



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**MÁRCIA MACHADO MARINHO**

**EFEITO TRIPANOCIDA DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO CAJUEIRO**  
**(*Anacardium occidentale*): UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL E**  
**TEÓRICA**

**FORTALEZA**

**2020**

MÁRCIA MACHADO MARINHO

**EFEITO TRIPANOCIDA DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO CAJUEIRO  
(*Anacardium occidentale*): UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL E TEÓRICA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Área de concentração:** Farmácia

**Orientadora:** Profa. Dra. Alice Maria C. Martins

**Coorientador:** Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M291e Marinho, Márcia Machado.

EFEITO TRIPANOCIDA DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.): UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL E TEÓRICA / Márcia Machado Marinho. – 2020.

129 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

Coorientação: Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos.

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Infusão. 4. Ácido anacárdico. 5. Amentoflavona. I. Título.

**MÁRCIA MACHADO MARINHO**

**EFEITO TRIPANOCIDA DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO CAJUEIRO  
(*Anacardium occidentale*): UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL E TEÓRICA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria de Fátima Oliveira  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB

*À Deus*

*Ao meu amor Emmanuel*

*Aos meus filhos Emanuella, Luiz Emmanuel,*

*Ana Márcia e Germana (in memoriam)*

*Aos meus pais Gerardo (in memoriam) e Rita*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por minha existência e por minha família.

À prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alice Maria Costa Martins pela oportunidade de voltar à universidade e assim, chegar até aqui. Por ser uma excelente orientadora, dedicada e preocupada com cada um de seus alunos, minha eterna gratidão.

Ao prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos, por sempre estender a mão prontamente, sempre que precisei, sem hesitar. Grata por aceitar ser meu coorientador, sempre dedicado a me mostrar de forma franca o melhor caminho e a me oferecer apoio e orientação, apesar de minhas tribulações nesta jornada. Serei eternamente grata!

Ao prof. Dr. Emmanuel Marinho, meu amor, meu companheiro há 24 anos, meu incentivador incondicional sempre, não me deixando desistir ou desanimar, sem ele com certeza não teria chegado até aqui, muito obrigado meu eterno amor!

Aos meus filhos Luiz Emmanuel, Ana Márcia, Emanuelle, meu verdadeiro tesouro, pela compreensão nos muitos momentos de ausência para concretizar esse sonho e à minha eterna branca de neve Germaninha (*in memoriam*).

Aos meus pais Gerardo (*in memoriam*) e Rita, pelos ensinamentos e exemplo de honestidade, humildade, perseverança e amor à família.

À prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gabrielle Marinho, minha cunhada e à minha sogra Jumira por todo apoio e orações em todos os momentos dessa caminhada.

À minha irmã de coração Cíntia Carlos, por todo apoio e orações, sempre me acalmando com a palavra de Deus nos muitos momentos de angústia, desânimo, meu muito obrigada! Sei que você e sua família foram presentes de Deus em nossa vida.

Ao prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa e ao prof. Dr. Tiago Lima Sampaio, pela disponibilidade em esclarecer prontamente minhas dúvidas e em realizar os ensaios de citometria, ajudando no planejamento e direcionamento dessa jornada.

A todos os integrantes do Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC) por toda ajuda e ensinamentos, em especial à Marília Lopes por toda ajuda nos experimentos, pelo exemplo de dedicação em seu mestrado. Ao Emanuel Magalhães e Brenna Pinheiro pelo apoio nos experimentos, pelos

momentos de desabafos e descontração nos intervalos. À Danya Bandeira, sempre disposta a me ajudar, sempre que precisei, me orientando em diversas oportunidades.

Aos membros da banca pela disponibilidade em participar e pela atenção e sugestões, buscando aperfeiçoar o presente trabalho.

À coordenação e secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo suporte e apoio sempre que precisei, em especial ao querido Maxwilliam, pela disponibilidade em me ajudar prontamente, inúmeras vezes durante esse trabalho e por todo o carinho e torcida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Central Analítica da UFC, pela realização dos ensaios de microscopia eletrônica de varredura.

Ao farmacêutico Bioquímico Thiago Dias de Vasconcelos, pela pronta disponibilidade em liofilizar diversas amostras necessárias à realização desse trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

“Confia no Senhor de todo o teu coração,  
e não te estribes no teu próprio  
entendimento. Reconhece-o em todos os  
teus caminhos e ele endireitará as tuas  
veredas”. (Provérbios 3:5-6)

## RESUMO

Endêmica em 21 países da América Latina, a doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, mata mais pessoas na região a cada ano do que qualquer outra doença causada por parasitos, incluindo a malária. O nordeste brasileiro é a segunda região endêmica da doença de Chagas no país. Devido a vegetação de caatinga e habitações humanas ainda muito precárias, no Ceará encontramos uma grande diversidade de triatomíneos como *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus*, importantes na transmissão da doença no estado, sendo um estado com alta prevalência da doença. No Brasil, apenas o benznidazol é utilizado para o tratamento da doença de Chagas, sendo necessária uma busca urgente de novos fármacos, mais eficazes e seguros. Dessa forma, o presente trabalho objetivou estudar o efeito tripanocida de substâncias presentes no cajueiro (*Anacardium occidentale*) sobre as formas evolutivas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, em uma abordagem experimental e teórica por meio da infusão da folha de cajueiro e do ácido anacárdico 15:0 avaliados sobre as formas evolutivas do *T. cruzi*, epimastigotas (24, 48 e 72 h), tripomastigotas (24 h) e amastigotas (24 h). Também foram realizados ensaios de citometria de fluxo para avaliar os mecanismos de morte celular com as formas epimastigotas tratadas com o ácido anacárdico, com os marcadores 7AAD/anexina V, Rho123, H2DCFH-DA e Laranja de Acridina. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi usada para identificar possíveis alterações ultraestruturais nas formas epimastigotas tratadas com o ácido anacárdico. Na abordagem experimental, a citotoxicidade da infusão da folha de cajueiro avaliada em células LLC-MK2 pelo método do MTT, mostrou que a infusão apresentou baixa citotoxicidade nas concentrações de 1800, 900 e 450 µg/mL. As concentrações que apresentaram maior efeito citotóxico em epimastigotas e tripomastigotas foram 225; 112,5 e 56,25 µg/mL. A infusão também apresentou efeito anti-amastigota, com redução (50%) da contagem média de amastigotas/células infectadas. Quanto ao ácido anacárdico, demonstrou diminuição superior a 50% no número de amastigotas/100 células no tempo de 24 horas. Quanto à abordagem teórica, foi realizado um estudo *in silico* do ácido anacárdico e amentoflavona com os principais alvos farmacológicos do *T. cruzi*: TcGAPDH, Cruzaína e Tripanotiona redutase. A infusão da folha do cajueiro e o ácido anacárdico mostraram-se promissoras para o estudo e desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Infusão; ácido anacárdico; amentoflavona.

## ABSTRACT

Endemic in 21 countries in Latin America, Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, kills more people in the region each year than any other disease caused by parasites, including malaria. Northeastern Brazil is the second endemic region for Chagas disease in the country. Due to the caatinga vegetation and still very precarious human dwellings, in Ceará we find a great diversity of triatomines such as *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma brasiliensis* and *Panstrongylus megistus*, important in the transmission of the disease in the state, being a state with a high prevalence of the disease. In Brazil, only benznidazole is used for the treatment of Chagas disease, requiring an urgent search for new, more effective and safe drugs. Thus, the present work aimed to study the trypanocidal effect of substances present in the cashew tree (*Anacardium occidentale*) on the evolutionary forms of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*, in an experimental and theoretical approach. The cashew leaf infusion and anacardic acid were evaluated on the evolutionary forms of *T. cruzi*, epimastigotes (24, 48 and 72 h), trypomastigotes (24 h) and amastigotes (24 h). Flow cytometry assays were also performed to evaluate the mechanisms of cell death with epimastigote forms treated with anacardic acid, with the markers 7AAD / annexin V, Rho123, H2DCFH-DA and Acridine Orange. Scanning electron microscopy (MEV) was used to identify possible ultrastructural changes in epimastigote forms treated with anacardic acid. In the experimental approach, the cytotoxicity of the cashew leaf infusion evaluated in LLC-MK2 cells by the MTT method, showed that the infusion showed low cytotoxicity in the concentrations of 1800, 900 and 450 µg / mL. The concentrations that showed the greatest cytotoxic effect on epimastigotes and trypomastigotes were 225; 112.5 and 56.25 µg / mL. The infusion also had an anti-mastic effect, with a reduction (50%) in the average count of amastigotes / infected cells. As for anacardic acid, it showed a decrease of more than 50% in the number of amastigotes / 100 cells within 24 hours. As for the theoretical approach, an *in silico* study of anacardic acid and amentoflavone was carried out with the main pharmacological targets of *T. cruzi*: TcGAPDH, Cruzaína and Tripanotiona reductase. The cashew leaf infusion and anacardic acid have shown promise for the study and development of therapeutic alternatives for the treatment of Chagas disease.

**Key words:** Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; Infusion; anacardic acid; amentoflavone.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição da doença de Chagas no mundo .....	17
Figura 2 - Mapa do continente americano com destaque para Brasil, Ceará e Sudeste do Ceará.....	18
Figura 3 - Número de triatomíneos coletados nos municípios da região sudeste do Ceará de 2012 a 2015.....	19
Figura 4 - Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	20
Figura 5 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
Figura 6 - Estrutura química bidimensional do benznidazol .....	22
Figura 7 - <i>Anacardium occidentale</i> L.: região de origem, taxonomia e principais partes da planta .....	24
Figura 8 - Estrutura química bidimensional da amentoflavona.....	30
Figura 9 - Estrutura química do Ácido 2-hidroxi-6-pentadecil-benzóico (AA0) .....	31
Figura 10 - Processamento de formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> tratadas com ácido anacárdico por microscopia eletrônica de varredura.....	40
Figura 11 - Efeito citotóxico da infusão sobre as células LLC-MK2.....	41
Figura 12 - Efeito da infusão sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	43
Figura 13 - Efeito da infusão sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	44
Figura 14 - Efeito da infusão sobre células LLC-MK2 infectadas com a forma amastigota intracelular de cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....	45
Figura 15 - Fotomicrografia de células LLC-MK2 infectadas com formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y.....	46
Figura 16 - Efeito do ácido anacárdico sobre células LLC-MK2 infectadas com a forma amastigota intracelular de cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....	47
Figura 17 - Perfil de morte em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 h de tratamento com ácido anacárdico. ....	49
Figura 18 - Análise de espécies reativas de oxigênio em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com ácido anacárdico. ....	50
Figura 19 - Análise do $\Delta\Psi_m$ de epimastigotas tratados com ácido anacárdico. ....	51
Figura 20 - Histograma de intensidade de marcação com Rho123 gerada pelo ácido anacárdico.....	51
Figura 21 - Fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com ácido anacárdico.....	52
Figura 22 - Histograma representativo do sinal fluorescente de laranja de acridina do ácido anacárdico. ....	53
Figura 23 - Alterações ultraestruturais induzidas pelo ácido anacárdico em formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	54
Figura 24 - GAPDH e a via glicolítica de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	58
Figura 25 - Mecanismo de defesa do <i>T. cruzi</i> contra estresse oxidativo .....	59
Figura 26 - Metodologia da caracterização estrutural e eletrônica da amentoflavona .....	71

Figura 27 - Estrutura bidimensional dos inibidores VSI, VSII, VSIII e VSIV .....	73
Figura 28 - Mapa de Superfície do Potencial eletrostático do ácido anacárdico. ....	76
Figura 29 - Complexos TcGAPDH cristalizados com (a) nicotinamida-adenina- dinucleotídeo (NAD), (b) chalepina. Docking entre TcGAPDH e ácido anacárdico (AA0) (c) e local de ligação de AA0 e chalepina na TcGAPDH (d). ....	77
Figura 30 - Análise de MFCC e Sítio de ligação, energia de interação e resíduos do domínio- BIRD. ....	79
Figura 31 - Classificação dos aminoácidos de acordo com a polarização e características estruturais das cadeias laterais. ....	80
Figura 32 - Estruturas otimizadas para amentoflavona (A) e apigenina (B) calculadas pelo método DFT usando B3LYP funcional e conjunto de bases 6-31G (d, p). ....	82
Figura 33 - Coeficiente de correlação entre o espectro infravermelho teórico e experimental da amentoflavona. ....	85
Figura 34 - Orbitais de fronteira e gap ( $\Delta E_{Gap}$ ) de Amentoflavona (A) e Apigenina (B). ....	88
Figura 35 - Isosuperfícies da função condensada da amentoflavona para ataque nucleofílico (f+)(a) e ataque eletrofílico (f-) (b). ....	92
Figura 36 - Isosuperfícies da função Fukui condensada da amentoflavona para o descritor duplo ( $\Delta f$ ). ....	93
Figura 37 - Mapa de superfície do potencial eletrostático do biflavonoide amentoflavona.....	95
Figura 38 - Complexos TcGAPDH cristalizados com chalepin (a). Acoplamento entre TcGAPDH e Amentoflavona (b), Benznidazol (BZ) (c) e local de ligação da amentoflavona, BZ e chalepin no TcGAPDH (d). ....	97
Figura 39 - Mapa 2D representativo das principais interações entre amentoflavona e resíduos de aminoácidos TcGAPDH. ....	99
Figura 40 - Tripanotiona redutase complexada com (a) quinacrina mostarda. Docking entre tripanotiona redutase e Benznidazol (BZ) (B) Amentoflavona (C) e local de ligação de Amentoflavona, BZ e quinacrina mostarda na Tripanotiona Redutase (d). .....	100
Figura 41 - Mapa 2D representativo das principais interações entre os resíduos de aminoácidos da amentoflavona e da tripanotiona redutase. ....	101
Figura 42 - Complexos de cruzaina com inibidor de tetrafluorofenoximetil cetona (KB2) (A), amentoflavona (B), Benznidazol (BZ) (C) e sítio de ligação da amentoflavona, BZ e KB2 na cruzaina (D). ....	102
Figura 43 - Mapa 2D representativo das principais interações entre amentoflavona e resíduos de aminoácidos da cruzaina. ....	104
Figura 44 - Docking molecular entre o ligante amentoflavona e a cruzaina. ....	105
Figura 45 - Interações entre o ligante amentoflavona e a cruzaina (PDB 1F2B). ...	106
Figura 46 - Visualização das distâncias entre a amentoflavona e os resíduos da cruzaina .....	107
Figura 47 - Docking comparativo entre a amentoflavona e redocking VSI da cruzaina (1F29). ....	108

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito da infusão sobre formas epimastigotas de cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....	44
Tabela 2 - Os assinalamentos (wavenumbers) de IR calculados e experimentais e suas atribuições de amentoflavona .....	85
Tabela 3 - Propriedades termodinâmicas calculadas da Amentoflavona e Apigenina pelo método B3LYP / 6-31G (d, p) .....	87
Tabela 4 - Valores calculados de energia de Amentoflavona pelo método B3LYP / 6-31G (d, p) .....	87
Tabela 5 - Função fukui condensada da amentoflavona .....	90
Tabela 6 - Distâncias dos ligantes Amentoflavona, Benznidazol, chalepina dos resíduos de aminoácidos da TcGAPDH.....	99
Tabela 7 - Distâncias entre os ligantes amentoflavona, benznidazol, quinacrina mostarda e resíduos de aminoácidos de tripanotona redutase .....	101
Tabela 8 - Distâncias entre os ligantes amentoflavona, Benznidazol, KB2 e os resíduos de aminoácidos da cruzaina .....	104
Tabela 9 - Distanciamento dos resíduos da cruzaina e os ligantes vinílicos sulfônicos .....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BZ</b>	Benznidazol
<b>CT</b>	Controle
<b>DC</b>	Doença de Chagas
<b>DCF</b>	2',7'- diclorofluoresceína
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNDi</b>	<i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i>
<b>EPM</b>	Erro Padrão Médio
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular
<b>LAFEPE</b>	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
<b>LIT</b>	Meio Liver infusion tryptose
<b>LLC-MK2</b>	Células <i>Rhesus monkey kidney</i>
<b>LBFBC</b>	Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PBS</b>	Tampão fosfato em salina
<b>Rpm</b>	Rotação por minuto
<b>SBF</b>	Soro bovino fetal
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b><i>T. cruzi</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>

