR MEERAN, M. F. et al. Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 380, 2017.

NAULA, C.; PARSONS, M.; MOTTRAM, J. C. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1754, n. 1–2, p. 151–159, dez. 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6^a ed. Porto Alegre: ARTMED Editora LTDA, 2014.

OCHOA, R. et al. Search of Allosteric Inhibitors and Associated Proteins of an AKT-like Kinase from *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3951, 8 dez. 2018.

OJO, K. K. et al. Glycogen Synthase Kinase 3 Is a Potential Drug Target for African Trypanosomiasis Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3710–3717, out. 2008.

OKIYAMA, Y. et al. **Quantum Mechanics in Drug Discovery**. New York, NY: Springer US, 2020. v. 2114

PAHO. **Guideline for the Treatment of Leishmaniasis in the Americas. Second Edition**. [s.l.] Pan American Health Organization, 2022.

PANIGRAHI, S. K. Strong and weak hydrogen bonds in protein-ligand complexes of kinases: A comparative study. **Amino Acids**, v. 34, n. 4, 2008.

PARSONS, M. et al. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v. 6, n. 1, p. 127, 15 dez. 2005.

PIMENTEL, D. C. et al. **First evidence of a serine arginine protein kinase (SRPK) in leishmania braziliensis and its potential as therapeutic target** *Acta Tropica*, 2023.

PINK, R. et al. Opportunities and Challenges in Antiparasitic Drug Discovery. **Nature Reviews Drug Discovery** 2005 4:9, v. 4, n. 9, p. 727–740, set. 2005.

POLYCHRONOPOULOS, P. et al. Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases.

Journal of medicinal chemistry, v. 47, n. 4, p. 935–46, 12 fev. 2004.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2017.

PORTAL, D. et al. Trypanosoma cruzi TcSRPK, the first protozoan member of the SRPK family, is biochemically and functionally conserved with metazoan SR protein-specific kinases. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 9–21, mar. 2003.

RACHIDI, N. et al. Pharmacological assessment defines Leishmania donovani casein kinase 1 as a drug target and reveals important functions in parasite viability and intracellular infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1501–1515, mar. 2014.

SAMPAIO, L. A. et al. Antitumor Effects of Carvacrol and Thymol: A Systematic Review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 702487, 7 jul. 2021.

SCRUTTON, N. S.; RAINE, A. R. C. Cation- π bonding and amino-aromatic interactions in the biomolecular recognition of substituted ammonium ligands. **Biochemical Journal**, v. 319, n. 1, p. 1–8, 1996.

STAMBOLIC, V.; WOODGETT, J. R. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 β in intact cells via serine 9 phosphorylation. **Biochemical Journal**, v. 303, n. 3, p. 701–704, 1994.

TIRADO-DUARTE, D. et al. The Akt-like kinase of Leishmania panamensis: As a new molecular target for drug discovery. **Acta tropica**, v. 177, p. 171–178, jan. 2018.

TOYOTA, A. et al. Novel protein kinase cAMP-Activated Catalytic Subunit Alpha (PRKACA) inhibitor shows anti-tumor activity in a fibrolamellar hepatocellular carcinoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 621, 2022.

TSIGANKOV, P. et al. Phosphoproteomic analysis of differentiating Leishmania parasites reveals a unique stage-specific phosphorylation motif. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 7, 2013.

TU, X.; WANG, C. C. Pairwise knockdowns of cdc2-related kinases (CRKs) in Trypanosoma brucei identified the CRKs for G1/S and G2/M transitions and demonstrated distinctive cytokinetic regulations between two developmental stages of the organism. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 4, p. 755–764, 2005.

WHO; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniose**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 11 out. 2023.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, 2007.

XINGI, E. et al. 6-Br-5methylindirubin-3'oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: Exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1289–1303, 2009.

ZIELIŃSKA-BŁAJET, M.; PIETRUSIAK, P.; FEDER-KUBIS, J. Selected Monocyclic Monoterpenes and Their Derivatives as Effective Anticancer Therapeutic Agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, 2021.

9. Apêndice A – Alinhamento das sequências de proteína com representação das regiões truncadas

```

LbCKI      MNVELRVGNRYRIGQKIGSGSFGEIFRGTNIQTGDPVAIKLEQVKTRHPQLTYESRFYRI 60
3UZP      ----LRVGNRYRLGRKIGSGSFGDIYLGTDIAAGEEVAIKLECVKTKHPQLHIESKIYKM 56
          *****:*:*****:*: **:* :*: ***** **:*:** *::*::

LbCKI      LGSGGGAVGIPMMFYHGVEGEFNVMMVIELLGPSLEDLFSFCGRRRLSLKTTMLADQMISR 120
3UZP      MQ---GGVGIP TIRWCGAEGDYNVMVMELLGPSLEDLNFNFC SRKFS LKT VLLLADQMISR 113
          :   *.**** : : *.**:*:****:*****.**,.*:****.*:*****

LbCKI      IEFVHSKSVLHRDIKPDNFLMGTGKKGGHHVYIIDFGLAKKYRDPRTAHIPYKEGKSLTG 180
3UZP      IEYIHSKNFIHRDVKPDNFMGLGKKGNLVYIIDFGLAKKYRDARTHQHIPYRENKNLTG 173
          **:***.:**:*:***** ****: ***** ** *:**:*.*,**

LbCKI      TARYCSINTHMGVEQGRDDMEGIGYILMYFLRGS LPWQGLKAHTKQEKNRISERKQTT 240
3UZP      TARYASINTHLGIEQSRRDDLESLGYVLMYFNLGSLPWQGLKAATKRQKYERISEKKMST 233
          ****.*****:*:*.****:*:***:**** ***** **:*:**:****:* :*

LbCKI      PVELLCKGFPSEFAAYMNYVRALRFEDKPDYSYLKRMFRDLFVREGYHVDYVFDWTLKRI 300
3UZP      PIEVLCKGYPSEFATYLNFCRSLRFDDKPDYSYLRQLFRNLFHRQGFSDYVFDWNMLK- 292
          *:*:****:*****:*:*: *:***:*****:~::~**:* *:*: *****.: :

LbCKI      HESLQEQQSFPGGSNNGGAAGNGSPMNQSPAPGGNGGAPNNVNNNQLGAPEQQ 354
3UZP      ----- 292

```

Figura 54 - Alinhamento no ClustalOmega das sequências da LbCKI (LbrM.34.1000) com a HsCKI (3UZP). A marcação em vermelho refere-se a região truncada da LbCKI

LbCRK3	MSSFGRVTTTRGGDSGTRDSL	DRYNRLDVLGEGTYGVVYRAVDKITGQYVALKKVRLDRTE	60
8UV0	-----	ENFQKVEKIGEGTYGVVYKARNKLTGEVVALKKIRLDTET	40
		:.:.:.:.: :*****:* :*:*: *****:***	
LbCRK3	EGIPQ TALREVSILQEFDHPNIVNLLDVICSDGKLYLVFEYVEADLKKALEKQE-GGYSG	119	
8UV0	EGVPSTAI REISLLKELNHPNIVKLLDVIHTENKLYLVFEFLHQDLKKFMDASALTGIPL	100	
		***.*.*:*	
LbCRK3	MDLKRLIYQLLDGLYFCHRHRIIHRDLK PANILLTSANILKLADFLARAFQVPMHTYTH	179	
8UV0	PLIKSYLFQLLQGLAFCHSHRVLHRDLKPNLLINTEGAIKLADFLARAFGVPVRYTH	160	
		:* :*:*:*:* *	
LbCRK3	EVVTLWYRAPEILLGEKHYP AVDIWSVGCIFAELARRKVLFRGDSEIGQLFEIFQVLGT	239	
8UV0	EVVTLWYRAPEILLGCKYSTAVDIWSLGCIFAEMVTRRALFPGDSEIDQLFRIFRTLGT	220	
		*****:*	
LbCRK3	PADAEGSWPGVSRLPDYRDVFPKWTAKRLGQVLP ELHQDAIDLLSKMLKYDPRERISAKE	299	
8UV0	PDE--V VWPVTSMPDYKPSFPKWARQDFSKVVPPLDEDGRSLLSQMLHYDPNKRISAKA	278	
		* : * * * * * : * * * * * : * * * * * : : : * * * * * * . * . * . * * * * * : * * * * * : * * * * *	
LbCRK3	ALQHPWFSDLRW----- 311		
8UV0	ALAHPPFQDVTKPVPHRL 297		
		** *:*:*.*:	

Figura 55 - Alinhamento no ClustalOmega das sequências da LbCRK3 (LbrM.35.0660) com a HsCRK3 (8UV0). A marcação em vermelho refere-se a região truncada da LbCRK3

LbMAPK	-----MHKSNQELSVPKIVGDFKVVSVSGSPFEVPAKYTLKILGMGAYGI	46
402Z	MHHHHHSSGRENLYFQGNQELSVPKIVGDFKVVSVSGSPFEVPSKYTLKILGMGAYGI	60
	.:*****.*****:*****	
LbMAPK	ACSCLDGDTGEKVSIIKCRDVF RDVEDGKRVLREIDMMRFFHHENLLNVVNILPPLKREY	106
402Z	ACSCLDGDTGEKVSIIKCRDVF RDVEDGKRVLREIDMMRFFHHENLLNVVNILPPLKREY	120