## SUMÁRIO

<b>SEÇÃO 1 – Doença de Chagas e suas implicações .....</b>	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 Doença de Chagas .....	17
1.1.1 Trypanosoma cruzi.....	19
1.1.2 Tratamento farmacológico da doença de Chagas.....	21
1.2 Produtos Naturais como fonte de novos fármacos tripanocidas .....	23
1.2.1 Cajueiro ( <i>Anacardium occidentale</i> L.) .....	23
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>27</b>
<b>SEÇÃO 2 – Abordagem experimental .....</b>	<b>28</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
1.3.1.1 Infusão da folha de cajueiro.....	29
1.3.1.2 Amentoflavona.....	30
1.3.1.3 Ácido Anacárdico .....	31
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos .....	33
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
3.1 Materiais .....	34
3.2 Obtenção da infusão da folha de cajueiro ( <i>Anacardium occidentale</i> L.) .....	34
3.3 Avaliação do potencial tripanocida <i>in vitro</i> em cepas Y de <i>T. cruzi</i> de substâncias presentes no cajueiro.....	35
3.3.1 Avaliação da citotoxicidade da infusão da folha de cajueiro nas células hospedeiras LLC-MK2 .....	35
3.3.2 Efeito da infusão da folha de cajueiro em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	36
3.3.3 Efeito da infusão da folha de cajueiro em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	36
3.3.4 Efeito da infusão da folha de cajueiro e do ácido anacárdico em formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	37
3.3.5 Investigação do mecanismo de morte das formas epimastigotas tratadas com ácido anacárdico.....	37
3.3.5.1 Efeito necrótico e/ou apoptótico em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	37

3.3.5.2	Avaliação de espécies reativas de oxigênio (EROS) .....	38
3.3.5.3	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial .....	38
3.3.5.4	Avaliação da tumefação de reservossomos .....	39
3.3.6	Avaliação de alterações morfológicas ultraestruturais por microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	39
3.3.7	Análise de dados.....	40
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
4.1	Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> em cepas Y de <i>T. cruzi</i> .....	41
4.1.1	Avaliação da citotoxicidade da infusão nas células hospedeiras .....	41
4.1.2	Ensaio em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	42
4.1.3	Ensaio em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	44
4.1.4	Efeito da infusão sobre formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	45
4.1.5	Efeito do ácido anacárdico sobre formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	46
4.1.6	Avaliação do perfil de morte celular do ácido anacárdico nas formas epimastigotas .....	47
4.1.6.1	Efeito necrótico e/ou apoptótico em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> ...	48
4.1.6.2	Avaliação de espécies reativas de oxigênio (EROS) .....	49
4.1.6.3	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial .....	50
4.1.6.4	Investigação de tumefação dos reservossomos .....	52
4.1.7	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	53
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
	<b>SEÇÃO 3 – Abordagem teórica .....</b>	<b>56</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>57</b>
1.1	Alvos farmacológicos para desenvolvimento de fármacos antichagásicos ..	57
1.1.1	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcGAPDH) .	57
1.1.2	Cruzaína .....	58
1.1.3	Tripanotiona redutase .....	58
1.2	Estudos computacionais .....	60
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>62</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	62
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	62
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
3.1	Estudo <i>in silico</i> do ácido anacárdico .....	63
3.1.1	Otimização geométrica do ácido anacárdico .....	63

3.1.2 Docking Molecular do AA0 com TcGAPDH .....	63
3.1.3 Fracionamento Molecular com Capas Conjugadas (MFCC).....	64
3.2 Estudo <i>in silico</i> do biflavonoide Amentoflavona .....	65
3.2.1 Caracterização estrutural e eletrônica do biflavonoide Amentoflavona.....	65
3.2.2 Docking molecular do biflavonoide Amentoflavona com alvos terapêuticos do <i>Trypanosoma cruzi</i> (Cruzaína, TcGAPDH e Tripanotona redutase) .....	71
3.2.3 Docking molecular do biflavonoide Amentoflavona com a enzima cruzaína complexada com derivados vinil sulfônicos .....	73
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
4.1 Estudo <i>in silico</i> do ácido anacárdico (AA0) .....	75
4.1.1 Mapa de Superfície do Potencial Eletrostático (MESP) do Ácido Anacárdico .....	75
4.1.2 Docking Molecular e MFCC do ácido anacárdico .....	76
4.2 Estudo <i>in silico</i> do biflavonoide Amentoflavona .....	81
4.2.1 Caracterização estrutural e eletrônica do biflavonoide Amentoflavona.....	81
4.2.2 Infravermelho e análise Termodinâmica .....	83
4.2.3 Orbitais de Fronteira e Descritores de Reatividade .....	86
4.2.4 Funções condensadas de Fukui, descritores duplos e multifílicos .....	89
4.2.5 Mapa de Superfície do Potencial eletrostático da amentoflavona .....	94
4.2.6 Docking molecular da amentoflavona e alvos enzimáticos .....	95
4.2.7 Docking molecular da amentoflavona e cruzaína (PDB 1F29, 1F2A, 1F2B, 1F2C).....	104
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>109</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>110</b>

**SEÇÃO 1 –**  
**Doença de Chagas e suas**  
**implicações**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo parasito protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, sendo comumente transmitido ao homem pelo inseto conhecido popularmente como barbeiro (BONNEY, 2014)(RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Atualmente, a doença de Chagas afeta de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, causando cerca de 14.000 mortes por ano, decorrentes de suas complicações (DNDI, 2019). A doença de Chagas é endêmica em 21 países da América Latina, mata mais pessoas nessa região a cada ano, do que qualquer outra doença causada por parasitos, incluindo a malária. Adicionalmente, devido ao aumento da migração de latino-americanos, que muitas vezes, carregam o parasito no sangue, sem saber, é crescente o número de pacientes em países desenvolvidos e não endêmicos como Austrália, Canadá, Japão, Espanha e Estados Unidos (BERN *et al.*, 2011)(DNDI, 2019) (Figura 1).

Figura 1- Distribuição da doença de Chagas no mundo



Fonte: (DNDI, 2019).

No Brasil, a região nordeste é a segunda principal região endêmica da doença de Chagas no país, sendo a Bahia o estado com maior diversidade de espécies de triatomíneos do Brasil. A vegetação de caatinga e as habitações humanas precárias encontradas na zona rural do estado do Ceará facilitam a presença de diversas espécies de triatomíneos, como *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, importantes na transmissão da doença de Chagas no estado (FIDALGO *et al.*, 2018), sendo altamente prevalente no Ceará (14,8%), principalmente na região sudeste do estado (ALENCAR, 1987; FIDALGO *et al.*, 2018) (Figura 2).

Figura 2 - Mapa do continente americano com destaque para Brasil, Ceará e Sudeste do Ceará

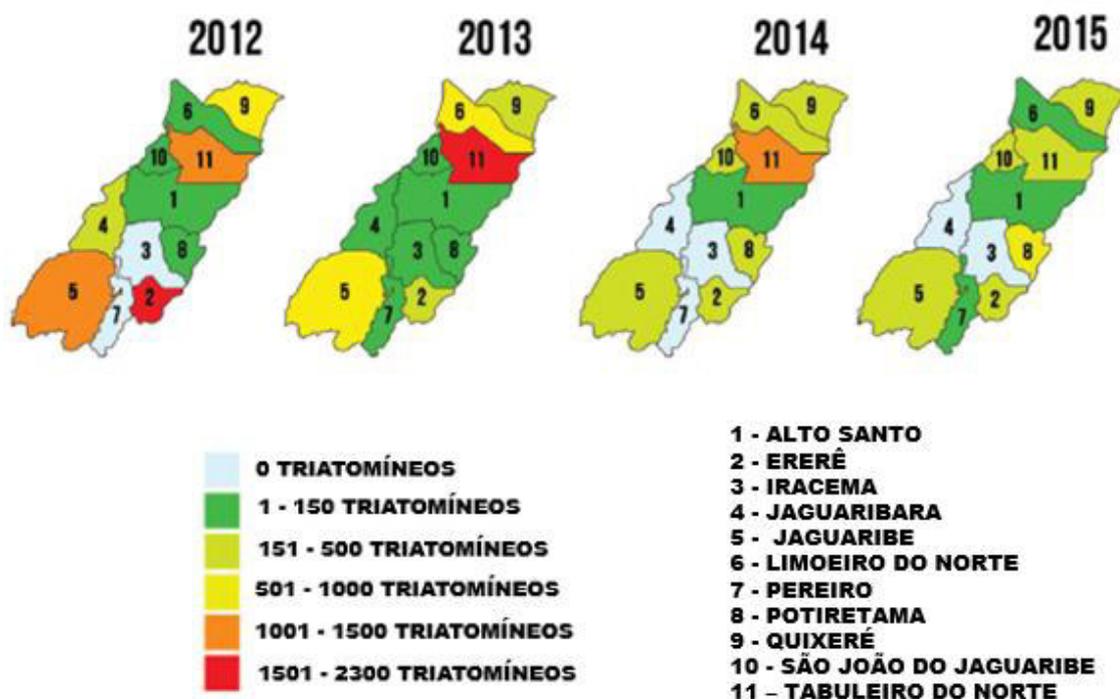


Fonte: Adaptado de (FIDALGO ET AL, 2018).

O Núcleo de Controle de Vetores do Ceará (NUVET) da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, entre os anos de 2012 e 2015, realizou coletas de triatomíneos (ninha e adultos) nos 11 municípios da região sudeste do Ceará: Alto Santo, Ererê, Iracema, Jaguaribara, Jaguaribe, Limoeiro do Norte, Pereiro, Potiretama, Quixeré, São João do Jaguaribe e Tabuleiro do Norte (Figura 3), para investigar a taxa de infecção por *Trypanosoma cruzi*, usando o método de compressão abdominal do triatomíneo (FIDALGO *et al.*, 2018). Os espécimes encontrados em Limoeiro do Norte apresentaram o maior número de amostras infectadas durante todo

o período da pesquisa, com uma taxa de infecção de 5,3%.

Figura 3 - Figura 3 – Número de triatomíneos coletados nos municípios da região sudeste do Ceará de 2012 a 2015



Fonte: Adaptado de (FIDALGO *et al.*, 2018).

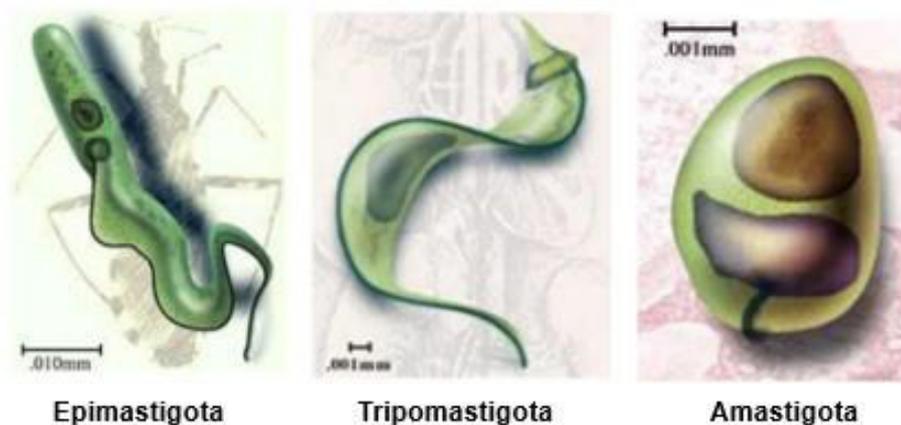
A redução gradual nas amostras coletadas pelo NUVET no período de 2012 a 2015 pode ser atribuída ao sucesso do programa de controle de vetores, bem como pela melhoria das habitações e/ou melhoria dos hábitos sanitários da população desses municípios do estado, mostrando a importância dos esforços para educação das populações no reconhecimento dos triatomíneos e da ampliação das notificações às autoridades de saúde para garantir o controle desses vetores (FIDALGO *et al.*, 2018).

### 1.1.1 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, durante seu ciclo biológico, apresenta três principais formas evolutivas: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (Figura 4). Epimastigota é a forma proliferativa não infectante encontrada no intestino médio do inseto; tripomastigota é uma forma infectante não proliferativa, que está presente na

circulação sanguínea e amastigota é uma forma proliferativa intracelular (ADADE *et al.*, 2013). O parasito *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo, sendo necessária a passagem obrigatória em dois hospedeiros, o inseto vetor triatomíneo e um hospedeiro vertebrado (FRANCISCO *et al.*, 2017).

Figura 4 - Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de SFE® Brazil, 2019.

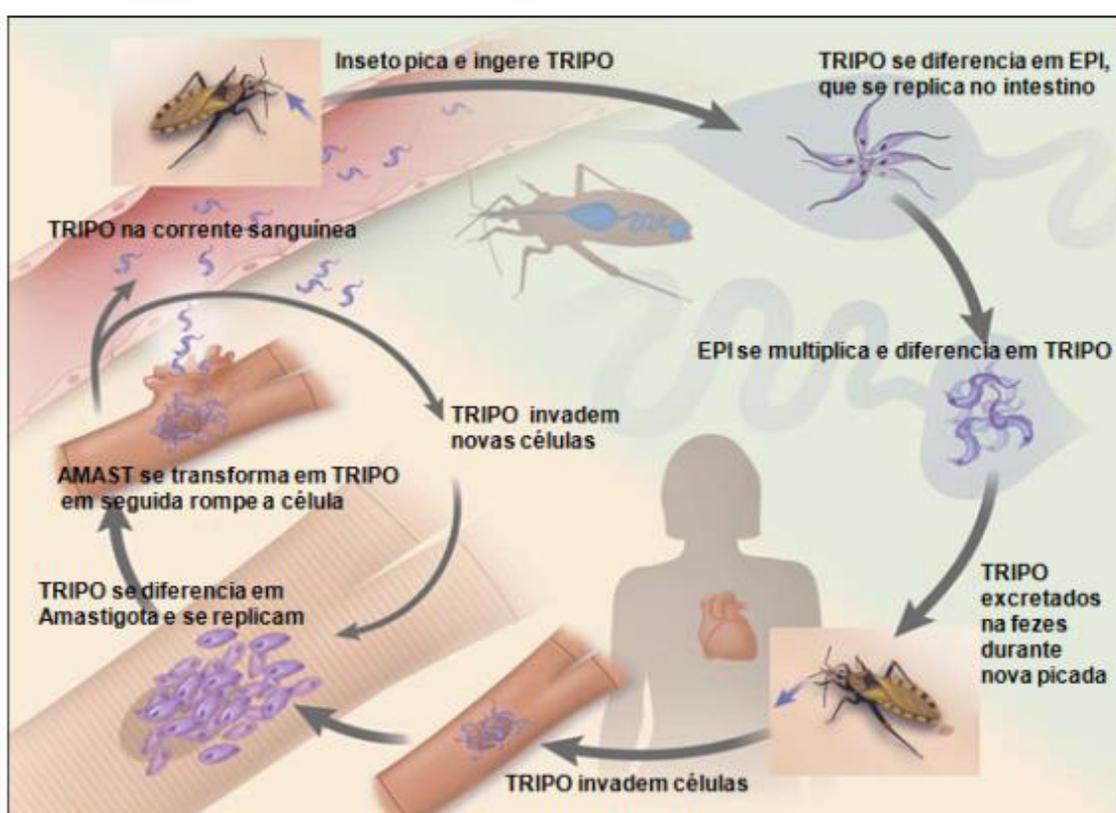
A infecção pelo *T. cruzi* ocorre, predominantemente, por meio da transmissão por insetos triatomíneos que sugam o sangue de vertebrados infectados com tripomastigotas e assim, dá início ao ciclo de vida do parasito. Após serem ingeridos pelo inseto vetor, os tripomastigotas se transformam em formas epimastigotas no intestino médio anterior. Os epimastigotas, então, se multiplicam e se juntam à membranas perimicrovilares das células intestinais do triatomíneo (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010)(MEIRA *et al.*, 2015).

Muitos epimastigotas se separam da superfície intestinal, transformando-se em tripomastigotas metacíclicos infecciosos, sendo então liberados durante o repasto sanguíneo junto com fezes e urina. Os tripomastigotas metacíclicos só conseguem penetrar a pele do hospedeiro através de fricção (coceira), cortes, feridas ou ainda, por meio de superfícies de membranas mucosas no local da inoculação (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; MEIRA *et al.*, 2015).

Para a invasão em macrófagos, fibroblastos e células epiteliais pelos parasitos, há a formação de um vacúolo endocítico parasitóforo (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; MEIRA *et al.*, 2015). Em seguida, o parasito promove a lise enzimática do vacúolo da membrana, diferenciando-se, então, em amastigotas intracelulares. Após nove ciclos de divisão binária, são transformados em

tripomastigotas, eventualmente, lançados na circulação sanguínea como tripomastigotas sanguíneos, que podem infectar novas células ou podem ser ingeridos por um novo inseto vetor durante o repasto sanguíneo, repetindo assim, o ciclo do parasito (DVORAK; HYDE, 1973). O parasito, quando na corrente sanguínea de um hospedeiro mamífero, pode infectar diversos tipos de células de vários tecidos, espalhando-se para novos locais de infecção, onde são diferenciados em amastigotas intracelulares (SILVEIRA; DIAS, 2011) (Figura 5).

Figura 5 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de (BERN, 2015).

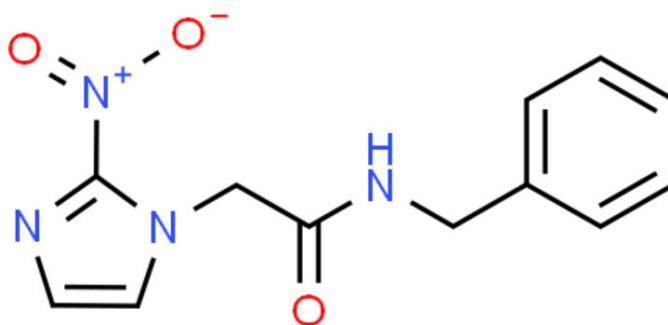
Legenda: EPI – epimastigotas; TRIPO – tripomastigotas; AMAST – amastigotas.

### 1.1.2 Tratamento farmacológico da doença de Chagas

Embora principal causadora de mortes prematuras na América do Sul, a doença de Chagas é tratada apenas com dois medicamentos, o benznidazol e o Nifurtimox. No Brasil, o único fármaco disponível para o tratamento da doença de Chagas é o benznidazol (BZ), um composto nitroheterocíclico (Figura 6) desenvolvido

pelo laboratório Roche®, cuja patente foi repassada para o Brasil, que passou a produzir a produzi-lo pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) para distribuição pelo Sistema único de Saúde (SUS) (OLIVEIRA *et al.*, 2008). O benznidazol é eficaz no início da fase aguda, isto é, logo após a infecção, contudo, não apresenta boa efetividade na fase crônica (determinada ou indeterminada). Foi desenvolvido há mais de cinquenta anos, e apresenta sérios efeitos adversos, como reações cutâneas, febre, dermatite atópica, eritomatose, erupções sensíveis à luz, púrpura, perda de peso e distúrbios gastrointestinais logo nas primeiras semanas de tratamento.

Figura 6 - Estrutura química bidimensional do benznidazol



Fonte: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.29299.html?rid=9192bdfc-9e9d-4c85-9ee2-dd61632eb75f>

Um tratamento prolongado com o benznidazol, de aproximadamente 2 meses, com doses diárias de 5 a 7 mg/kg de peso corporal, contribui para o surgimento de complicações como leucopenia, trombocitopenia e distúrbios neurológicos, tais como degeneração neurológica (COURA, JOSÉ RODRIGUES; BORGES-PEREIRA, 2012; HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação dos fármacos tripanocidas não está totalmente elucidado. O benznidazol, age por um mecanismo de stress redutivo, que envolve uma modificação covalente de macromoléculas parasitárias por intermediários nitroreduzidos. O benznidazol é considerado um pró fármaco que atua através da formação de radicais livres e metabólitos nucleofílicos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, alguns requisitos para um quimioterápico efetivo: cura parasitológica dos casos agudos e crônicos da infecção; efetividade em poucas doses ou dose simples; não apresentar efeitos colaterais ou teratogênicos; agente etiológico não desenvolver resistência (COURA, JOSÉ

RODRIGUES; DE CASTRO, 2002). Nesse contexto, o benznidazol não atende a esses requisitos, existindo assim, a necessidade na busca de novas substâncias bioativas, bem como de estratégias terapêuticas que promovam maior seletividade sobre os parasitas sem causar tantas complicações para o hospedeiro.

## **1.2 Produtos Naturais como fonte de novos fármacos tripanocidas**

Para iniciar o desenvolvimento de novos fármacos, estruturas de origem natural têm sido utilizados como ponto de partida, sendo a base molecular para mais de 50% dos novos fármacos disponibilizados atualmente (CHEUKA *et al.*, 2017). Um fato fundamental dos produtos naturais na descoberta de novas drogas, é a grande diversidade estrutural ainda não explorada (CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; SALEM; WERBOVETZ, 2006), tornando-os uma excelente fonte de novos compostos bioativos, que podem ser usados de forma direta ou com modificações estruturais que buscam o melhoramento de suas atividades e/ou redução da toxicidade e efeitos colaterais.

Algumas classes de compostos naturais, como os alcaloides, terpenos e flavonoides, têm apresentado atividade antiparasitária, em doenças como leishmanioses, malária e tripanossomíase americana (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2003; VON KARSTEDT; MONTINARO; WALCZAK, 2017). As pesquisas com produtos derivados de plantas, vem crescendo significativamente, por serem de fácil acesso e relativamente baratos.

### **1.2.1 Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.)**

Nesse contexto, pode-se destacar a espécie vegetal *Anacardium occidentale* L., popularmente conhecida como cajueiro (Figura 7), nativo do Brasil, encontrado de forma abundante na biodiversidade do Nordeste, onde se destaca pela elevada importância socioeconômica para a região, representando 99,7% das exportações brasileiras da amêndoa de castanha de caju (principal produto da cajucultura) (BRAINER; VIDAL, 2018).

Figura 7 - *Anacardium occidentale* L.: região de origem, taxonomia e principais partes da planta



Fonte: Adaptado de (PEDRO, 2015).

Esta espécie é objeto de pesquisa frequente por apresentar diversas propriedades farmacológicas como atividade antimicrobiana (CHABI *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2007), antifúngica (PIRES *et al.*, 2011), antioxidante, larvicida e antiacetilcolinesterase (OLIVEIRA, MICHELINE SOARES COSTA *et al.*, 2011) e atividade antidiabética (JAISWAL *et al.*, 2017).

## 2. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é uma doença tropical causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, classificada como negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Atualmente, há aproximadamente 6 a 7 milhões de pessoas infectadas no mundo e calcula-se que 70 milhões de pessoas poderão contrair essa doença (DNDI, 2019). Esta é uma doença endêmica na América Latina, África e Ásia, afetando milhões de pessoas a cada ano (DNDI, 2019; SCHMUNIS, 2007). Com o aumento da migração internacional, a doença de Chagas, também afetou regiões não endêmicas, como Austrália, Canadá, Japão, Espanha e Estados Unidos (BERN, CARYN *et al.*, 2011; DNDI, 2016; JACKSON *et al.*, 2010).

No Brasil, destacamos a região nordeste como uma das mais endêmicas, com uma grande diversidade de triatomíneos na Bahia e Ceará. Desde meados de 1940, o Ceará tem apresentado alta prevalência da doença de Chagas (ALENCAR, J.E., 1987; FIDALGO ET AL, 2018), principalmente no sudeste do estado, no município de Limoeiro do Norte. A dificuldade no controle das espécies de triatomíneos *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata* é apontada como um dos fatores determinantes na dispersão do *T. cruzi* (FIDALGO ET AL, 2018).

O Benznidazol é o único fármaco utilizado no Brasil para o tratamento da doença de Chagas, apresenta eficácia apenas na fase aguda da doença, com uma taxa média de cura de 80% entre casos agudos e recentes. O Benznidazol apresenta efeitos colaterais significativos (COURA, JOSÉ RODRIQUES; DE CASTRO, 2002; NAGAJYOTHI *et al.*, 2013) e é contraindicado para pacientes com insuficiência hepática, renal ou em caso de gravidez. Surge a necessidade de novas drogas, mais eficazes e com menos efeitos colaterais.

A biodiversidade brasileira tem ofertado substâncias com grande potencial biotecnológico (KOH; KINI, 2012), devido às estruturas com características específicas como grande variedade química, especificidade bioquímica bem como outras propriedades moleculares, tornando-as propensas à descoberta de novos fármacos (CHATELAIN, 2015). Dessa forma, a descoberta de novas substâncias oriundas de produtos naturais com atividade antichagásica, pode fornecer um potencial biotecnológico para serem utilizadas como fármacos na doença de Chagas.

Várias substâncias extraídas de plantas medicinais foram testadas quanto à inibição de TcGAPDH, enzima com papel fundamental no ciclo evolutivo do

*Trypanosoma cruzi* (DE MARCHI *et al.*, 2004; HANAU *et al.*, 2004; MENEZES *et al.*, 2003). A chalepina (uma furanocumarina isolada de espécies da família *Rutaceae*) mostrou alto efeito inibitório sobre o TcGAPDH (SCHMELZER; GURIB-FAKIM, 2008; VIEIRA *et al.*, 2001). Outro inibidor natural importante do TcGAPDH é o ácido anacárdico 15:0 (PEREIRA, JUNIA M. *et al.*, 2008), extraído da casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale*), uma planta nativa do nordeste brasileiro e também encontrada na América Central, África, Ásia, Índia e Vietnã (SANTOS *et al.*, 2007). Várias atividades biológicas de ácido anacárdico foram relatadas: antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antitumoral, antiparasitária, moluscicida, larvicida e inseticida (HEMSHEKHAR *et al.*, 2012; KUBO *et al.*, 2006; MENDES; OLIVEIRA, 1990; OLIVEIRA, MICHELINE SOARES COSTA *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2012).

Devido à sua alta capacidade de inibição através do estudo racional de fármacos, o ácido anacárdico tem sido estudado como um promissor fármaco tripanocida. O TcGAPDH ainda não foi co-cristalizado com o ácido anacárdico e os detalhes de seu mecanismo de interação com o sítio ativo da enzima não estão bem elucidados, sendo fundamental as análises de docking e MFCC.

Outras enzimas fundamentais no ciclo evolutivo do *T. cruzi* que podemos destacar são a cruzaína, essencial para a infecção das células hospedeiras, replicação e metabolismo no decorrer do ciclo de vida do parasito e a tripanotiona redutase.

Devido a distribuição geográfica e facilidade de acesso do cajueiro, além de ser uma planta típica do Nordeste brasileiro, justifica-se a exploração científica e racional dessa matéria prima regional, sendo alvo de estudo do grupo de pesquisa há quase 10 anos. Dessa forma, o presente estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas, avaliando o efeito biológico *in vitro* de substâncias presentes no cajueiro (*Anacardium occidentale*) como o ácido anacárdico, a amentoflavona, bem como a infusão da folha e o estudo *in silico* para triagem dos melhores alvos farmacológicos para estudo do ácido anacárdico e amentoflavona.

### 3. OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito tripanocida de substâncias presentes no cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) sobre as formas evolutivas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, em uma abordagem experimental e teórica.

## **SEÇÃO 2 –** **Abordagem Experimental**

## 1. INTRODUÇÃO

Previamente, o grupo de pesquisa do prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos (UFC/Sobral) iniciou um trabalho com o cajueiro, investigando a atividade antifúngica da cinza do bagaço do pedúnculo do caju, uma das maiores fontes de resíduos da indústria cajueira. O grupo também analisou a atividade antimicrobiana da infusão da folha de cajueiro frente a bactéria *Streptococcus mutans* (PIRES *et al.*, 2011). Em parceria com o grupo de pesquisa do Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica/UFC foram realizados ensaios iniciais (citotoxicidade em células LLC/MK2; testes com as formas evolutivas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*) de atividade tripanocida com o ácido anacárdico 15:0 mostrando resultados prévios potenciais (ALVES, 2018).

Nesse contexto, o presente estudo foi desenvolvido em um esquema metodológico de atividade tripanocida com a infusão da folha do cajueiro; a amentoflavona, biflavonoide presente na folha do cajueiro (ARYA *et al.*, 1989; CHAVES *et al.*, 2010; KONAN, NZI ANDRÉ; BACCHI, 2007) e com outras substâncias de interesse como o ácido anacárdico saturado 15:0 (AA0).

### 1.1 Infusão da folha de cajueiro

A infusão é considerada uma técnica de extração de plantas, comumente usada para o preparo de “chás” de plantas medicinais, usando a água à temperatura de ebulição como solvente, vertendo sobre o material vegetal e então, colocando em repouso, abafado, até ficar em temperatura ambiente (BITU *et al.*, 2015).

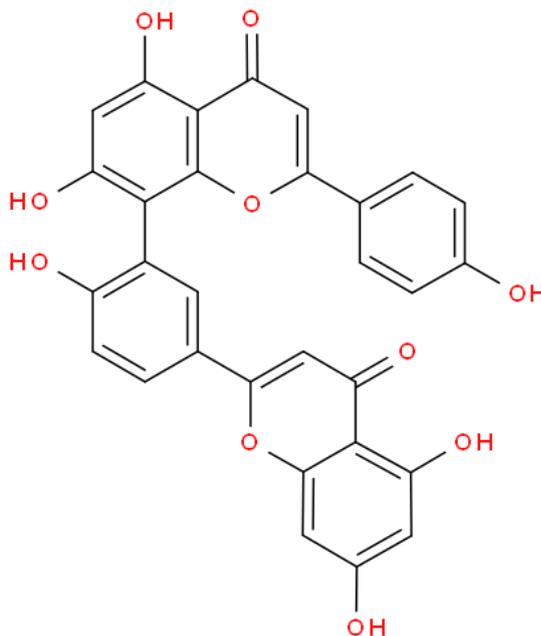
É muito comum o uso de decocção ou infusão, extratos alcoólicos ou hidroalcoólicos de plantas medicinais pela população brasileira. Estudos demonstraram que o efeito cardiovascular estudado sobre a pressão arterial de coelhos, foi reduzido significativamente (89%) pelo extrato aquoso de folhas de cajueiro. Outro ensaio dos extratos aquosos das folhas relataram a inibição *in vitro* de 25% do rotavírus humano e 84,5% de rotavírus símio (KONAN, NZI ANDRÉ; BACCHI, 2007). A infusão da folha de cajueiro apresentou atividade antimicrobiana frente a bactéria *Streptococcus mutans*, de forma dependente ao horário de coleta das folhas (ALVES, 2011).

Na folha do cajueiro pode-se encontrar diversos componentes químicos como flavonoides (amentoflavona, quercetina, agatisflavona, quercetina 3-O-ramnosideo) e ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico) (ARYA *et al.*, 1989; CHAN *et al.*, 2017; CHAVES *et al.*, 2010; KONAN, NZI ANDRÉ; BACCHI, 2007).

## 1.2 Amentoflavona

A amentoflavona é um biflavonoide (Figura 8) obtido por acoplamento oxidativo de duas moléculas de apigenina, resultando em uma ligação entre as posições C-3 do anel de hidroxifenila e C-8 do anel de cromeno, é um produto natural encontrado nas folhas do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*), no *Ginkgo biloba* e no *Hypericum perforatum*.

Figura 8 - Estrutura química bidimensional da amentoflavona



Fonte: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=4444919>

Amentoflavona apresenta diversas atividades biológicas, como antiviral (COULERIE *et al.*, 2013), antifúngica (NASCIMENTO *et al.*, 2018), antioxidante (SAKTHIVEL; GURUVAYOORAPPAN, 2013) e anti-inflamatória (OH *et al.*, 2013)

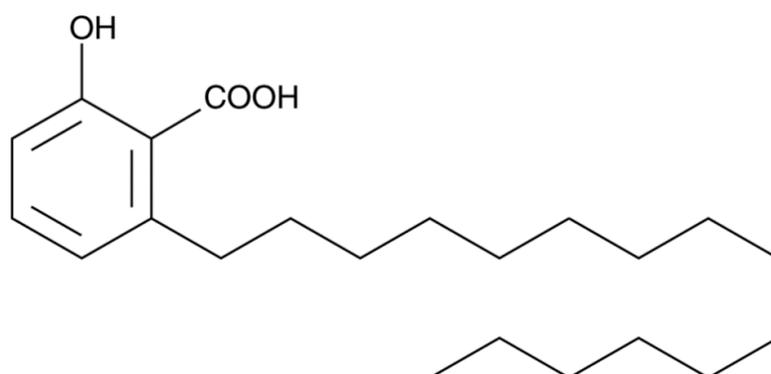
e ainda, apontado como promissor no desenvolvimento de drogas contra a dengue (COULERIE *et al.*, 2013).

### 1.3 Ácido Anacárdico

O segundo produto principal do cajueiro é o líquido da casca da castanha de caju (LCC), constituído basicamente de ácidos anacárdicos, cardanóis e cardóis.

O ácido anacárdico (AA) é um lipídio fenólico, consistindo em um ácido salicílico substituído por uma cadeia alquílica com 15 carbonos (Figura 9). A cadeia alquila pode ser saturada (AA0) ou insaturada (monoeno, dieno ou trieno) (HAMAD; MUBOFU, 2015; MORAIS *et al.*, 2017; TYMAN, 1973).

Figura 9 - Estrutura química do Ácido 2-hidroxi-6-pentadecil-benzóico (AA0)



Fonte: <https://www.caymanchem.com/product/13144/anacardic-acid>

Várias atividades biológicas de AA foram relatadas: antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antitumoral, antiparasitária, moluscicida, larvicida e inseticida (HEMSHEKHAR *et al.*, 2012; KUBO *et al.*, 2006; MENDES; OLIVEIRA, 1990; OLIVEIRA, MICHELINE SOARES COSTA *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2012).