LbMAPK	NGFEDVYVVTPLMDVDMNVVLSRQVLEESHMQYFVYQILRGLKYLHSANVAHRDLKPAN	166
402Z	HSFEDVYVVTPLMDVDMNVVLSRQVLEESHMQYFVYQILRGLKYLHSANVAHRDLKPAN	180
	:*****	
LbMAPK	LVTNISCELKIIDFGLSRSVDVPYSELTDYVITRWYRPPELLLENTNYSTAVDIWSVCGI	226
402Z	LVTNISCELKIIDFGLSRSVDVPYSELTDYVITRWYRPPELLLENTNYSTAVDIWSVCGI	240

LbMAPK	FAEMYNRKPVFPGRNTMDQLRMIAQHIGKPPASIVEHREALEKLSLPDGSLSIPKLVPG	286
402Z	FAEMYNRKPVFPGRNTMDQLRMIAQHIGKPPASIVEHREALEKLNELPDGSLNIPKLVPG	300
	*****.*****.*****	
LbMAPK	LAGSAEGMDFLAKMWTLDPNKRPTAADMLAHPYLAHLHDEEDEPVCAPFLWSHESTPMG	346
402Z	LAGNTEGIDFLSKMWTLDPSKRPTAADMLAHPYLAHLHDEEDEPTCPCPFLWAHESTPMG	360
	.:**:*:*:**.*****.***.*****:*****	
LbMAPK	VPELRRAFWDDIVDYNFSLPPAMPPVTAVGGGNSKNGSAHHH	388
402Z	VSELRRAFWADIVDYNF-----	377
	* ***** *	

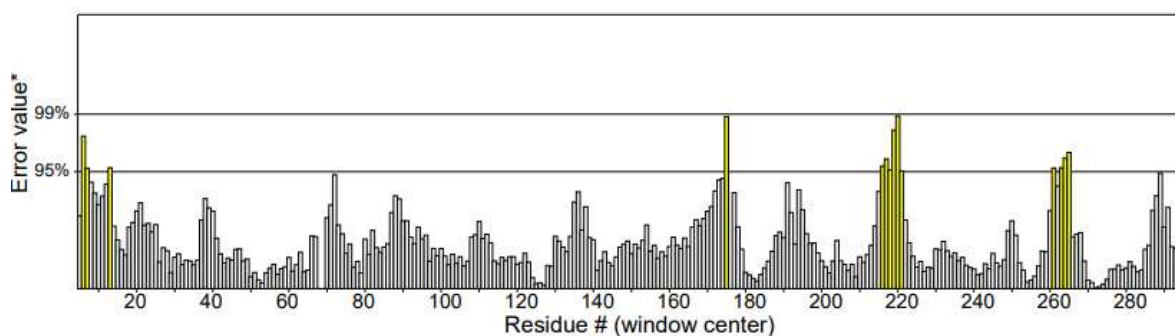
Figura 56 - Alinhamento no ClustalOmega das seqüências da LbMAPK (LbrM.10.0620) com a LdMAPK (402Z). A marcação em vermelho refere-se a região truncada da LbMAPK

10. Apêndice B – Validação da estrutura tridimensional das proteínas

10.1. CKI

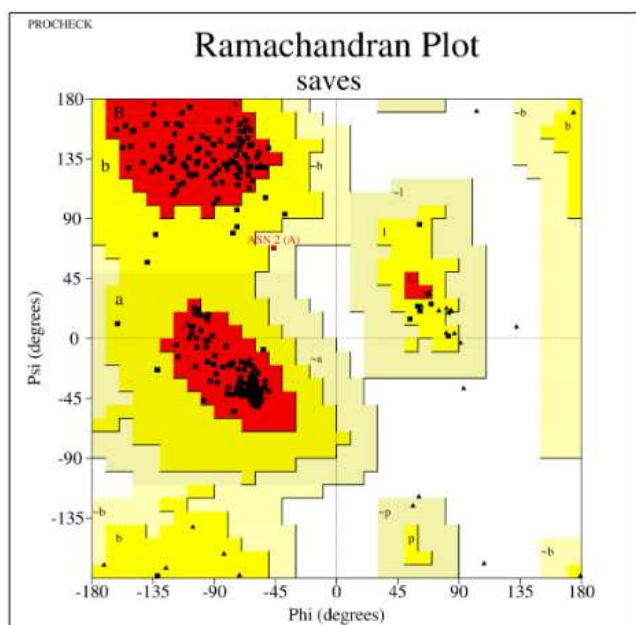
ERRAT

Program: ERRAT2
 File: CKI.pdb
 Chain#:A
 Overall quality factor**: 95.139



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.
 **Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

PROCHECK



Plot statistics

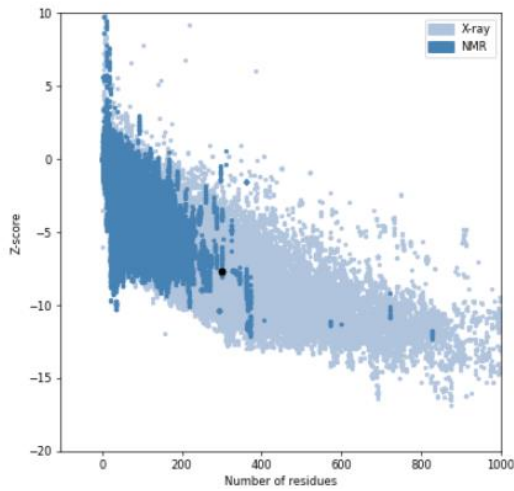
Residues in most favoured regions [A,B,L]	237	92.6%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	18	7.0%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	1	0.4%
Residues in disallowed regions	0	0.0%
Number of non-glycine and non-proline residues	256	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	30	
Number of proline residues	11	
Total number of residues	299	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