Devido à sua alta capacidade de inibição da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (TcGAPDH), fundamental no ciclo evolutivo do *T. cruzi*, o AA tem sido estudado como um promissor fármaco tripanocida (HAMAD; MUBOFU, 2015). A enzima TcGAPDH, ainda não foi co-cristalizada com AA e os detalhes de seu mecanismo de interação com o sítio ativo da enzima não estão bem elucidados. Dessa forma, no presente trabalho foi realizado um estudo *in silico* do

ácido anacárdico nos principais alvos envolvidos no ciclo evolutivo do *T. cruzi* e *in vitro* nas formas evolutivas tripomastigotas e amastigotas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito tripanocida de substâncias presentes no cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) sobre as formas evolutivas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, em uma abordagem experimental.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a citotoxicidade *in vitro* da infusão da folha de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) sobre células hospedeiras;
- Avaliar o efeito *in vitro* da infusão da folha de *Anacardium occidentale L.* (cajueiro) sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*;
- Avaliar o efeito *in vitro* do ácido anacárdico sobre formas amastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*;
- Investigar mecanismo de morte celular das formas epimastigotas tratadas com ácido anacárdico;
- Analisar as alterações estruturais induzidas pelo ácido anacárdico nas formas epimastigotas de *T. cruzi*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

O ácido anacárdico foi obtido da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha), armazenado segundo orientações do fabricante. A substância foi diluída na concentração de 40 mM em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. As soluções de trabalho foram preparadas por diluição seriada em PBS estéril (solução salina tamponada com fosfato, constituída de NaCl 17Mm; KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM; pH 7,4). A concentração final de DMSO nos experimentos foi de 0,5%.

O benzonidazol (BZ) (C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>, PM = 260,249 g/mol), usado como referência, foi gentilmente cedido pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE).

As folhas de *Anacardium occidentale L.* foram coletadas no estado do Ceará, município de Fortaleza, no mês de maio de 2017. O cajueiro utilizado para coleta das folhas, foi registrado por Marcelo Freire Moro (código 43936) no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará. As folhas foram coletadas no horário das 18h.

#### 3.2 Obtenção da infusão da folha de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*)

A infusão é considerada uma técnica de extração de plantas, comumente usada para o preparo de “chás” de plantas medicinais, usando a água à temperatura de ebulição como solvente, vertendo sobre o material vegetal e então, deixado em repouso, abafado, até ficar em temperatura ambiente (BITU *et al.*, 2015).

As folhas foram coletadas, lavadas, secas à sombra por 72 horas, depois picotadas e pesadas. Para cada 10 g de folha, foi adicionado 100 mL de água destilada a 100°C (SHENY; MATHEW; PHILIP, 2011). Ficou em infusão por 10 minutos, depois foi filtrada em papel de filtro e ficou reservada até esfriar. Em seguida, foi levada ao congelador -80°C e depois foi liofilizada. A solução estoque da infusão foi preparada a 18000 µg/mL em PBS e mantida a 4°C até ser utilizada.

### **3.3 Avaliação do potencial tripanocida *in vitro* em cepas Y de *T. cruzi* de substâncias presentes no cajueiro**

Buscando investigar a atividade antiparasitária da infusão da folha de cajueiro, foram realizados ensaios nas três principais formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas e do ácido anacárdico nas formas amastigotas.

#### **3.3.1 Avaliação da citotoxicidade da infusão da folha de cajueiro nas células hospedeiras LLC-MK2**

A atividade citotóxica da infusão sobre células de mamíferos foi realizada na linhagem LLC-MK2 (células epiteliais renais de macaco), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em placas estéreis de 96 poços na concentração de  $10^5$  céls/mL em meio DMEM a 10% de SBF, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/L) a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Para determinar a viabilidade celular, foi realizado o ensaio do MTT (MOSMANN, 1983), que verifica a capacidade oxirredutiva das células. Para isso, foram tratadas com diferentes concentrações de infusão (1800; 900; 450; 225; 112,5; 56,25 e 28,12 µg/mL) e incubadas a 37°C durante 24 horas. O MTT (5 mg/ml em PBS) foi adicionado a cada poço e as placas foram deixadas em repouso no escuro por 4 h a 37°C. Finalmente, os cristais de formazan formados foram solubilizados em 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) em 0,01 N de HCl. Após 17 h, leu-se a absorbância a 570 nm num leitor de microplacas (Biochrom® ASYS Expert Plus). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

O percentual de viabilidade celular foi calculado em comparação com o grupo controle de células não tratadas. A IC<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) foi determinada por regressão não linear. A toxicidade das substâncias sobre as LLC-MK2 serviu como base para definir as concentrações usadas nos ensaios *in vitro* e para estimar o índice de seletividade (IS) das respectivas substâncias através da relação entre a toxicidade na célula hospedeira e a toxicidade no parasito (NWAKA; HUDSON, 2006).

### 3.3.2 Efeito da infusão da folha de cajueiro em formas epimastigotas de *T. cruzi*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (RODRIGUES *et al.*, 2014), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/L) e mantidas em incubadora BOD a 28 °C. Para avaliação do efeito antiproliferativo da infusão nestas formas, foram utilizados parasitos provenientes da fase exponencial da cultura inicial.

Formas epimastigotas ( $1 \times 10^6$  céls/mL) na fase *log* de crescimento (ADADE *et al.*, 2014) foram plaqueadas e incubadas em placas de 96 poços com diferentes concentrações da infusão (225; 112,5; 56,25; 28,12 e 14,06 µg/mL). Após os tempos de 24, 48 e 72 horas, foram realizadas as quantificações de células viáveis em câmara de Neubauer (RODRIGUES *et al.*, 2014). Como controle negativo foram utilizadas células tratadas com PBS estéril. O percentual de viabilidade celular foi calculado em relação ao grupo controle negativo. A IC<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) foi determinada por regressão não linear. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

### 3.3.3 Efeito da infusão da folha de cajueiro em formas tripomastigotas de *T. cruzi*

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir da infecção de cultura de células epiteliais de rim de macaco (LLC-MK2) cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) enriquecido com 2% de Soro Bovino Fetal (SBF). Após 5 a 8 dias de infecção, o sobrenadante contendo as formas tripomastigotas que eclodiram, foi centrifugado e ressuspenso na concentração de  $10^6$  céls/mL. Depois, os tripomastigotas foram incubados em placas de 96 poços estéreis e tratados com diferentes concentrações da infusão (1800; 900; 450; 225; 112,5; 56,25 e 28,12 µg/mL) e BZ (260; 130; 65; 32,5; 16,25; 8,12; 4,06; 2,03; 1,01 µg/mL). Como controle negativo consideramos as células tratadas com PBS estéril (pH 7.4) (MEIRA *et al.*, 2015).

A viabilidade foi determinada após 24h de incubação, em ambiente em condições de 5% CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C, por quantificação em câmara de Neubauer. O percentual de viabilidade celular foi calculado em comparação com o grupo controle negativo. A IC<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir 50% do crescimento

celular) foi determinada por regressão não linear. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

### **3.3.4 Efeito da infusão da folha de cajueiro e do ácido anacárdico em formas amastigotas de *T. cruzi***

Para avaliar o efeito da infusão e do ácido anacárdico na forma amastigota, células LLC-MK<sub>2</sub> foram incubadas ( $10^5$  células/ml) em placas estéreis com 24 poços (Sigma-Aldrich), contendo lamínulas circulares também estéreis em meio DMEM e suplementação de SBF 10% em temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 h, as culturas com células aderidas foram infectadas com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* na proporção de 20:1 e mantidas sob mesmas condições em meio DMEM com suplementação de apenas 2% de SBF.

Após o período de 48h de infecção, para que houvesse internalização dos parasitos e transformação em formas amastigotas intracelulares, o sobrenadante foi desprezado e as culturas foram tratadas com infusão (4,095 mg/mL), ácido anacárdico (68,7 µM) ou BZ (257µM) em suas respectivas IC<sub>50</sub> das formas tripomastigotas. Como tratamento do controle negativo, foi utilizado o PBS.

As placas foram, então, incubadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> e em seguida, as lamínulas foram lavadas e fixadas em solução de Bouin. Após lavagem com água destilada e etanol 70%, foram coradas com Giemsa (5% v/v diluído em água deionizada) por 20 minutos. As lâminas foram lavadas novamente e após secagem, foram montadas em lâminas (ADADE *et al.*, 2014).

Para determinar o número de amastigotas/100 células foi realizada contagem em microscópio óptico de um total de 100 células em cada lamínula por experimento (BANDEIRA *et al.*, 2017).

### **3.3.5 Investigação do mecanismo de morte das formas epimastigotas tratadas com ácido anacárdico**

#### **3.3.5.1 Efeito necrótico e/ou apoptótico em formas epimastigotas de *T. cruzi***

Para investigar o potencial necrótico e/ou apoptótico do ácido anacárdico, foram utilizados a Anexina V-PE (marcador de apoptose por externalização da fosfatidilserina) e o 7-AAD (marcador de necrose por lesão da membrana plasmática).

As formas epimastigotas ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram plaqueadas e tratadas com o ácido anacárdico na concentração de  $68,7 \mu\text{M}$ , caracterizando a metade da sua IC50. As formas epimastigotas foram então, incubadas por 24 horas em placa de 24 poços em estufa BOD a  $28^\circ\text{C}$ . Após esse período de incubação, as culturas foram lavadas e marcadas com o conjugado de Anexina V-PE e 7-AAD (Sigma-Aldrich). Após 15 minutos de incubação (protegido da luz), os parasitos foram analisados por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson). Células tratadas com PBS foram usadas como controle negativo (BANDEIRA LIMA *et al.*, 2017).

#### 3.3.5.2 Avaliação de espécies reativas de oxigênio (EROS)

Na análise das espécies reativas de oxigênio, utilizou-se o marcador DCF (2',7'-diclorofluoresceína), que apresenta um elevado rendimento quântico de fluorescência, sendo a fluorescência observada proporcionalmente à produção de EROS. As formas epimastigotas ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram plaqueadas e tratadas com o ácido anacárdico na concentração de  $68,7 \mu\text{M}$ , caracterizando a metade da sua IC50. Foram incubadas por 24 horas em estufa BOD a  $28^\circ\text{C}$ . Após o período de 24 horas, as células foram lavadas e marcadas com DCF por 30 minutos, protegido da luz. Ao final desse período, foram novamente lavadas e resuspensas para análise no citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson). Para cada uma das amostras foram considerados pelo menos dez mil eventos. Células tratadas com PBS foram usadas como controle negativo (BANDEIRA *et al.*, 2017).

#### 3.3.5.3 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Para investigar o potencial transmembrânico mitocondrial foi utilizado o marcador Rodamina 123 (Sigma-Aldrich), um corante catiônico que se acumula em mitocôndrias intactas (livres de danos), emitindo fluorescência vermelha. O acúmulo de marcador pode ser reduzido no caso de alterações no potencial transmembrânico (BARACCA *et al.*, 2003). As formas epimastigotas ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram plaqueadas e tratadas com o ácido anacárdico na concentração de  $68,7 \mu\text{M}$ ,

incubadas por 24 horas em estufa BOD a 28° C. Após as 24 horas, as células foram lavadas e marcadas com 10 µg/mL de rodamina por 30 minutos, protegido da luz. Logo após esse período as células foram lavadas e analisadas por citometria de fluxo, sendo considerados pelo menos dez mil eventos para cada amostra (MELLO *et al.*, 2017).

#### 3.3.5.4 Avaliação da tumefação de reservossomos

Para investigar o mecanismo de morte por autofagia, utilizou-se o marcador laranja de acridina, o qual permite visualizar organelas vesiculares ácidas, por ser um marcador acidotrópico. Será emitida uma fluorescência verde ao penetrar a célula, ou vermelha caso fique retido em organelas ácidas, característica de fagossomo. As formas epimastigotas ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram plaqueadas e tratadas com o ácido anacárdico na concentração de 68,7 µM, incubadas por 24 horas em estufa BOD a 28° C. Após as 24 horas, as células foram lavadas e marcadas com 5 µg/mL de laranja de acridina por 30 minutos, protegido da luz. O PBS foi utilizado como controle negativo (SANDES *et al.*, 2014). Após esse período, as células foram lavadas e analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson).

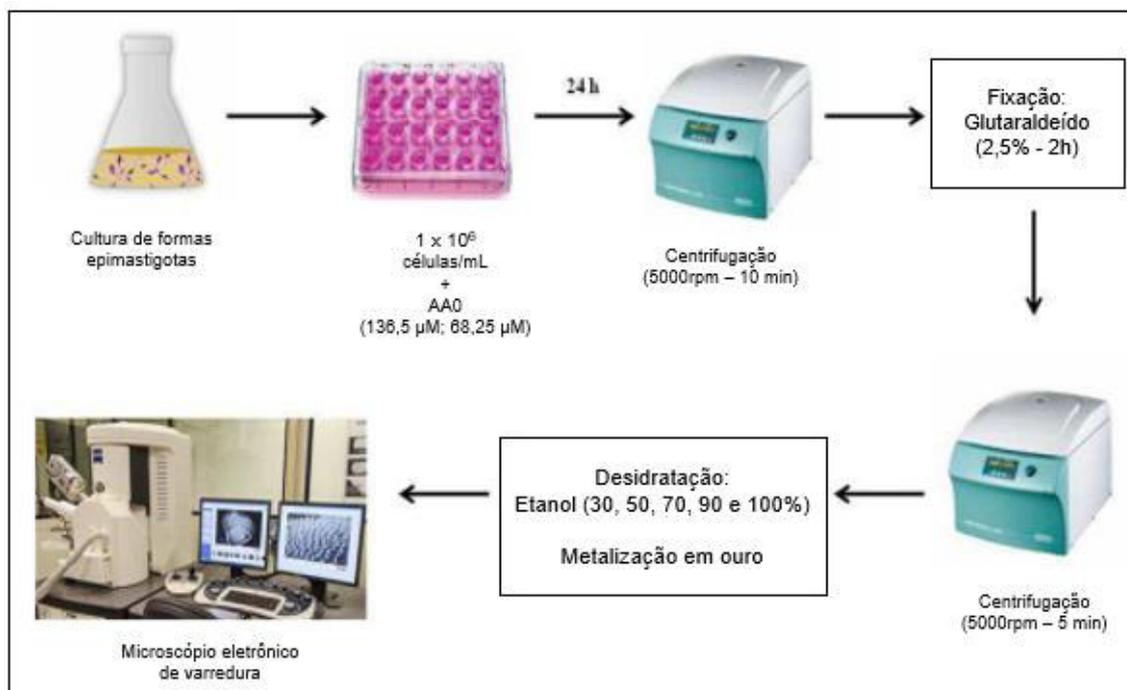
#### **3.3.6 Avaliação de alterações morfológicas ultraestruturais por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Alterações na superfície das formas epimastigotas causadas pelo ácido anacárdico foram observadas por microscopia eletrônica de varredura.

As formas epimastigotas foram tratadas com ácido anacárdico (68,7 µM), sendo incubadas por 24 horas em placas de 24 poços em estufa BOD a 28° C. Após esse período de incubação, os parasitos foram fixados com Glutaraldeído 2,5% por 2 horas. Foram realizadas lavagens com PBS (2 vezes) e água destilada (2 vezes), com centrifugações a 5000 rpm por 10 minutos. Logo em seguida, as amostras foram desidratadas utilizando uma série crescente de concentração de etanol (30 – 100%), colocadas em lamínulas de vidro (13mm), fixadas com 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. As lamínulas foram levadas à Central Analítica da Universidade Federal do Ceará para metalização com ouro e análises no microscópio eletrônico de varredura FEG Quanta 450 (FEI, Oregon, USA) (MELLO *et al.*, 2017), sendo as imagens digitais adquiridas e

armazenadas em computador na Central Analítica – UFC utilizando o Software Nis 4.0. A metodologia é descrita de forma resumida conforme figura 10.

Figura 10 - Processamento de formas epimastigotas do *T. cruzi* tratadas com ácido anacárdico por microscopia eletrônica de varredura



Fonte: Adaptado de (SOUZA, 2017).

### 3.3.7 Análise de dados

Os ensaios foram realizados em triplicada de três experimentos independentes. Os resultados obtidos foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e os valores de  $IC_{50}$  determinadas por regressão não linear com intervalo de confiança 95%. Comparações estatísticas foram analisadas utilizando ANOVA com *Bonferroni's post-test* no programa *GraphPad Prism 5*.

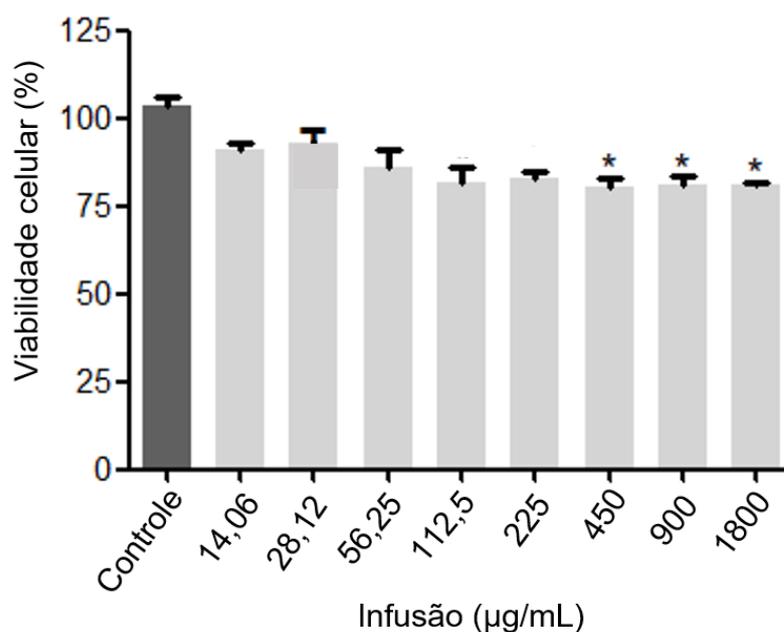
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* em cepas Y de *T. cruzi*

#### 4.1.1 Avaliação da citotoxicidade da infusão nas células hospedeiras

A citotoxicidade da infusão foi avaliada em células tubulares renais LLC-MK2, após 24 horas de exposição a diferentes concentrações em  $\mu\text{g/mL}$  (1800; 900; 450; 225; 112,5; 56,25; 28,12; 14,06) (Figura 11). No ensaio com o MTT, o qual detecta viabilidade celular com base no metabolismo oxidativo, foi possível calcular a  $\text{IC}_{50}$  da infusão no valor de 3610  $\mu\text{g/mL}$  (extrapolação), que foi calculada em relação ao controle negativo, cuja absorbância foi considerada 100%.

Figura 11 - Efeito citotóxico da infusão sobre as células LLC-MK2



Fonte: Elaborada pela autora

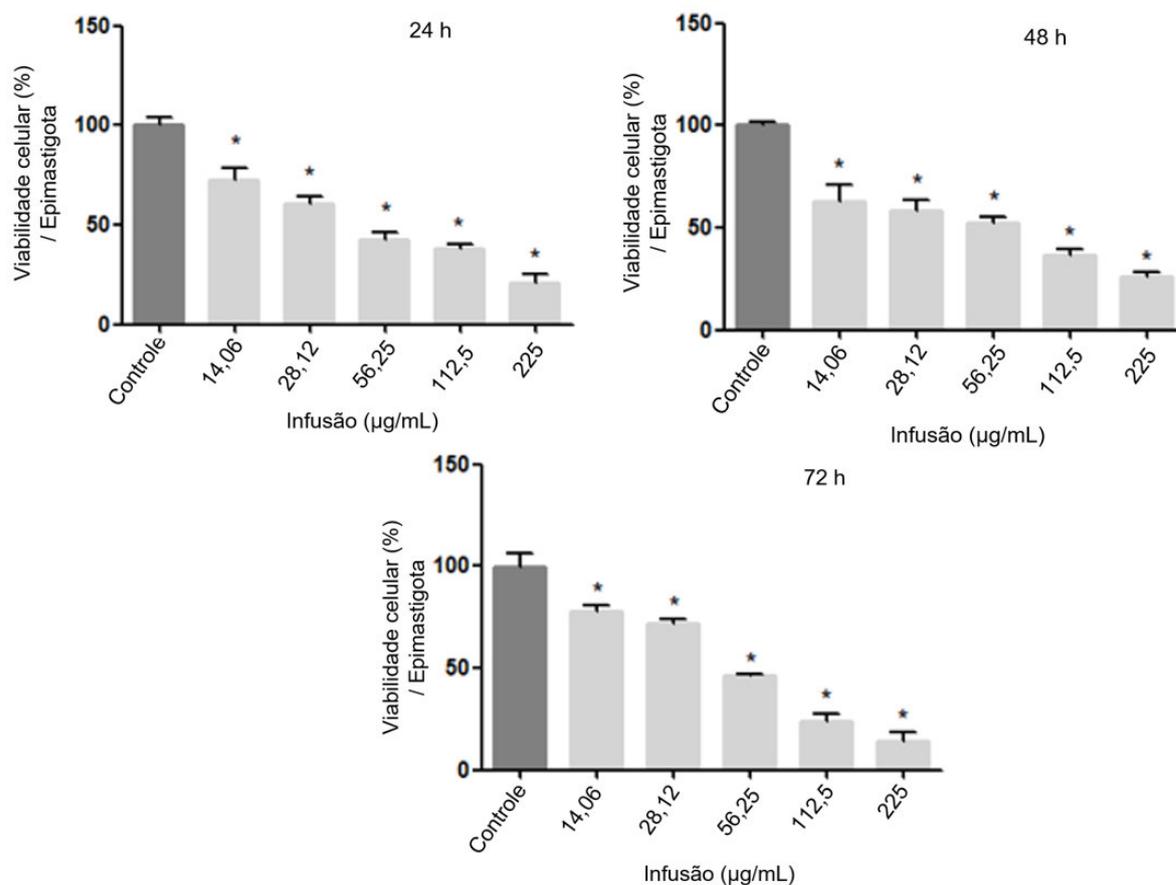
A infusão apresentou baixa toxicidade nas maiores concentrações frente às células tubulares renais LLC-MK2. Tal resultado da infusão, também foi encontrado no teste de citotoxicidade frente as células de neutrófilos humanos, numa investigação de atividade antimicrobiana (ALVES, 2011).

Estudos de citotoxicidade do extrato etanólico de folhas de cajueiro, realizados em outros tipos de células (células tumorais de leucemia linfoblástica

humana) em ratos mostrou também, baixa citotoxicidade, sugerindo que a agatisflavona, composto ativo majoritário do extrato, tem um bom potencial para ser usado em terapia. Flavonoides como a agatisflavona, amentoflavona, quercetina, são encontrados nas folhas do *Anacardium occidentale* (cajueiro) (ARYA *et al.*, 1989; CHAN *et al.*, 2017; CHAVES *et al.*, 2010). A proliferação de células mostrou inibição de forma dependente da concentração com inibição máxima de 96% nas células tratadas com  $250\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extrato etanólico de folhas de cajueiro (KONAN *et al.*, 2012).

#### **4.1.2 Ensaio em formas epimastigotas de *T. cruzi***

Após o ensaio de citotoxicidade foram determinadas as concentrações para os ensaios com as formas evolutivas do *T. cruzi*. As formas epimastigotas foram tratadas com a infusão da folha de cajueiro após 24, 48 e 72 horas (Figura 12) de exposição a diferentes concentrações (225; 112,5; 56,25; 28,12; 14,06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A quantificação foi feita em câmara de Neubauer para os períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas. A percentagem de viabilidade celular foi calculada em relação ao controle, cuja quantificação foi considerada 100%.

Figura 12 - Efeito da infusão sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: As figuras representam o tratamento por 24 horas, 48 horas e 72 horas. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de *Bonferroni's*. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Os valores das respectivas  $IC_{50}$  encontradas, estão dispostas na tabela 1.

Tabela 1 - Efeito da infusão sobre formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi*

	24h	48h	72h
$IC_{50}$ infusão	54,6 $\pm$ 0,4	54,9 $\pm$ 3	56,37 $\pm$ 2

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Valores de  $IC_{50}$  são expressos em µg/mL. Dados são expressos por média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes.

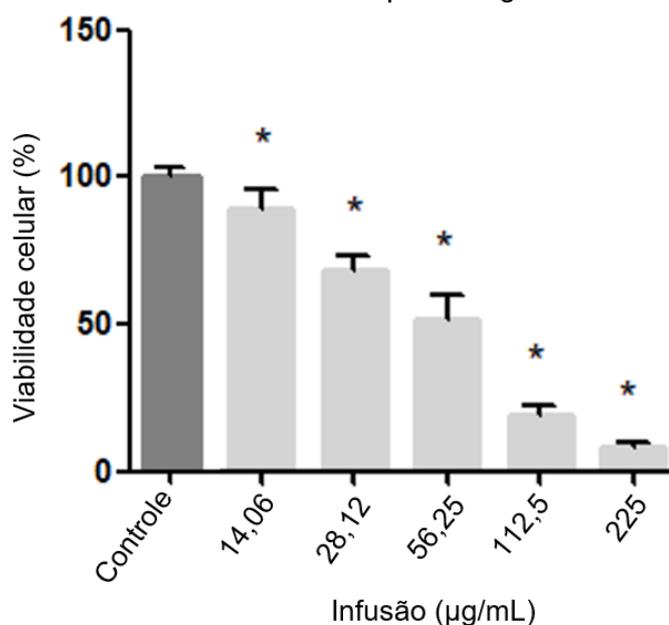
Os resultados mostraram que não houve diferença estatística entre os tempos de 24, 48 e 72h quando os epimastigotas foram tratados com a infusão da folha de cajueiro. A infusão está inibindo a proliferação, ou seja, está causando um efeito antiproliferativo nas formas epimastigotas, posto que as mesmas proliferam sozinhas, esses resultados são muito promissores.

Outros extratos vegetais como o extrato etanólico de *Piper arboreum* (fração hexânica) apresentou atividade tripanocida frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* (FIGUEREDO *et al.*, 2014); assim como o extrato aquoso das folhas de *Neurolaena lobata* após 48 h de incubação (BERGER *et al.*, 1998).

#### 4.1.3 Ensaio em formas tripomastigotas de *T. cruzi*

As formas tripomastigotas quando tratadas com a infusão após 24 horas de exposição a diferentes concentrações (225; 112,5; 56,25; 28,12; 14,06  $\mu\text{g/mL}$ ). A quantificação foi feita em câmaras de Neubauer após 24 horas de incubação. A viabilidade celular foi calculada em relação ao controle, cuja quantificação foi considerada 100% (Figura 13).

Figura 13 - Efeito da infusão sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*



Fonte: Elaborada pela autora

O valor de  $\text{IC}_{50}$  calculado foi de  $47,6 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ .

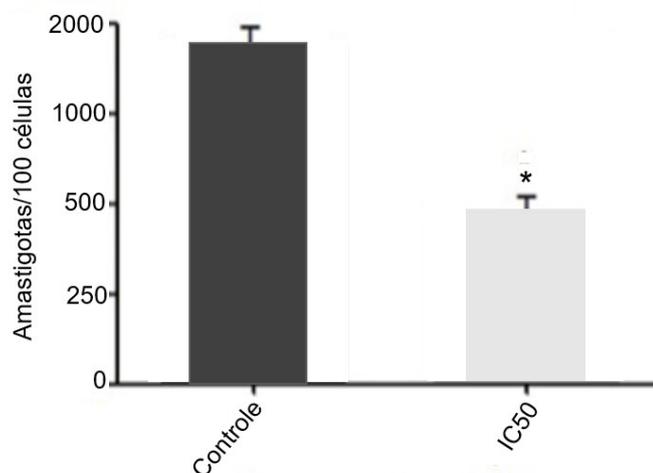
Outros extratos vegetais demonstraram efeito tripanocida, como o extrato das raízes de *T. sillamontana* frente à forma tripomastigota do *T. cruzi* (ESTEVAM, 2016).

#### 4.1.4 Efeito da infusão sobre formas amastigotas de *T. cruzi*

O efeito anti-amastigota da infusão foi analisado em lâminas com células LLC-MK2 infectadas com *T. cruzi*. Foram realizados ensaios em 24h utilizando a IC<sub>50</sub> das formas tripomastigotas (47,6 µg/mL). O parâmetro avaliado foi o número de amastigotas por 100 células.

A infusão demonstrou diminuição aproximada de 50% no número de amastigotas/100 células no tempo de 24 horas (Figura 14).

Figura 14 - Efeito da infusão sobre células LLC-MK2 infectadas com a forma amastigota intracelular de cepa Y de *T. cruzi*.

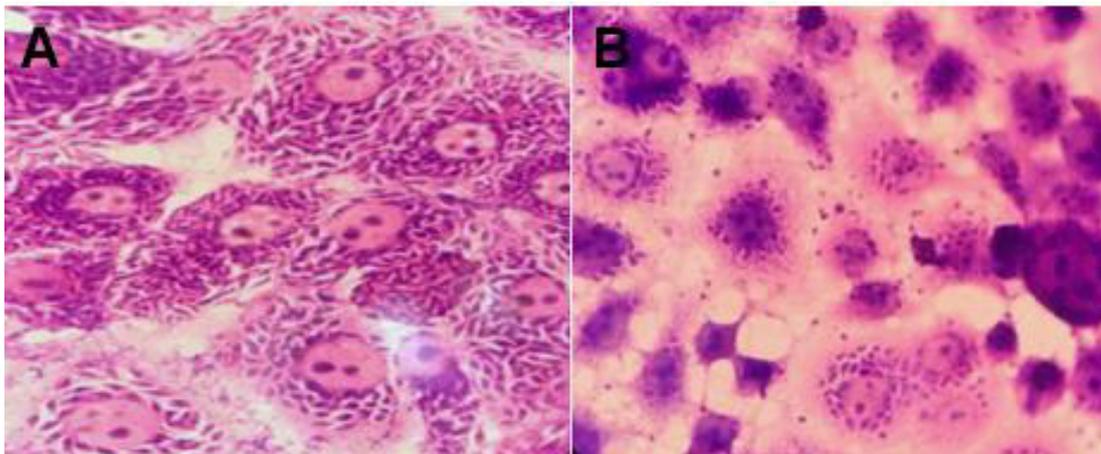


Legenda: Amastigotas por 100 células em células tratadas com infusão após 24h de incubação. O gráfico representa a média ± E.P.M, de experimentos independentes (n= 3). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste de Bonferroni, com \* $p < 0,05$ .

Fonte: Elaborada pela autora

Análises de microscopia óptica confirmaram que a infusão reduziu, significativamente, a infecção celular (Figura 15).

Figura 15 - Fotomicrografia de células LLC-MK2 infectadas com formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y



Legenda: Microscopia óptica das células LLC-MK2, infectadas por *T. cruzi* (A – grupo controle; B – células tratadas com infusão 4,95 mg/ml).

Fonte: Da pesquisa

É muito comum o uso de decocção ou infusão, extratos alcoólicos ou hidroalcoólicos de plantas medicinais pela população brasileira. Estudos demonstraram que o efeito cardiovascular estudado sobre a pressão arterial de coelhos, foi reduzido significativamente (89%) pelo extrato aquoso de folhas de cajueiro. Outro ensaio dos extratos aquosos das folhas relataram a inibição *in vitro* de 25% do rotavírus humano e 84,5% de rotavírus símio (KONAN, NZI ANDRÉ; BACCHI, 2007). A infusão da folha de cajueiro apresentou atividade antimicrobiana frente a bactéria *Streptococcus mutans*, de forma dependente ao horário de coleta das folhas (ALVES, 2011).

Vale ressaltar que os produtos naturais são fontes potencialmente ativas contra protozoários, sendo objeto de investigação há muitos anos (SALEM; WERBOVETZ, 2006). Estudo do extrato etanólico das folhas de *Caesaria sylvestris* demonstrou atividade antitripanosomal e antileishmanicida (MESQUITA *et al.*, 2005). Estudos no México demonstraram alto potencial tripanocida de extratos metanólicos de plantas usadas na medicina popular regional (MOLINA-GARZA *et al.*, 2014).

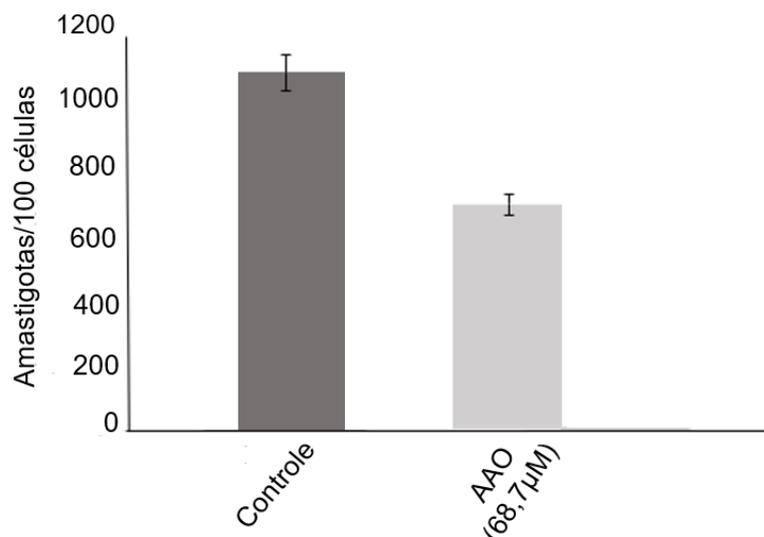
#### 4.1.5 Efeito do ácido anacárdico sobre formas amastigotas de *T. cruzi*

O efeito anti-amastigota do ácido anacárdico foi analisado em lâminas com células LLC-MK2 infectadas com *T. cruzi*. Foram realizados ensaios num período de

24h utilizando a IC<sub>50</sub> das formas tripomastigotas (68,7 µM) (ALVES, 2018). O parâmetro avaliado foi o número de amastigotas por 100 células.