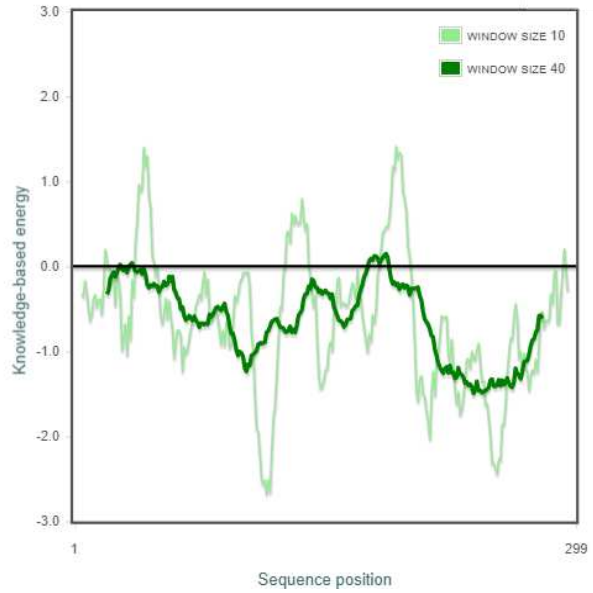
PROSA-web

Overall model quality

Z-Score: **-7.71**



Local model quality



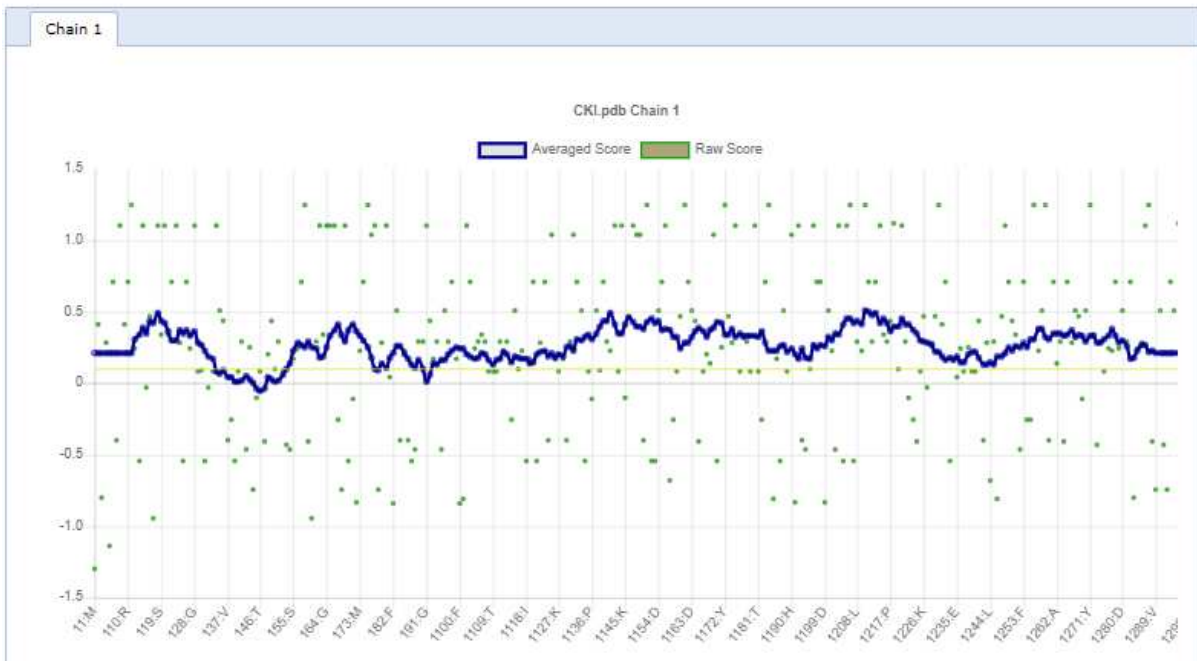
Verify3D

VERIFY3D

92.64% of the residues have averaged 3D-1D score ≥ 0.1

Pass

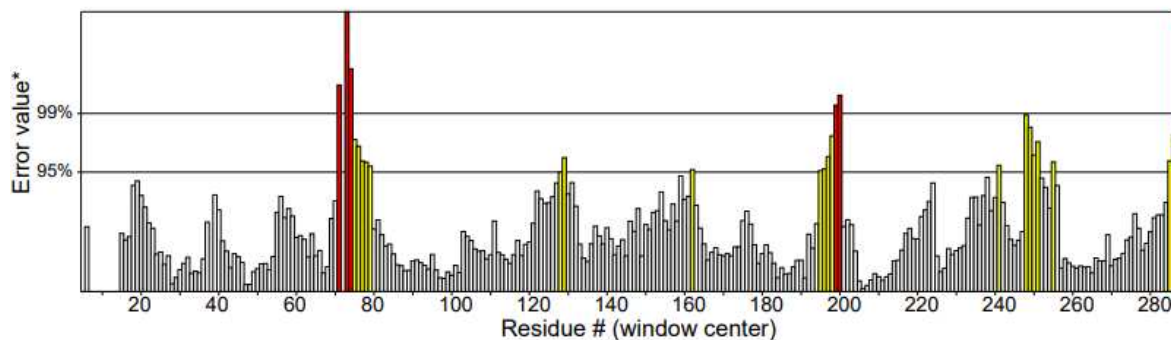
At least 80% of the amino acids have scored ≥ 0.1 in the 3D/1D profile.



10.2. CRK3

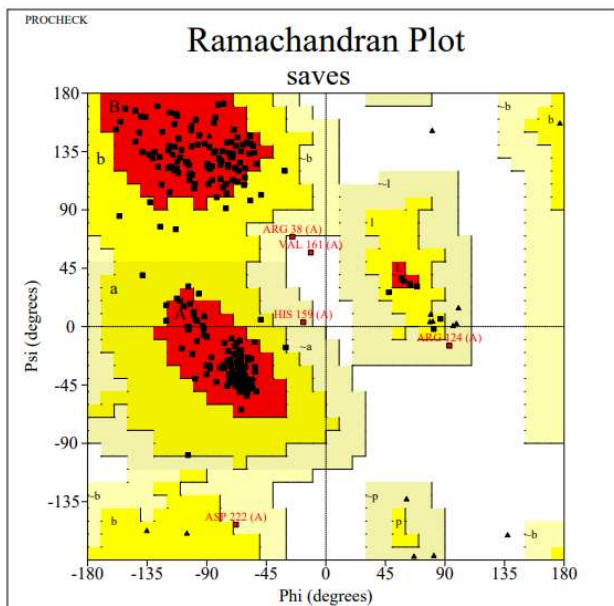
ERRAT

Program: ERRAT2
 File: CRK3.pdb
 Chain#:A
 Overall quality factor**: 90.441



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

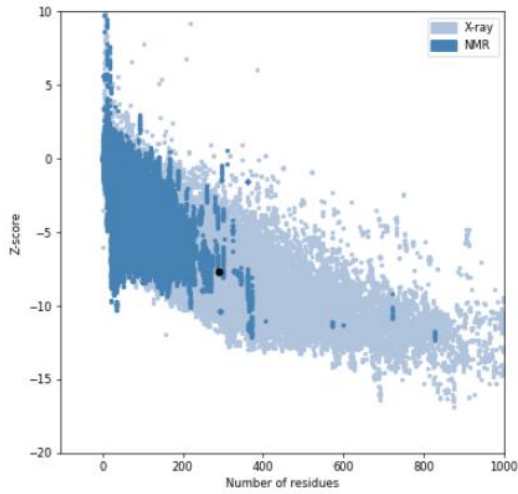
**Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

PROCHECK

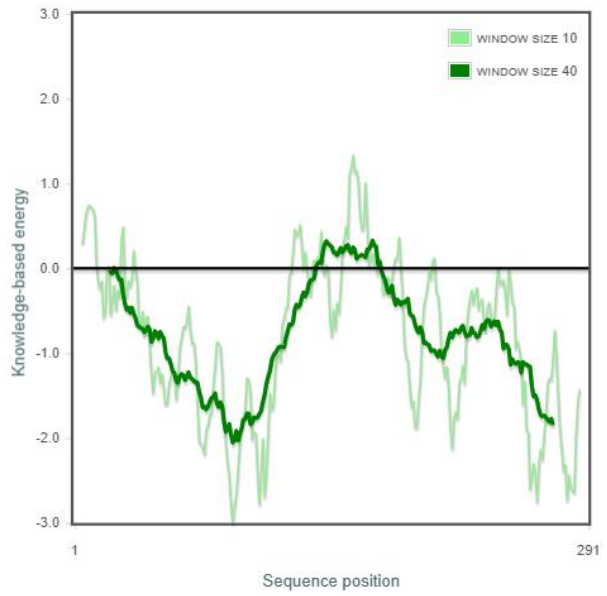
PROSA-web

Overall model quality

Z-Score: **-7.65**



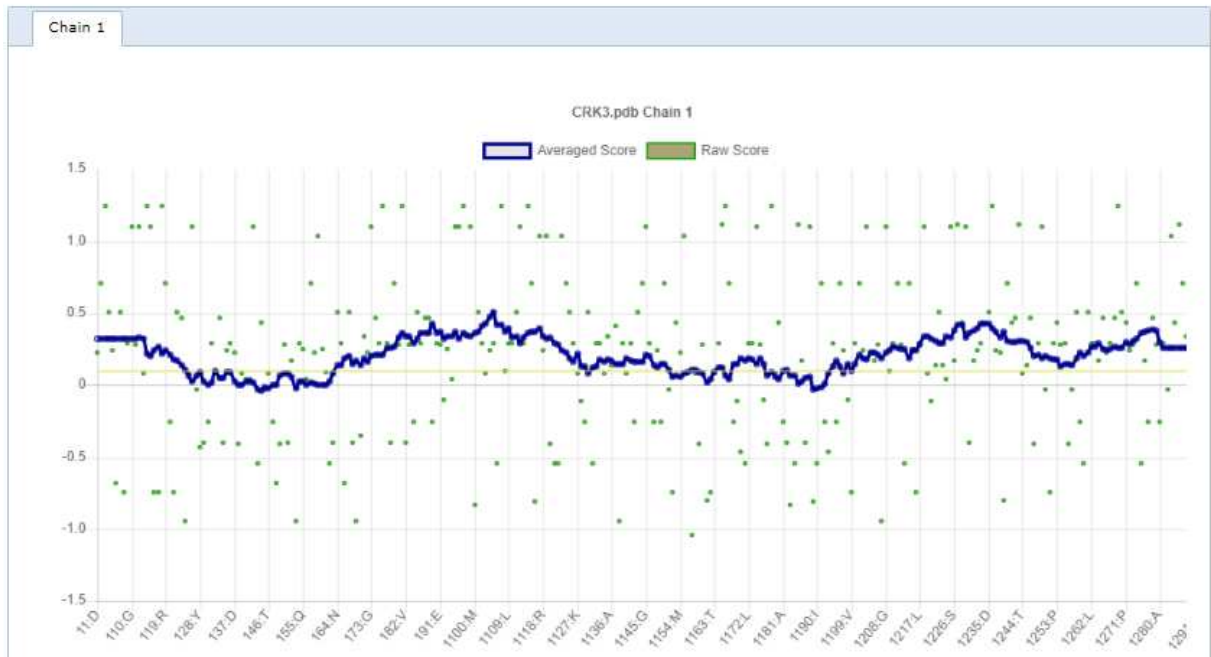
Local model quality



Verify3D

VERIFY3D
76.98% of the residues have averaged 3D-1D score >= 0.1
Fail

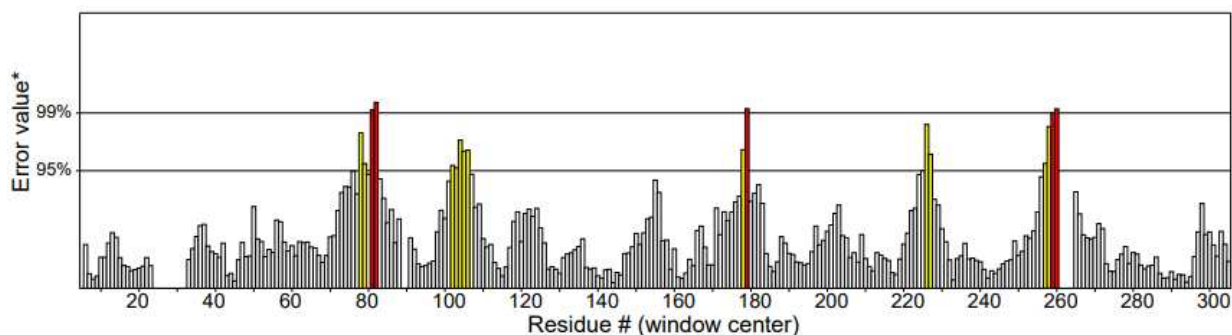
Fewer than 80% of the amino acids have scored >= 0.1 in the 3D/1D profile.



10.3. LbGSK

ERRAT

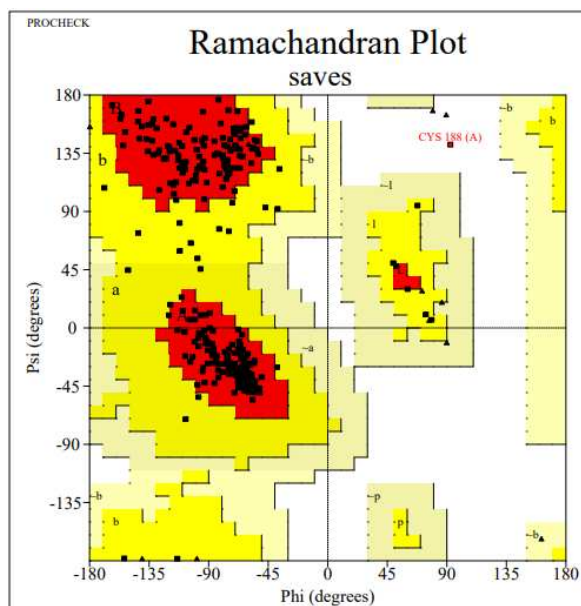
Program: ERRAT2
 File: GSK Lbr.pdb
 Chain#:A
 Overall quality factor**: 94.864



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

PROCHECK



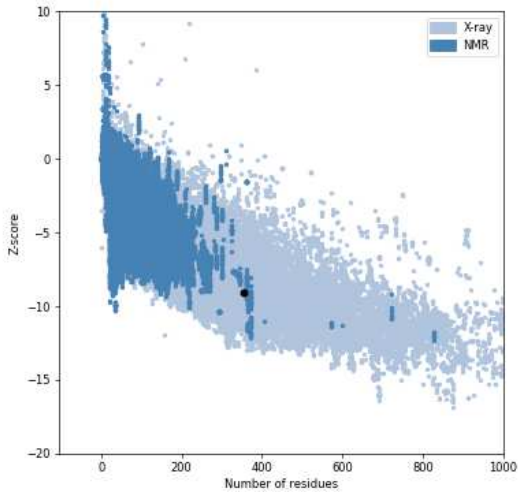
Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	287	91.7%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	25	8.0%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	1	0.3%
Number of non-glycine and non-proline residues	313	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	18	
Number of proline residues	22	
Total number of residues	355	

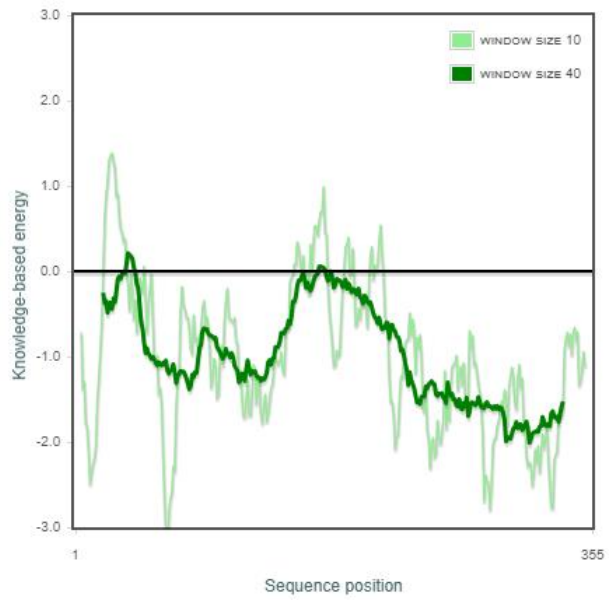
PROSA-web

Overall model quality

Z-Score: **-9.09**



Local model quality



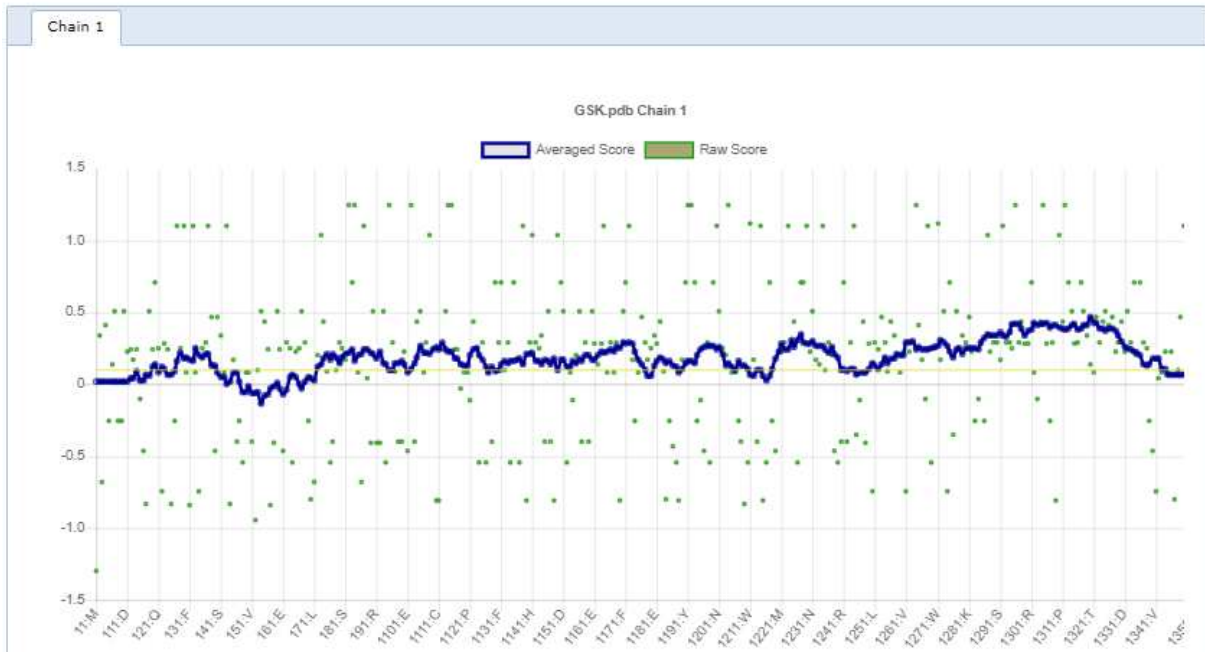
Verify3D

VERIFY3D

77.18% of the residues have averaged 3D-1D score ≥ 0.1

Fail

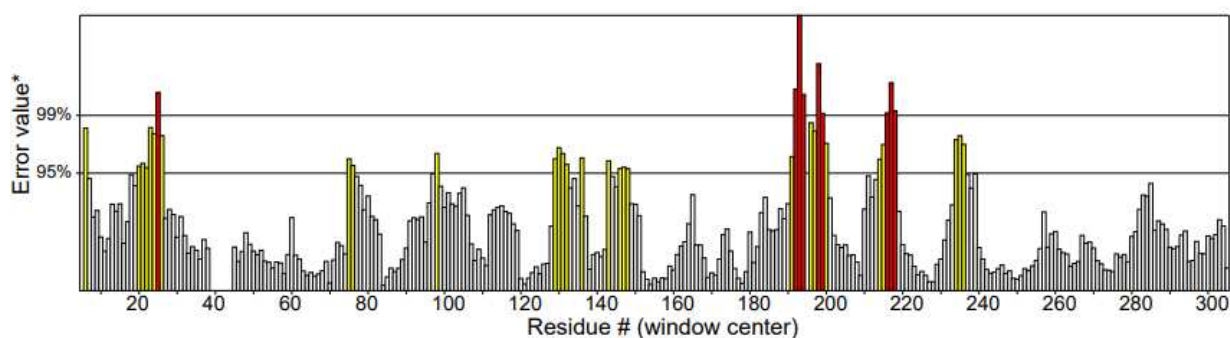
Fewer than 80% of the amino acids have scored ≥ 0.1 in the 3D/1D profile.