O ácido anacárdico demonstrou diminuição superior a 50% no número de amastigotas/100 células no tempo de 24 horas (Figura 16).

Figura 16 - Efeito do ácido anacárdico sobre células LLC-MK2 infectadas com a forma amastigota intracelular de cepa Y de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Amastigotas por 100 células em células tratadas com ácido anacárdico após 24h de incubação. O gráfico representa a média ± E.P.M, de experimentos independentes (n= 3). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste de Bonferroni, com \* $p < 0,05$ .

O ácido anacárdico tem mostrado potencial tripanocida *in silico* em um dos alvos enzimáticos importantes no ciclo evolutivo do *T. cruzi*, a TcGAPDH (DIAS; DESSOY, 2009). Todas as formas de AA (cadeia alquílica saturada ou insaturada) mostram efeito inibitório sobre TcGAPDH, enzima fundamental no ciclo evolutivo do *T. cruzi*, no entanto, a forma com a cadeia alquílica saturada mostra os maiores efeitos (FREITAS *et al.*, 2009), indicando o ácido anacárdico como uma alternativa farmacológica no tratamento da doença de Chagas.

#### 4.1.6 Avaliação do perfil de morte celular do ácido anacárdico nas formas epimastigotas

A morte celular pode acontecer por diversas vias, com características morfológicas extremamente diferentes, acontecendo tanto por resposta a estímulos patológicos ou como parte da homeostase de um tecido ou população celular, definindo como morte celular programada esse conjunto de processos (DOONAN; COTTER, 2008).

Dentre os diversos subtipos de morte celular programada, podemos destacar a autofagia e apoptose, com papel fundamental no efeito citotóxico de compostos bioativos e no processo de homeostase da célula. Como diferenças entre alterações fenotípicas observadas nos diversos mecanismos.

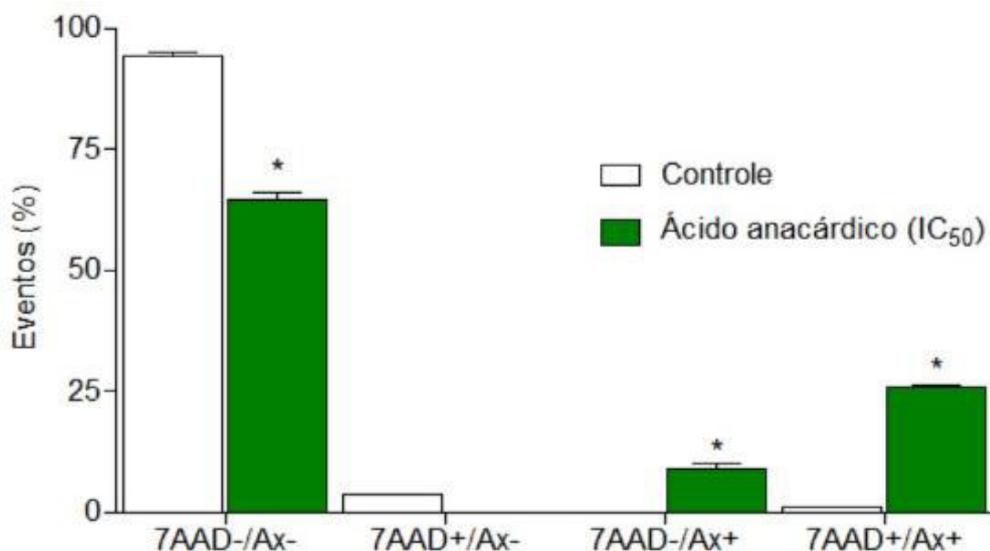
Dessa forma, buscou-se investigar o efeito do ácido anacárdico nas formas epimastigotas quanto aos diversos mecanismos de morte celular usando a concentração referente a IC<sub>50</sub> em epimastigotas, igual a 136,5 µM, previamente obtido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (ALVES, 2018). Os resultados mostram um possível mecanismo de morte celular por apoptose tardia, necessitando uma pesquisa mais aprofundada com outras técnicas, como por exemplo a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), para confirmação do tipo de mecanismo.

#### 4.1.6.1 Efeito necrótico e/ou apoptótico em formas epimastigotas de *T. cruzi*

A necrose ou morte celular citoplasmática caracteriza-se pelo aumento do volume celular, dilatação da mitocôndria, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, sendo comprovada de forma clássica pelo extravasamento do conteúdo intracelular e vacuolização citoplasmática (JAIN, 2013; SOUZA, 2017). Considerada um mecanismo controlado de morte celular, a apoptose caracteriza-se pela ausência de lise celular, causando fragmentação nuclear pela redução do volume celular e formação de *blebbing* (estruturas em formas de bolhas na membrana plasmática) (SOUZA, 2017).

A figura 17 mostra o efeito da ácido anacárdico sobre a marcação da anexina e da dupla marcação, indicando um possível mecanismo por apoptose.

Figura 17 - Perfil de morte em formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 h de tratamento com ácido anacárdico.



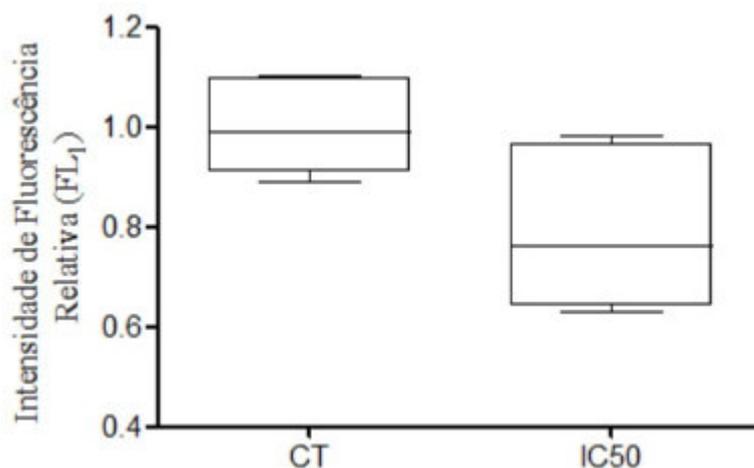
Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Perfil de morte em formas epimastigotas após 24 h de tratamento com o ácido anacárdico, na concentração referente a IC<sub>50</sub> 136,5 µM. Os dados foram expressos como percentual de eventos ± EPM de três experimentos independentes e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Bonferroni (\*p < 0,05 vs. grupo controle). 7AAD- /AX- : células não marcadas; 7AAD+ /AX- : marcado com 7-amino actinomicina D; 7AAD- /Ax+ : marcados com anexina V; 7AAD+ /Ax+ : marcado com 7-AAD e Anexina V-PE). 0: Controle.

#### 4.1.6.2 Avaliação de espécies reativas de oxigênio (EROS)

Buscando investigar o papel das espécies reativas de oxigênio (EROS) no processo de morte celular, formas epimastigotas foram incubadas com DCF (2'-7' diclorodihidrofluoresceína diacetato), considerado um importante marcador do stress oxidativo celular (LAJKO, 2017). A concentração usada para o ácido anacárdico foi referente ao valor da IC<sub>50</sub> 136,5 µM (ALVES, 2018). Após 24 h de tratamento das formas epimastigotas, foi possível observar (Figura 18) que a concentração estudada do ácido anacárdico não foi capaz de liberar EROS.

Figura 18 - Análise de espécies reativas de oxigênio em formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com ácido anacárdico.



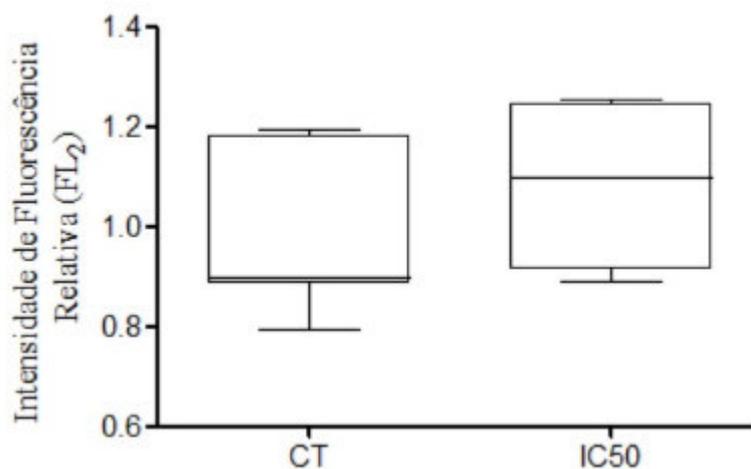
Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de *T. cruzi* com tratamento na concentração da IC<sub>50</sub> 136,5  $\mu$ M por 24 h. CT: Controle. Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência  $\pm$  erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Bonferroni ( $p < 0,05$  vs. grupo controle).

#### 4.1.6.3 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Com o intuito de investigar se o ácido anacárdico induz alteração no potencial mitocondrial em *T. cruzi*, foi utilizada a rodamina (Rho 123). Após 24 h de tratamento das formas epimastigotas com ácido anacárdico, foi possível observar (Figuras 19) e confirmar (Figura 20) que não houve alteração do potencial transmembrânico mitocondrial.

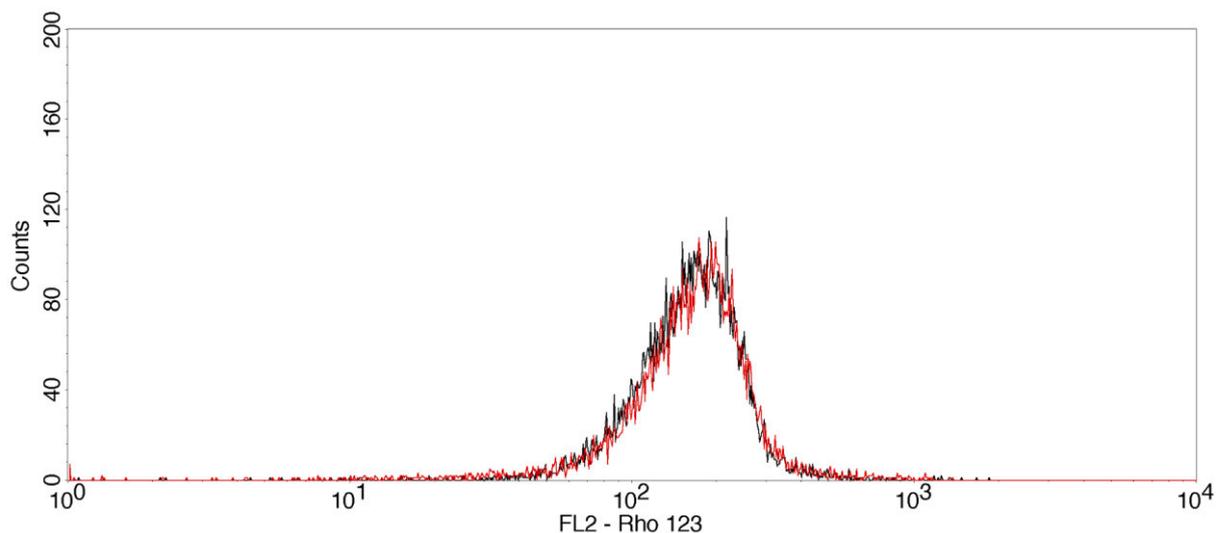
Figura 19 - Análise do  $\Delta\Psi_m$  de epimastigotas tratados com ácido anacárdico.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de *T. cruzi* com tratamento na concentração de 136,5  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência  $\pm$  erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Bonferroni ( $p < 0,05$  vs. grupo controle). 0: Controle (formas epimastigotas não tratadas). CT: Controle.

Figura 20 - Histograma de intensidade de marcação com Rho123 gerada pelo ácido anacárdico.



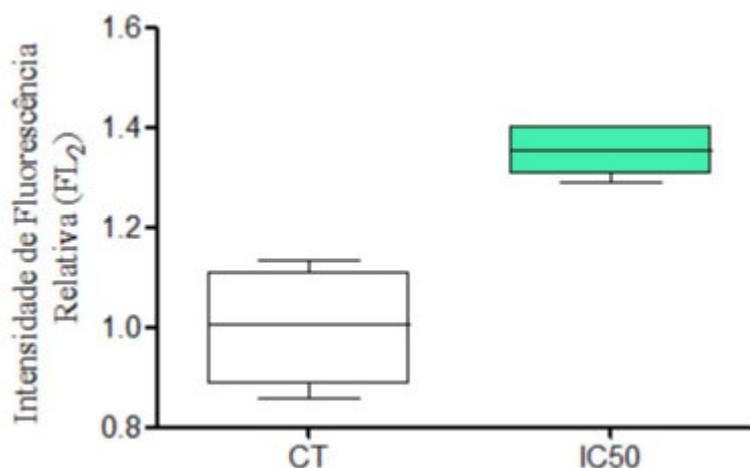
Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Rho123 = Rodamina 123. O pico de cor preta representa o controle; O pico vermelho representa a concentração de 136,5  $\mu\text{M}$  de ácido anacárdico.

#### 4.1.6.4 Investigação de tumefação dos reservossomos

O mecanismo de morte celular por autofagia é entendido como um processo de reciclagem, induzindo a formação do autolisossomo pela fusão da membrana externa do autofagossomo com a membrana do lisossomo. Os dados (Figuras 21 e 22) demonstraram alteração significativa de intensidade de marcação, inferindo um possível indício de autofagia do ácido anacárdico em formas epimastigotas.

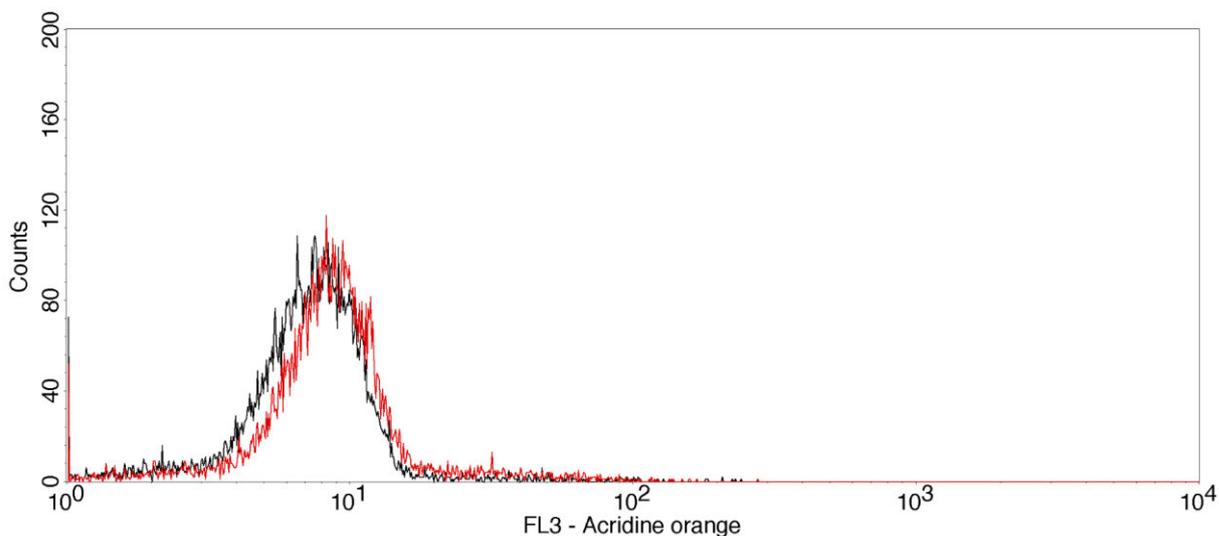
Figura 21 - Fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com ácido anacárdico.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Valores de fluorescência relativa do marcador laranja de acridina em formas epimastigotas de *T. cruzi* com tratamento na concentração de 136,5  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência  $\pm$  erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Bonferroni ( $p < 0,05$  vs. grupo controle). 0: Controle (formas epimastigotas não tratadas).

Figura 22 - Histograma representativo do sinal fluorescente de laranja de acridina do ácido anacárdico.



Fonte: Elaborada pela autora.