10.4. MAPK

ERRAT

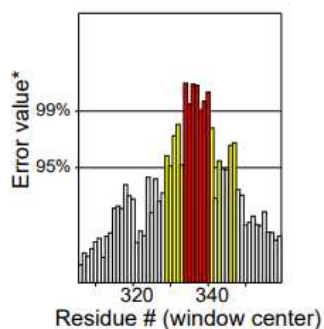
Program: ERRAT2
 File: MAPK.pdb
 Chain#:A
 Overall quality factor**: 84.726



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

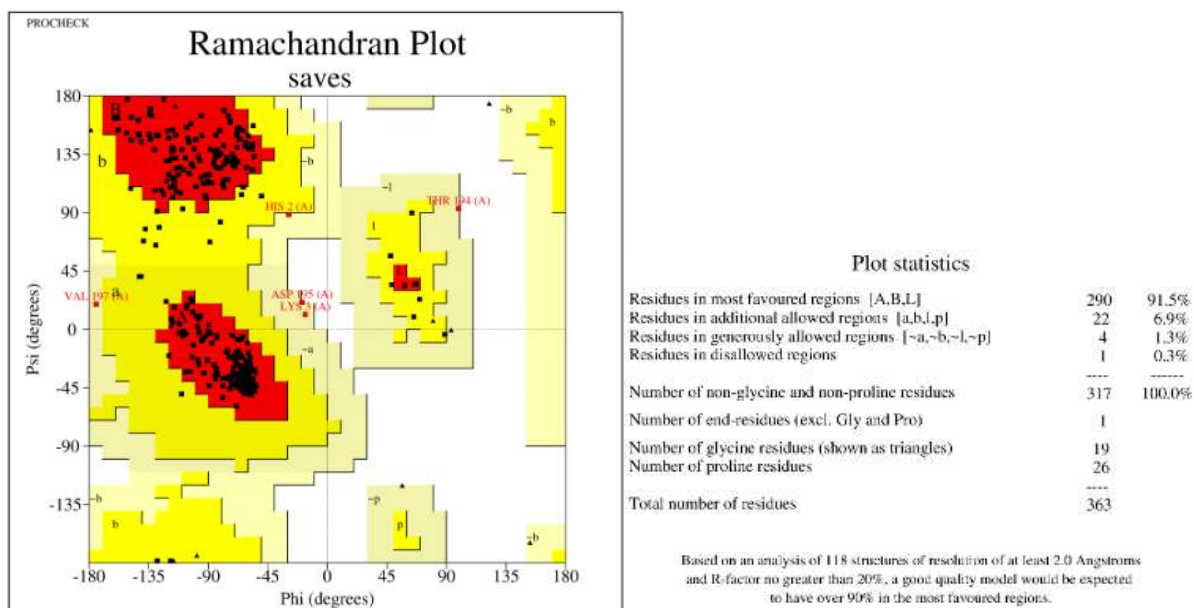
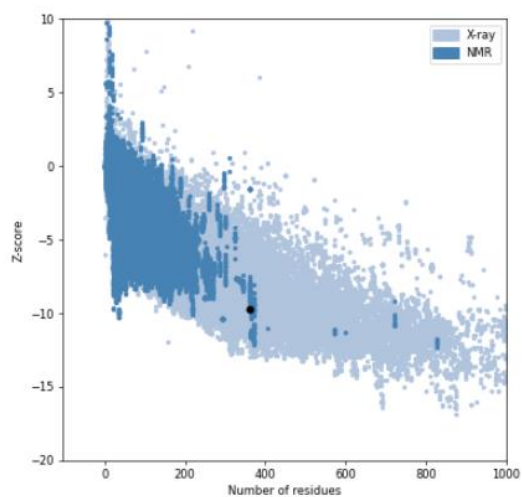
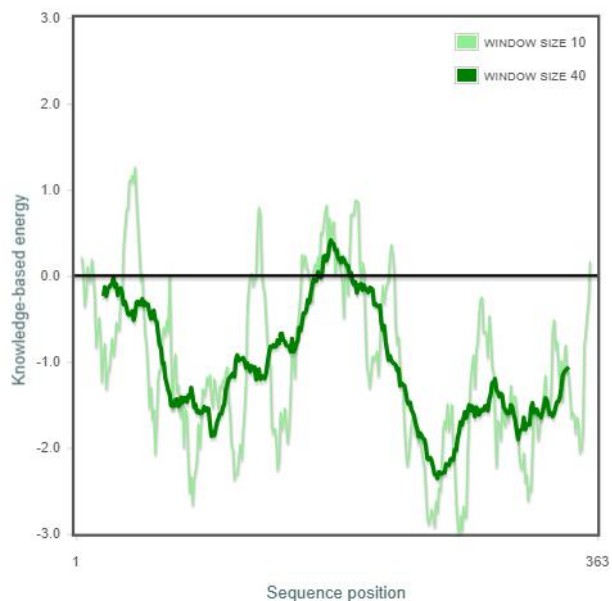
**Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

Program: ERRAT2
 File: MAPK.pdb
 Chain#:A
 Overall quality factor**: 84.726



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

PROCHECK**PROSA-web****Overall model quality**Z-Score: **-9.77****Local model quality**

Verify3D

VERIFY3D

81.54% of the residues have
averaged 3D-1D score ≥ 0.1

Pass

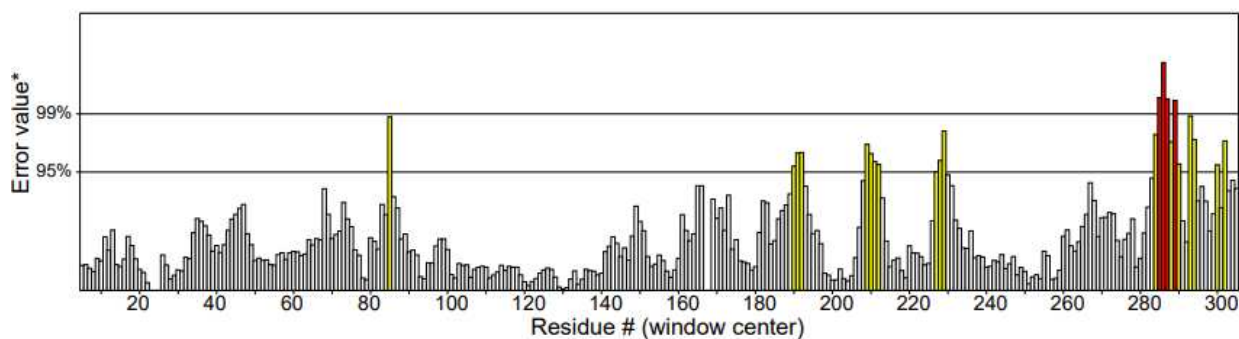
At least 80% of the amino acids have scored ≥ 0.1 in the 3D/1D profile.



10.5. PKA

ERRAT

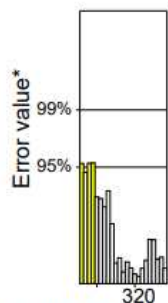
Program: ERRAT2
File: PKA.pdb
Chain#:A
Overall quality factor**: 92.163



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

Program: ERRAT2
 File: PKA.pdb
 Chain#:A
 Overall quality factor**: 92.163

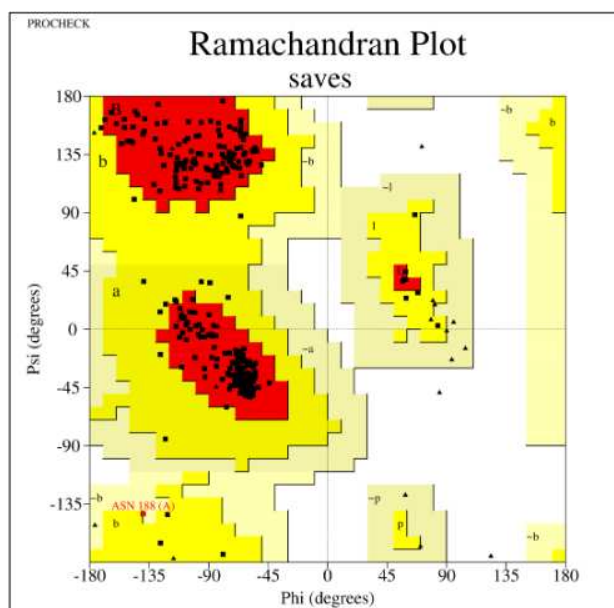


Residue # (window center)

*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

PROCHECK



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	271	92.5%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	21	7.2%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	1	0.3%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	293	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	21	
Number of proline residues	16	

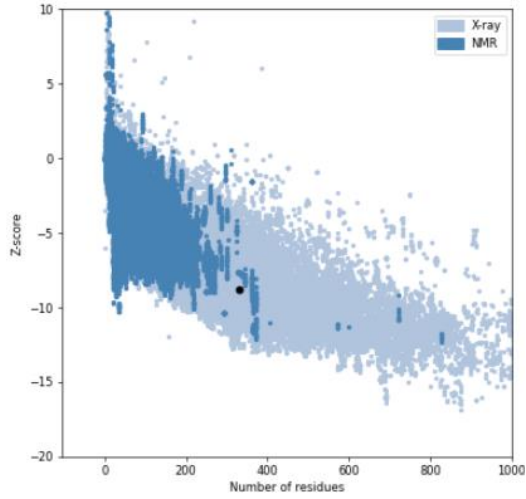
Total number of residues	332	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

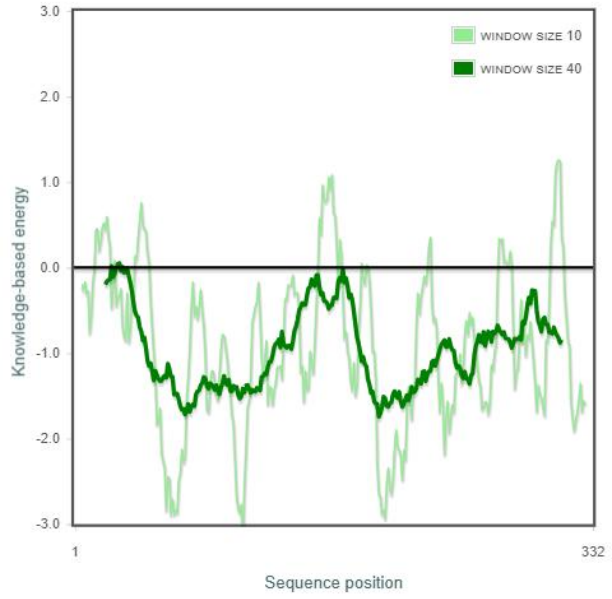
PROSA-web

Overall model quality

Z-score: **-8.8**



Local model quality



Verify3D

VERIFY3D

80.72% of the residues have averaged 3D-1D score \geq 0.1

Pass

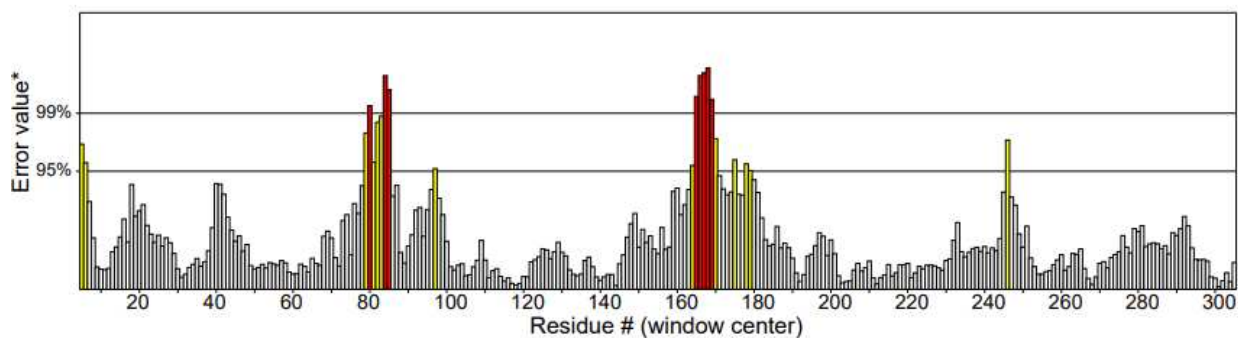
At least 80% of the amino acids have scored \geq 0.1 in the 3D/1D profile.



10.6. SRPK

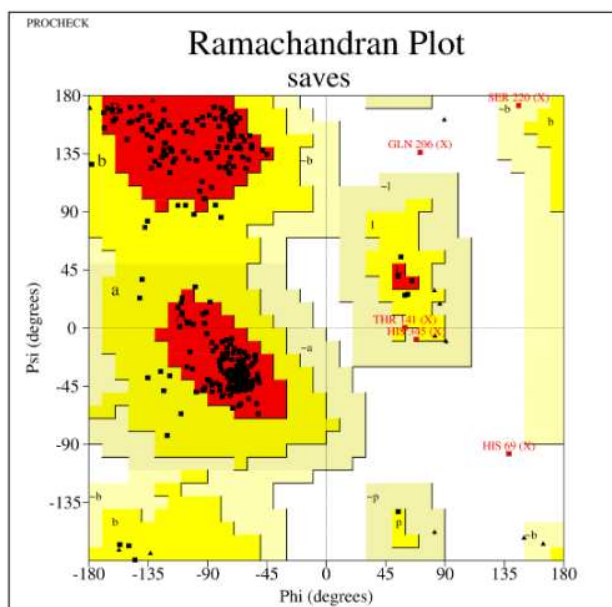
ERRAT

Program: ERRAT2
 File: LbSRPK.pdb
 Chain#:X
 Overall quality factor**: 93.878



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

PROCHECK

Plot statistics

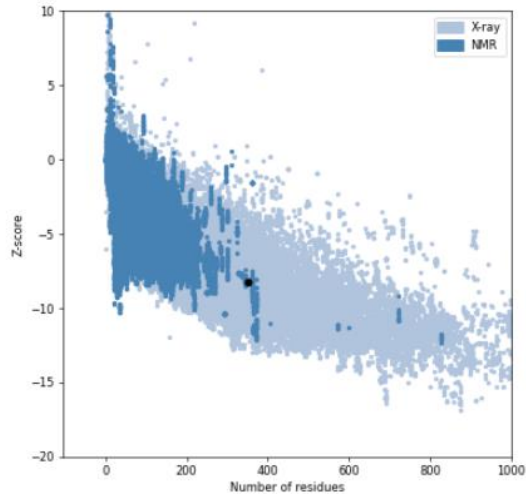
Residues in most favoured regions [A,B,L]	286	90.2%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	26	8.2%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	3	0.9%
Residues in disallowed regions	2	0.6%
Number of non-glycine and non-proline residues	317	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	16	
Number of proline residues	16	
Total number of residues	351	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

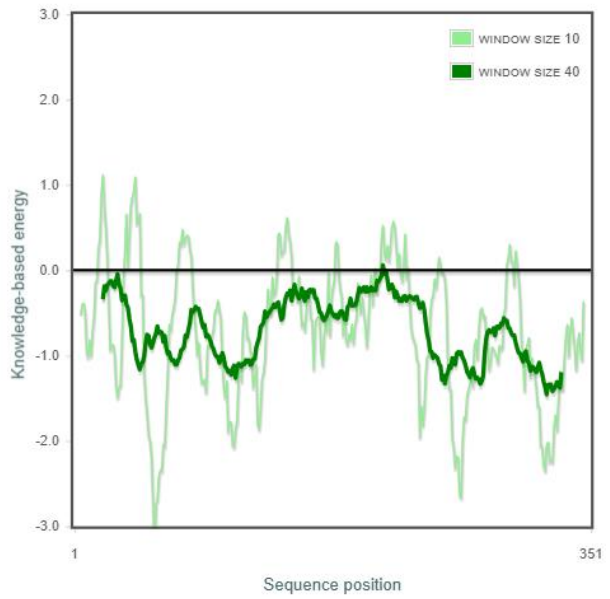
PROSA-web

Overall model quality

Z-Score: **-8.22**



Local model quality



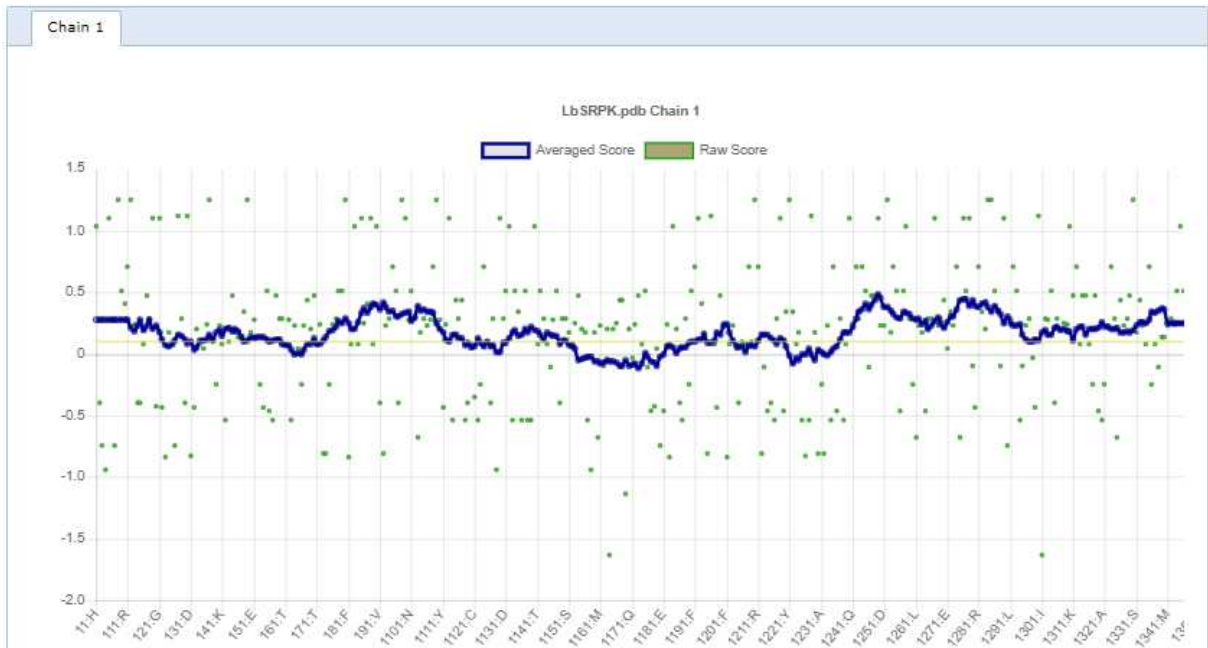
Verify3D

VERIFY3D

72.36% of the residues have averaged 3D-1D score ≥ 0.1

Fail

Fewer than 80% of the amino acids have scored ≥ 0.1 in the 3D/1D profile.