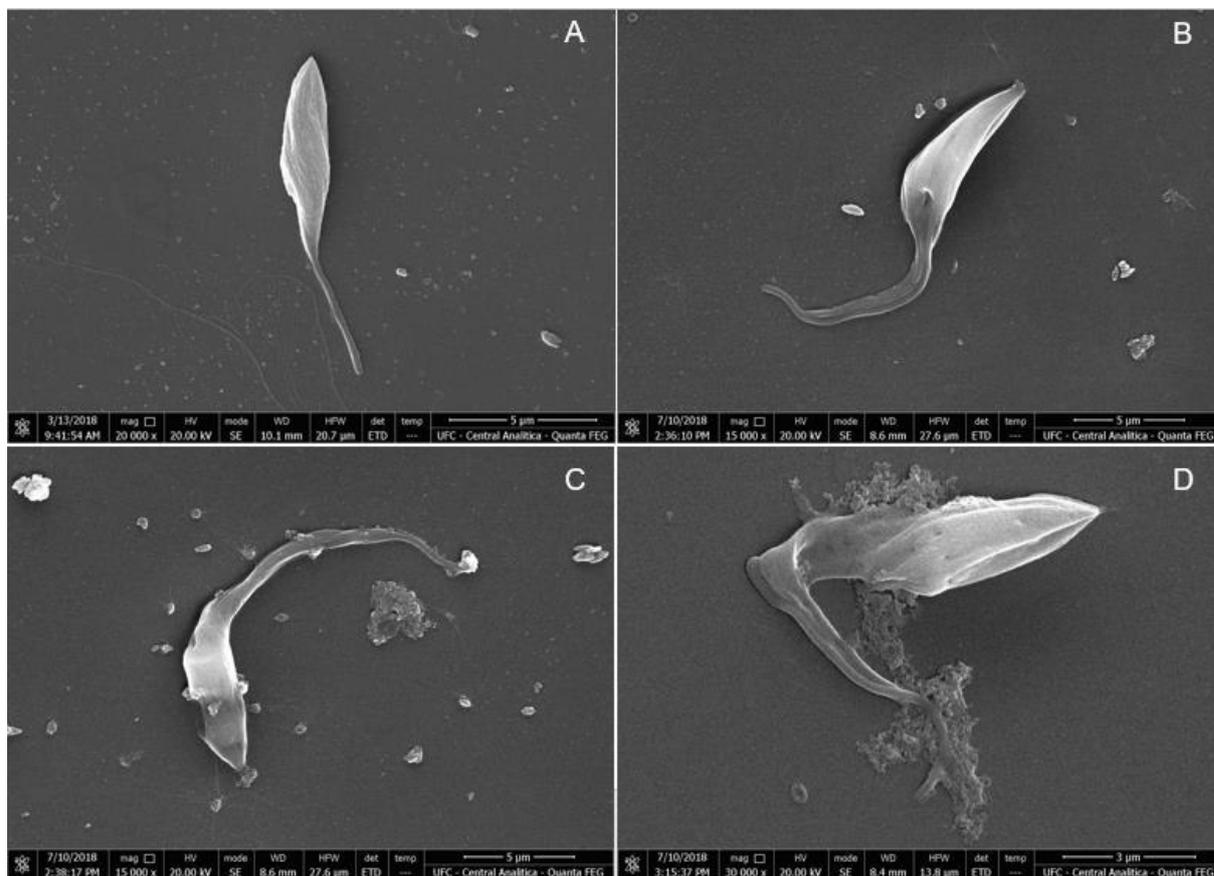
Legenda: O pico de cor preta representa o controle; O pico vermelho representa a concentração de 136,5 µM do ácido anacárdico.

Os resultados da fluorescência relativa mostraram um efeito significativo de marcação por laranja de acridina, mas o histograma mostrou um efeito muito sutil, sendo necessária a realização de métodos complementares para definição do mecanismo.

#### 4.1.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As formas epimastigotas após 24 horas de tratamento com ácido anacárdico (68,7 µM), foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Foram observadas alterações ultra estruturais nos parasitos expostos ao AA0, como aparecimento de poros na membrana celular e alterações em seu formato típico (Figura 23).

Figura 23 - Alterações ultraestruturais induzidas pelo ácido anacárdico em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: (A) grupo controle; (B) epimastigotas tratados com 68,25  $\mu\text{M}$  de AA0 ( $\text{IC}_{50}/2$ ); (C) epimastigotas tratados com 136,5  $\mu\text{M}$  de AA0 ( $\text{IC}_{50}$ ); (D) epimastigotas tratados com 273  $\mu\text{M}$  de AA0 ( $2 \times \text{IC}_{50}$ ).

Como apresentado, o ácido anacárdico apresentou efeito citotóxico sobre as formas amastigotas da cepa Y (cepa resistente ao benzonidazol) de *T. cruzi*.

## 5. CONCLUSÃO

A abordagem experimental (*in vitro*) do presente estudo demonstrou o efeito tripanocida da infusão da folha de cajueiro nas formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, com baixa toxicidade em células hospedeiras. Adicionalmente, o estudo demonstrou resultados promissores do ácido anacárdico nas formas amastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Dessa forma, a infusão da folha do cajueiro e o ácido anacárdico são promissores para o estudo e desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas.

## **SEÇÃO 3 –** **Abordagem Teórica**

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Alvos farmacológicos para desenvolvimento de fármacos antichagásicos

Historicamente, um número reduzido de pesquisadores tem se dedicado à busca de novas substâncias tripanocidas. As poucas substâncias selecionadas apresentaram limitações como baixa eficácia e toxicidade elevada, destacando os grupos das naftoquinonas, nitroimidazólicos, complexos de rutênio e diamindinas (CHATELAIN, 2015). Contudo, a pesquisa tem sido impulsionada por novas instituições, resultando após mais de 40 anos do desenvolvimento do benznidazol, em dois estudos clínicos de novos fármacos tripanocidas (CHATELAIN, 2017).

O benznidazol, por ser o principal fármaco tripanocida ativo, é usado como referência para seleção das substâncias candidatas, que devem apresentar toxicidade inferior e seletividade superior ao benznidazol (PAUCAR; MORENO-VIGURI; PÉREZ-SILANES, 2016).

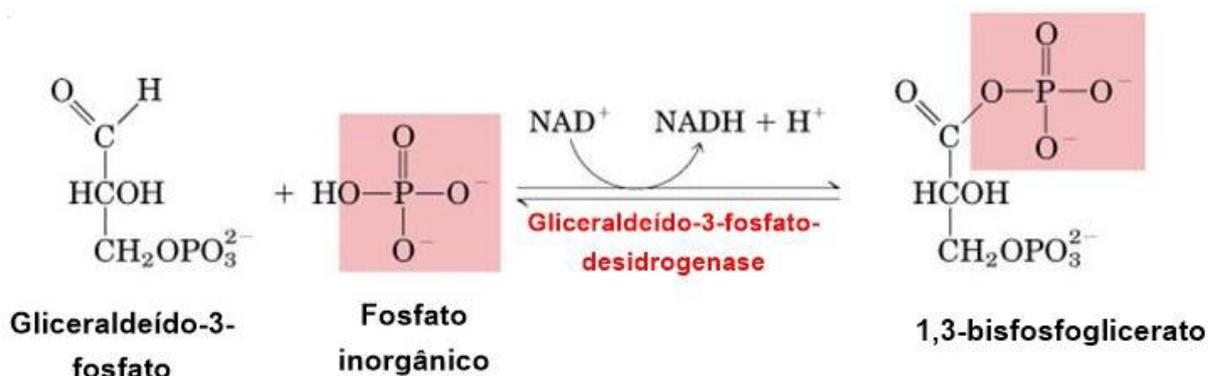
A pesquisa por novos fármacos antichagásicos seletivos baseia-se nas diferenças bioquímicas e farmacológicas entre as células de *Trypanosoma cruzi* e seus hospedeiros, envolvendo determinadas rotas metabólicas. O presente estudo considerou três alvos farmacológicos fundamentais para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (TcGAPDH), cruzaína e tripanotiona redutase (FERREIRA, 2012).

#### 1.1.1 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (TcGAPDH)

A inibição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *Trypanosoma cruzi* (TcGAPDH), foi proposta como uma explicação para o efeito tripanocida dos fármacos tripanocidas (BAKKER *et al.*, 2000; LADAME *et al.*, 2003; PROKOPCZYK *et al.*, 2013). Esta enzima é responsável na via glicolítica do parasito (Figura 24), pela conversão do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfato de glicerato-D, na presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD) + fosfato inorgânico (HARRIS; WATERS, 1976; ZINSSER *et al.*, 2014). Sua inibição pode alterar o metabolismo energético e a produção de ATP através da glicólise anaeróbica no

citoplasma, importante para o ciclo de vida do parasito (NOWICKI *et al.*, 2008; YANG, SHIQIONG *et al.*, 2013).

Figura 24 - GAPDH e a via glicolítica de *Trypanosoma cruzi*



Fonte: <http://www.biomedicinaemacao.com.br/2012/04/via-glicolitica-ou-glicolise.html>

As formas tripomastigotas são altamente dependentes da via glicolítica para obtenção de energia (DIAS; DESSOY, 2009), dessa forma esta enzima pode ser um alvo importante para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos.

### 1.1.2 Cruzaina

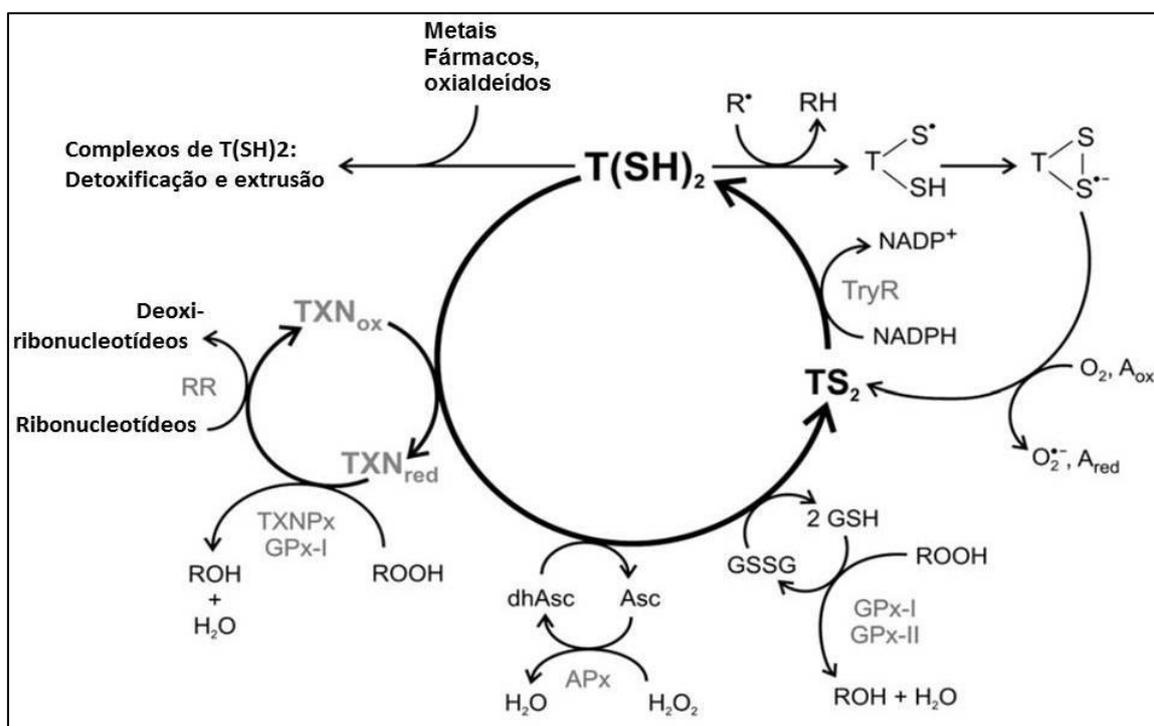
As proteases são enzimas que facilitam a quebra de ligações peptídicas entre aminoácidos e peptídeos, sendo fundamentais em protozoários como o *Trypanosoma cruzi*. Dessa forma, algumas proteases como as cisteíno proteases têm sido alvo para a busca de novos fármacos tripanocidas (DIAS; DESSOY, 2009).

A cruzaina é a enzima mais abundante da família das cisteíno-proteases do *Trypanosoma cruzi*, é a principal responsável pela atividade proteolítica envolvida em vários processos vitais, em todos os estágios do ciclo evolutivo do parasito (CAMPETELLA *et al.*, 1992), desempenha papel importante no processo de internalização do parasito em células de mamíferos (SOUTO-PADRON *et al.*, 1990) e na replicação intracelular do *T. cruzi* (MEIRELLES *et al.*, 1990).

### 1.1.3 Tripanotiona redutase

O *Trypanosoma cruzi*, por habitar componentes biológicos bem divergentes, em seu ciclo biológico precisa enfrentar diversos microambientes redox, possuindo um longo e diferenciado mecanismo de detoxificação (IRIGOÍN *et al.*, 2008). Um importante mecanismo de defesa do *T. cruzi* contra o estresse oxidativo é dependente de grupos tióis (Figura 25), sendo destaque nessa via de biossíntese a enzima tripanotiona redutase, que desempenha a função de manter os níveis de tripanotiona reduzida na via, sendo outro importante alvo farmacológico para o desenvolvimento de novos fármacos tripanocidas (DIAS; DESSOY, 2009).

Figura 25 - Mecanismo de defesa do *T. cruzi* contra estresse oxidativo



Fonte: Adaptado de (IRIGOÍN *et al.*, 2008).

Legenda: T(SH)<sub>2</sub> – tripanotiona reduzida; TryR – tripanotiona redutase; TXN – triparedoxina; dhAsc – dehidroascorbato; Asc – ascorbato; GSSG – glutationa dissulfeto; GSH – glutationa reduzida; RR – ribonucleotídeo redutase; ROOH – hidroperoxidases; A – oxidante de um elétron; TXNPx – tiparedoxina peroxidase; GPx-I e GPx-II = tiparedoxinas peroxidases glutationa peroxidase-like do tipo I e II.

De forma resumida, o mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo acontece da seguinte forma: a tripanotiona reduzida (T(SH)<sub>2</sub>) é mantida nessa forma numa reação catalisada pela tripanotiona redutase (TryR), às custas de NADPH. A tripanotiona reduzida participa da síntese de deoxi-ribonucleotídeos e da decomposição de peróxidos, reduzindo a triparedoxina (TXN), dehidroascorbato (dhAsc) em ascorbato (Asc) e glutationa dissulfeto (GSSG) em glutationa reduzida

(GSH). A tripanotiona também pode reagir com radicais livres em reações de reparo ou eliminação (IRIGOÍN *et al.*, 2008).

O estudo *in silico*, através de docking molecular envolvendo as estruturas cristalográficas dos alvos acima (TcGAPDH, cruzaína e tripanotiona redutase) vem sendo amplamente utilizado para auxiliar no desenvolvimento de novos potenciais agentes antichagásicos.

## 1.2 Estudos computacionais

O desenvolvimento de novos fármacos vem sendo incrementado atualmente, pelo uso de técnicas de modelagem molecular, que permitem caracterizá-los eletrônica e estruturalmente com base para o desenvolvimento de *Drug design*, bem como o entendimento da interação dessas moléculas com os seus potenciais alvos terapêuticos (docking molecular), que geralmente utiliza estruturas proteicas resolvidas por cristalografia, disponibilizadas em um repositório virtual.

Dentre as técnicas de modelagem, pode-se destacar o formalismo da teoria de densidade do funcional, que permite a nível quântico, com boa acurácia e baixo custo computacional, realizar um estudo *in silico* completo, caracterizando estruturalmente uma molécula, identificando seus orbitais de fronteira, sítios reativos (nucleofílicos ou eletrofílicos), descritores reacionais e termodinâmicos.

A Teoria de densidade do funcional (DFT) é um método computacional quântico que permite a determinação (com acurácia aceitável) de várias propriedades do fármaco, tais como configurações geométricas da energia mais baixa, posições esperadas dos átomos constituintes, distribuições eletrônicas de carga, frequências vibracionais e assim por diante (BEZERRA *et al.*, 2006; ZIEGLER; AUTSCHBACH, 2005).

Mudanças na configuração geométrica e distribuição de carga de uma molécula de droga causada por sua interação com o sítio ativo de uma enzima desempenham um papel importante em sua atividade biológica (DEVIPRIYA; KUMARADHAS, 2013). O docking molecular é um método computacional, geralmente, baseado em campos de força da mecânica molecular clássica que predizem o modo de ligação de um ligante de molécula pequena ao sítio ativo de um alvo macromolecular para formar um complexo estável (BROOIJMANS; KUNTZ,

2003). São utilizados na busca de novos alvos para a terapia medicamentosa, devido ao baixo custo computacional quando comparados a métodos baseados em mecânica quântica (SOUSA; FERNANDES; RAMOS, 2006). No entanto, os métodos de acoplamento tipicamente usados não predizem corretamente a energia de ligação de um complexo ligante-receptor (KITCHEN *et al.*, 2004; SOODERHJELM; RYDE, 2012).