11. Apêndice C – Representação das Ligações Hidrofóbicas

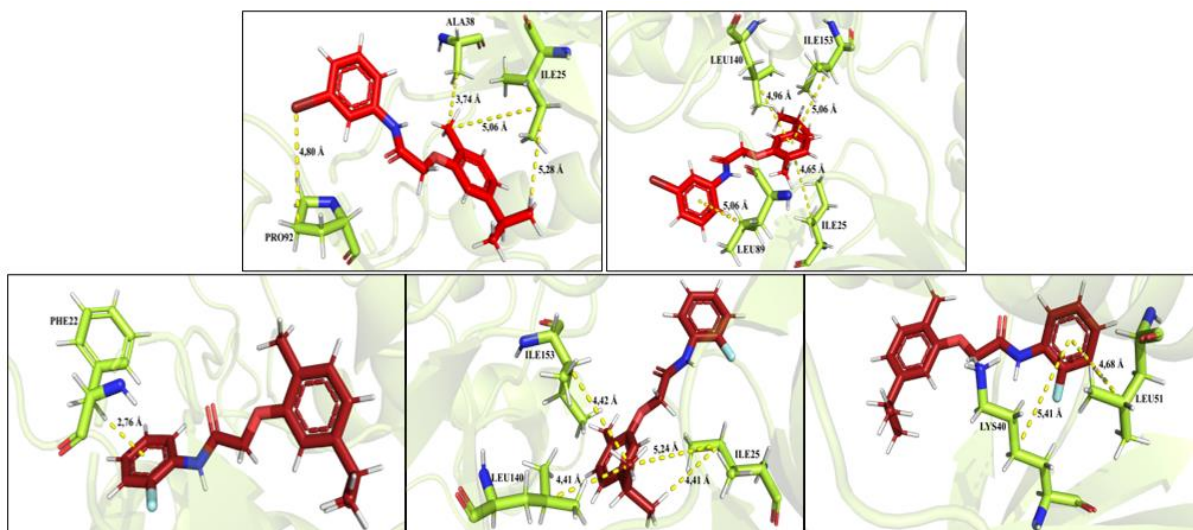


Figura 57 - Representação 3D - ligações alquil e pi-alquil da interação da proteína LbCKI com os compostos A6 em vermelho e A8 em vinho

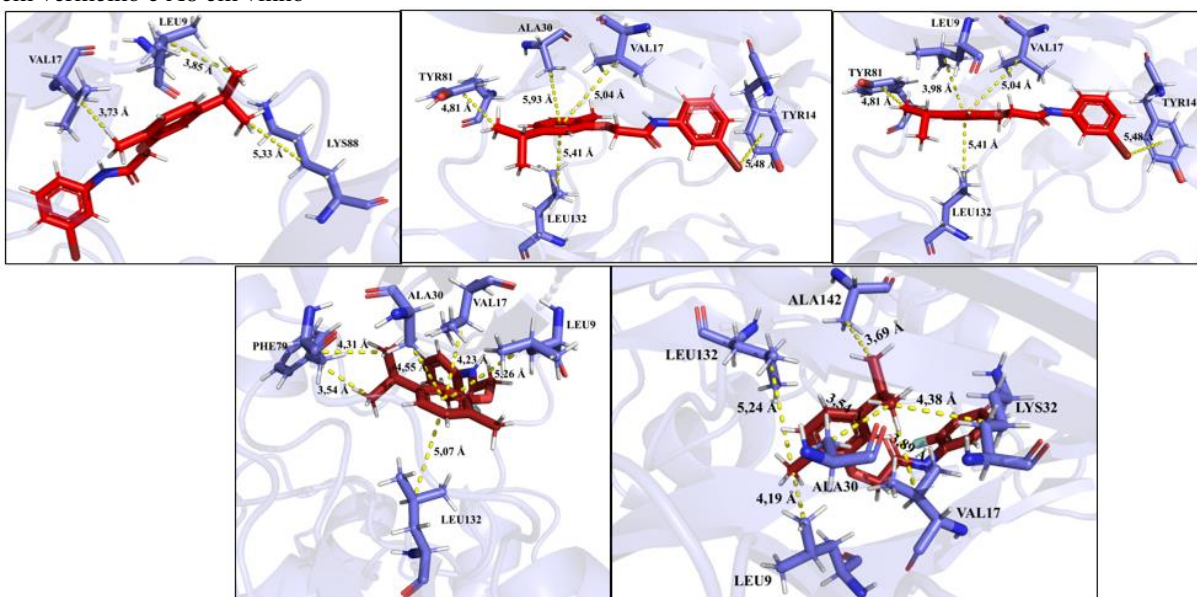


Figura 58 - Representação 3D - ligações alquil e pi-alquil da interação da proteína LbCRK3 com os compostos A6 em vermelho e A8 em vinho

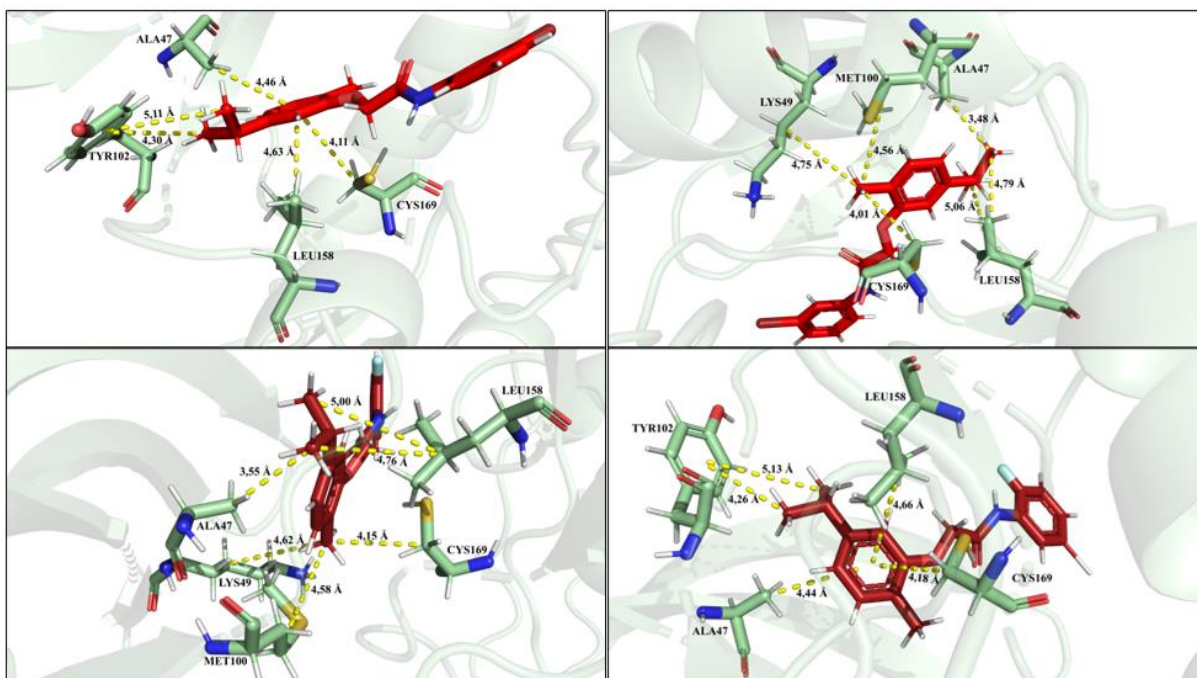


Figura 59 - Representação 3D - ligações alquil e pi-alquil da interação da proteína LbGSK com os compostos A6 em vermelho e A8 em vinho

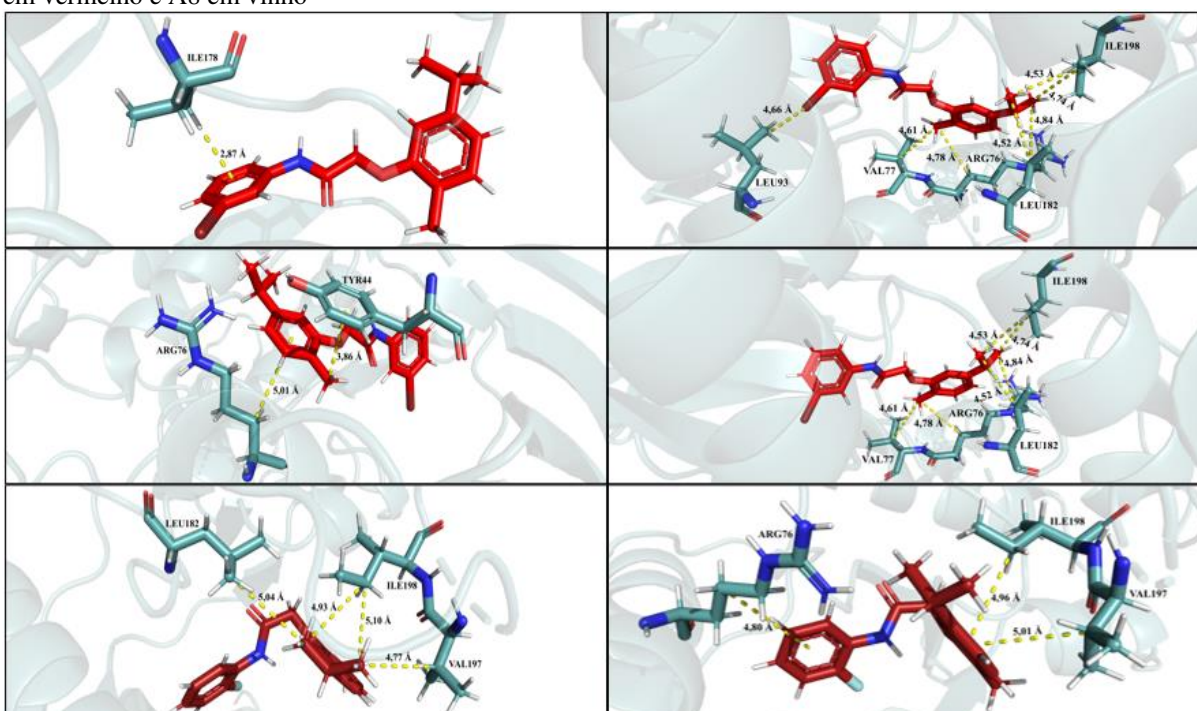


Figura 60 - Representação 3D - ligações alquil e pi-alquil da interação da proteína LbMAPK com os compostos A6 em vermelho e A8 em vinho

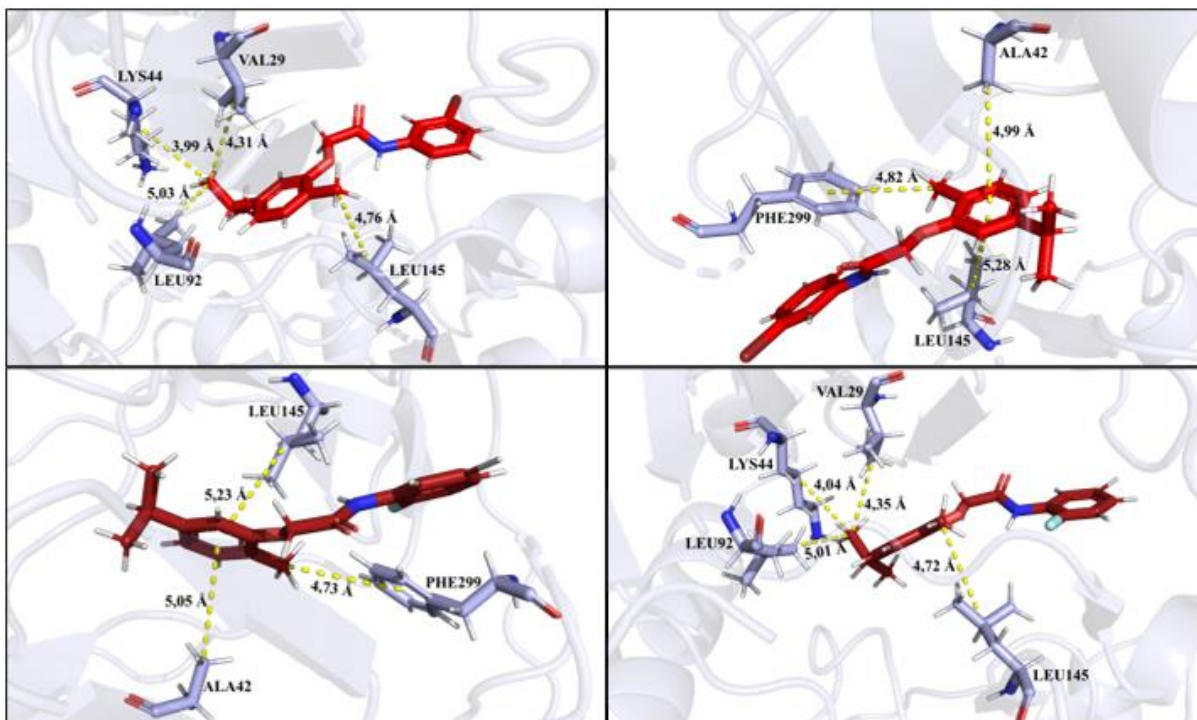


Figura 61 - Representação 3D - ligações alquil e pi-alquil da interação da proteína LbPKA com os compostos A6 em vermelho e A8 em vinho

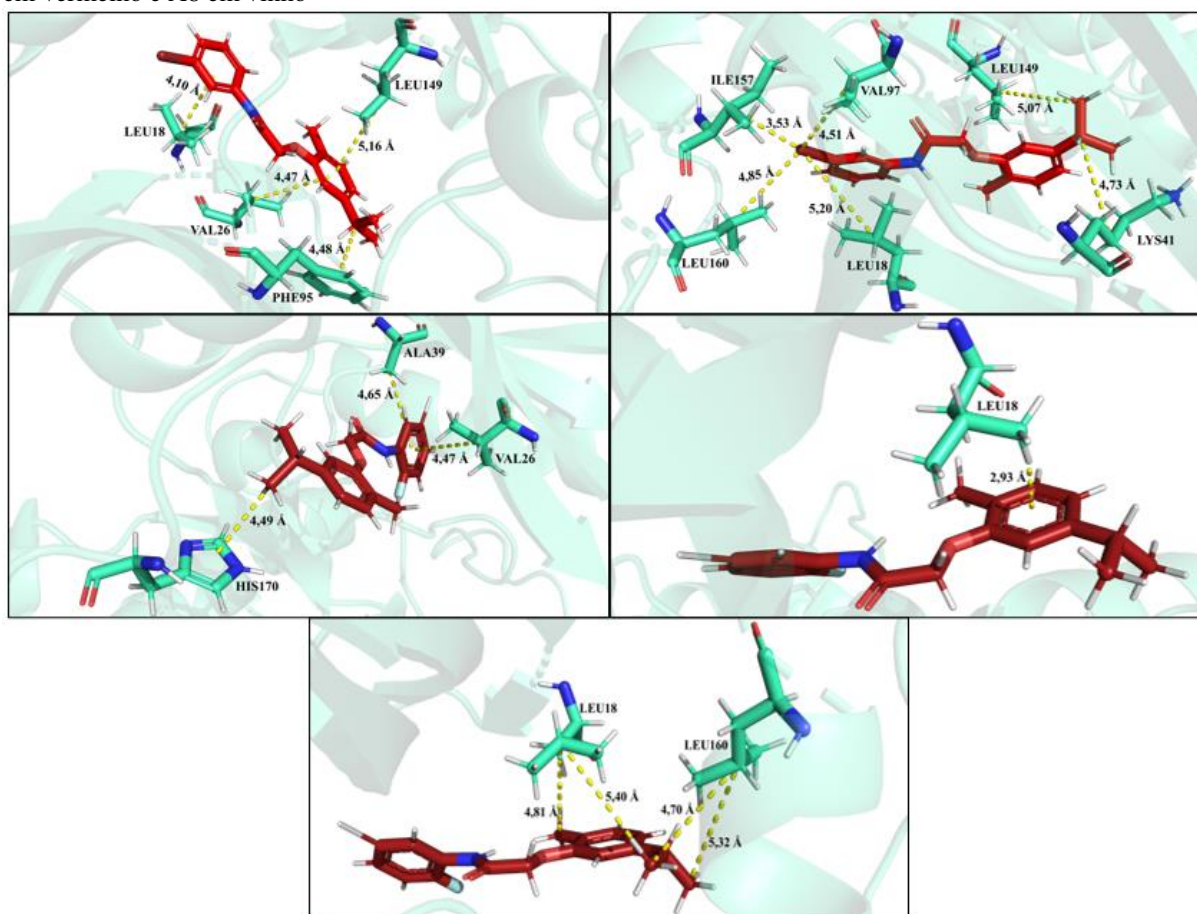


Figura 62 - Representação 3D - ligações alquil e pi-alquil da interação da proteína LbSRPK com os compostos A6 em vermelho e A8 em vinho