Além disso, o método de fracionamento molecular com tampas conjugadas (MFCC) é uma abordagem mais poderosa usando cálculos da mecânica quântica para determinar as energias de interação para sistemas de proteína-ligante (DA COSTA *et al.*, 2012; ZANATTA; BARROSO-NETO; JUNIOR, 2012). Neste método, a energia de interação de um ligante com uma proteína é determinada pela soma das interações entre o ligante e os fragmentos de proteína individualmente encapsulados (fragmentos individuais baseados em aminoácidos) (ZHANG; ZHANG, 2003). O MFCC combinado com a abordagem de ancoragem pode fornecer informações quantitativas mais confiáveis sobre a interação de drogas com o sítio ativo de alvos macromoleculares.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito tripanocida de substâncias presentes no *Anacardium occidentale L.* (cajueiro) sobre os principais alvos farmacológicos para pesquisa de novas alternativas terapêuticas para Doença de Chagas, numa abordagem teórica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudo *in silico* do ácido anacárdico com a cadeia alquílica saturada (AA0);
- Elucidar o possível mecanismo de interação do ácido anacárdico com a cadeia alquílica saturada (AA0) na enzima TcGAPDH, realizando análises de docking molecular e MFCC;
- Realizar estudo *in silico* do biflavonoide amentoflavona através de caracterização eletrônica e estrutural e docking molecular nas enzimas TcGAPDH, Tripanotiona redutase e cruzaina.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Estudo *in silico* do ácido anacárdico

##### 3.1.1 Otimização geométrica do ácido anacárdico

Inicialmente, a otimização geométrica da estrutura tridimensional do AA (com a cadeia pentadecil) obtida da base de dados ZINC (código ZINC: 8234355) (IRWIN *et al.*, 2012) foi realizada usando cálculos DFT (B3LYP). Utilizou-se o programa Gaussian 03 (Gaussian, Inc.), adotando a correlação de troca funcional híbrida B3LYP e a base 6-311 + G (d, p) ajustada para expandir os estados eletrônicos. A convergência estrutural do neutro isolado AA0 (fase gasosa) foi alcançada quando os seguintes limiares foram satisfeitos: força máxima por átomo  $<1,5 \times 10^{-5}$  Ha Å<sup>-1</sup> e força RMS  $<1,0 \times 10^{-5}$  Ha Å<sup>-1</sup>, auto-consistente variação de energia de campo  $<10^{-7}$  Ha e deslocamento atômico máximo  $<6 \times 10^{-5}$  Å. A menor configuração de energia (otimizada) foi representada como AA0. Com os dados de otimização do AA0, foi possível traçar a superfície potencial eletrostática molecular (MESP).

##### 3.1.2 Docking Molecular do AA0 com TcGAPDH

A simulação de docking molecular foi realizada empregando o acoplamento automatizado com o programa AutoDock Vina (Molecular Graphics Lab) (TROTT; OLSON, 2010). A estrutura cristalográfica de TcGAPDH complexado com chalepina (TcGAPDH-chalepina) foi obtida do RCSB Protein Data Bank (código PDB: 1K3T) elucidada por (PAVÃO *et al.*, 2002). O ligante utilizado, foi o AA0 otimizado e o receptor foi a cadeia C da enzima TcGAPDH após a remoção da chalepina do complexo TcGAPDH-chalepina. Foi colocada uma caixa de grid de 820 nm<sup>3</sup>, centrada no sítio ativo, foi definida como a região de busca do receptor. A melhor conformação de encaixe do AA0 foi selecionada com base no local de ligação e usada para a construção do complexo TcGAPDH-AA0. A cadeia A dos complexos do cofactor TcGAPDH-NAD<sup>+</sup> (código PDB: 1QXS) foi utilizada para comparar a posição do ligante no local de ligação. Gráficos moleculares e docking foram realizados usando o

pacote UCSF Chimera 1.8 (Resource for Biocomputing, Visualization e Informatics da Universidade da Califórnia, São Francisco, EUA) (PETTERSEN *et al.*, 2004).

### 3.1.3 Fracionamento Molecular com Capas Conjugadas (MFCC)

Para evitar desconsiderar interações importantes, todos os 359 resíduos de aminoácidos da enzima cadeia A do complexo TcGAPDH-AA0 (obtidos por atracação), foram levados em conta ao estimar a energia total de interação. Para cada resíduo de aminoácido, conjuntos de quatro aminoácidos foram usados como capas, duas de cada lado, a fim de aumentar a precisão ao medir a energia de interação. As energias de interação entre a molécula AA0 e os resíduos de aminoácidos da enzima TcGAPDH foram estimadas usando a estratégia MFCC (DEVIPRIYA; KUMARADHAS, 2012). A energia de ligação (interação) entre a molécula inibidora AA0 e o resíduo de aminoácido  $R^i$ , é dada por  $E(AA-R^i)$ :

$$E(AA-R^i) = E(AA-C^{i-1}R^iC^{i+1}) - E(C^{i-1}R^iC^{i+1}) - E(AA-C^{i-1}C^{i+1}) + E(C^{i-1}C^{i+1})$$

onde o  $C^i$  (cap) é obtido ligando um grupo carboxila ou amina à ligação pendente do resíduo  $R^i$ . No lado direito da equação,  $E(AA-C^{i-1}R^iC^{i+1})$ , é a energia total do sistema formado pela molécula AA e pelo resíduo bloqueado; o termo  $E(C^{i-1}R^iC^{i+1})$  é a energia total do resíduo bloqueado sozinho;  $E(AA-C^{i-1}C^{i+1})$  é a energia total do sistema formado pelo AA e as camadas sozinhas. Finalmente,  $E(C^{i-1}C^{i+1})$  é a energia total do sistema formado apenas pelas tampas moleculares.

Para os cálculos dos primeiros princípios, foi usada a metodologia encontrada em diversos trabalhos (BARROSO-NETO *et al.*, 2012; DEVIPRIYA; KUMARADHAS, 2012; IRWIN *et al.*, 2012; PAVÃO *et al.*, 2002; PETTERSEN *et al.*, 2004; POLITZER; MURRAY, 2002; POLITZER; MURRAY; PERALTA-INGA, 2001; REED; WEINHOLD, 1985; TROTT; OLSON, 2010; YEARLEY *et al.*, 2008; ZHANG; ZHANG, 2003). Em outras palavras, as posições dos átomos de não hidrogênio foram mantidos fixos, enquanto as posições do átomo de hidrogênio e AA0 foram inicialmente otimizadas usando o campo de força CHARMM (MOMANY; RONE, 1992), que tem parâmetros específicos para aminoácidos.

Posteriormente, simulações dentro do formalismo da Teoria do Funcional da Densidade utilizando a Aproximação da Densidade Local para o funcional de

correlação-troca com um esquema de correção de dispersão (DFT / LDA / OBS) foram realizadas usando o código Dmol3 (DELLEY, 1990, 2000). Um conjunto de bases numéricas e polarização dupla (DNP) foi escolhido para expandir os orbitais eletrônicos de Kohn-Sham, levando em conta todos os elétrons, explicitamente e com spin restrito. O conjunto de bases do DNP tem uma precisão equivalente ao conjunto de bases gaussianas 6-311 + G (3df, 2pd) (DELLEY, 1990, 2000; INADA; ORITA, 2008), com erro de superposição de base desprezível (BSSE). O raio de corte orbital para este conjunto de base foi definido para 3,7 Å e o limiar de convergência de campo auto-consistente foi ajustado para 10<sup>-6</sup> Ha. A energia de ligação da cadeia A dos complexos de cofactor TcGAPDH-NAD<sup>+</sup> foi também calculada (por MFCC) para ser comparada com o complexo TcGAPDH-AA0.

### 3.2 Estudo *in silico* do biflavonoide Amentoflavona

#### 3.2.1 Caracterização estrutural e eletrônica do biflavonoide Amentoflavona

No presente estudo, os cálculos da química computacional foram realizados no âmbito da Teoria Funcional da Densidade (DFT), que é uma das formas mais eficazes de analisar a estabilidade e reatividade de espécies químicas. Os cálculos quânticos de DFT para as propriedades eletrônicas e reativas do estado fundamental da amentoflavona e apigenina foram realizados usando o pacote de programas ORCA 4.1.(NEESE, 2012)(NEESE, 2018) . Devido às diferenças dos orbitais moleculares foi utilizado, um funcional Kohn-Shan restrito , juntamente com os três parâmetros funcionais de Becke (B3 ) (WISHART, 2012)(BECKE, 1993a) (BECKE, 1993b)(BECKE, 2003) para a correlação de troca e o funcional Lee-Yang-Parr (LYP) (LEE; YANG; PARR, 1988) corrigido por gradiente , para realizar a otimização geométrica na fase gasosa. Para ter um conjunto de bases estável, foi utilizada uma base polarizada de 6-31G (d, p) (DITCHFIELD; HEHRE; POPLE, 1971).

Para garantir a validade da otimização, foi realizado cálculo de frequência vibracional para obter os espectros teóricos de infravermelho na fase gasosa, aplicando o mesmo nível de teoria. As estruturas de amentoflavona e apigenina foram desenhadas no Avogadro 1.2.0 (HANWELL *et al.*, 2012) . Para visualização e plotagem dos orbitais de fronteira e atribuir os modos vibracionais, foi utilizada a versão *trial* do código Chemcraft (software gráfico para visualização dos cálculos da

química quântica) versão 1.8 (<https://www.chemcraftprog.com>). Os dados termodinâmicos de energia interna (U), entalpia (H), entropia (S) e energia livre de Gibbs (G) foram obtidos a partir do cálculo da análise vibracional e termodinâmica estatística (Eq. 1 - 4) em T = 298,15 K e P = 1 atm usando o mesmo nível de teoria usado para o cálculo da otimização

$$U = E_{el} + E_{ZPE} + E_{vib} + E_{rot} + E_{trans} \quad (1)$$

Onde  $E_{el}$  é a energia eletrônica total da estrutura da molécula, em outras palavras, a soma da energia cinética dos elétrons, a energia potencial da interação elétron-núcleo, elétron-elétron e núcleo-núcleo.  $E_{ZPE}$  é a energia vibracional absoluta à temperatura zero.  $E_{vib}$  é o termo que implica uma correção no  $E_{ZPE}$  devido à temperatura finita que causa populações de estados vibracionais excitados.  $E_{rot}$  é a energia térmica rotacional e  $E_{trans}$  é a energia térmica translacional.

$$H = U + k_B T \quad (2)$$

Onde U é a energia interna calculada como visto acima,  $k_B$  é a constante de Boltzmann ( $k_B = 1,380649 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ) e T é a temperatura absoluta.

$$S = S_{el} + S_{vib} + S_{rot} + S_{trans} \quad (3)$$

Onde  $S_{el}$  é a entropia eletrônica,  $S_{vib}$  entropia de vibração,  $S_{rot}$  entropia de rotação e  $S_{trans}$  a entropia translacional. (GRIMME, 2012) (HUBER; HERZBERG, 1979) .

$$G = H - TS \quad (4)$$

Onde H é a entalpia, S é a entropia e T é a temperatura absoluta.

Os descritores moleculares foram calculados para estimar a reatividade da amentoflavona e apigenina a partir dos valores energéticos do *highest occupied*

*molecular orbital* (HOMO) e do *lowest unoccupied molecular orbital* (LUMO). Os orbitais de fronteira (HOMO e LUMO) são muito importantes para definir a reatividade de uma espécie química (SURESH KUMAR; ATHIMOOLAM; SRIDHAR, 2015) (PEREIRA, DOUGLAS HENRIQUE *et al.*, 2016) (FUKUI, 1982). Um valor mais alto de energia para o orbital HOMO indica uma tendência razoável das espécies químicas em doar densidade eletrônica e um valor mais baixo da energia para os orbitais LUMO, uma propensão a receber densidade eletrônica (OBOT; MACDONALD; GASEM, 2015)(PAES *et al.*, 2017).

Portanto, o gap de energia ( $\Delta E_{gap}$ ), definido como a diferença de energias para os orbitais LUMO-HOMO (Eq. 5), mostra uma relação direta entre os orbitais de fronteira e a reatividade química: para grandes valores de ( $\Delta E_{gap}$ ), implica menor reatividade, para um baixo valor de ( $\Delta E_{gap}$ ) sugere maior reatividade (MARINHO, 2016).

$$\Delta E_{gap} = E_{LUMO} - E_{HOMO} \quad (5)$$

Além da diferença de energia, existem parâmetros, também chamados de descritores de reatividade, que ajudam os químicos computacionais a prever o comportamento de uma espécie química em relação a outra. De acordo com o teorema da DFT proposto por Koopmans (KOOPMANS, 1934), a energia de ionização (I) e a afinidade eletrônica (A) de um composto químico estão relacionadas, respectivamente, à energia do orbital HOMO (Eq. 6) e à energia do orbital LUMO (Eq. 7).

$$I = -E_{HOMO} \quad (6)$$

$$A = -E_{LUMO} \quad (7)$$

Dentro do formalismo da DFT, grandezas químicas como eletronegatividade ( $\chi$ ), potencial químico ( $\mu$ ) e dureza química global ( $\eta$ ) podem ser definidas como a derivada da energia eletrônica da molécula (E) em relação ao número de elétrons totais (N) com um potencial externo constante ( $v$ ). As expressões matemáticas podem ser vistas da seguinte maneira (PARR *et al.*, 1978)(PARR;

PEARSON, 1983)(PARR; CHATTARAJ, 1991)(CHERMETTE, 1999)(ISLAM; CHANDRA GHOSH, 2011)(MENDOZA-HUIZAR; RIOS-REYES, 2011):

$$\chi = -\mu = \left( \frac{\partial E}{\partial N} \right)_v \quad (8)$$

$$\eta = \frac{1}{2} \left( \frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right)_v \quad (9)$$

De acordo com o trabalho de Iczkowski e Margrave e o método das diferenças finitas (ICZKOWSKI; MARGRAVE, 1961), a eletronegatividade e o potencial químico podem ser expressos em função da energia de ionização e da afinidade eletrônica (Eq. 10). A dureza química global pode ser estimada usando o teorema de Janak(JANAK, 1978) e o modelo de parábola do estado de valência (VON SZENTPÁLY, 1991) (Eq. 11).

$$\chi = -\mu = \frac{I + A}{2} \quad (10)$$

$$\eta = \frac{I - A}{2} \quad (11)$$

A maciez global (S) é definida como o inverso da dureza química global (YANG, W.; PARR, 1985) (Eq. 12).

$$S = \frac{1}{\eta} \quad (12)$$

Parr et al. (PARR; SZENTPÁLY; LIU, 1999) introduziram o índice global de eletrofilicidade ( $\omega$ ) definido como a suscetibilidade de uma espécie química (átomo, molécula ou íon) a aceitar densidade eletrônica. O valor mais alto de  $\omega$  implica que as espécies possam ser consideradas um bom eletrófilo. Assim, um bom nucleófilo é

descrito por valores mais baixos de  $\omega$ . As expressões quantitativas de  $\omega$  podem ser vistas como segue na Eq. 13 e Eq. 14. Nesse sentido, a nucleofilicidade ( $\varepsilon$ ) é definida como o inverso do índice global de eletrofilicidade (MADKOUR *et al.*, 2018) (Eq. 15).

$$\omega = \frac{\mu^2}{4\eta} = \frac{\chi^2}{4\eta} \quad (13)$$

$$\omega = \frac{(I + A)^2}{8(I - A)} \quad (14)$$

$$\varepsilon = \frac{1}{\omega} \quad (15)$$

Todos os descritores de reatividade vistos até agora estão relacionados às propriedades globais das espécies químicas. Fukui (FUKUI, 1982) propôs descritores de reatividade local chamados funções de Fukui ou índices de Fukui  $f(r)$  que medem as regiões reativas e o comportamento eletrofílico, nucleofílico e radical dos compostos químicos. Matematicamente, a função Fukui é definida como a derivada de primeira ordem da densidade eletrônica  $\rho(r)$  em relação ao número total de elétrons (N) com um potencial externo constante  $v(r)$  (Eq. 16).

$$f(r) = \left( \frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right)_v \quad (16)$$

Em consequência do método das diferenças finitas (ICZKOWSKI; MARGRAVE, 1961), as funções de Fukui podem ser expressas, chamadas funções de Fukui condensadas, como segue para os nucleofílicos ( $f_k^+$ ) (Eq. 17), eletrofílicos ( $f_k^-$ ) (Eq. 18) e ataque radical ( $f_k^0$ ) (Eq. 19).

$$f_k^+ = q_k(N + 1) - q_k(N) \quad (17)$$

$$f_k^- = q_k(N) - q_k(N - 1) \quad (18)$$

$$f_k^o = \frac{q_k(N + 1) - q_k(N - 1)}{2} \quad (19)$$

Onde  $q_k(N + 1)$ ,  $q_k(N)$  e  $q_k(N - 1)$  representam o valor da carga da análise da população de Hirshfeld para o átomo  $k$  para espécies aniônicas, neutras e catiônicas, respectivamente. As funções de Fukui podem ser usadas juntamente com o índice de eletrofilicidade ( $\omega$ ) para estimar locais eletrofílicos ou nucleofílicos locais usando as quantidades chamadas de descritor duplo (MORELL; GRAND; TORO-LABBÉ, 2005) definido por  $\Delta f$  (Eq. 20) e descritor multifílico (PADMANABHAN *et al.*, 2007) descrito por  $\Delta\omega$  (Eq 21).

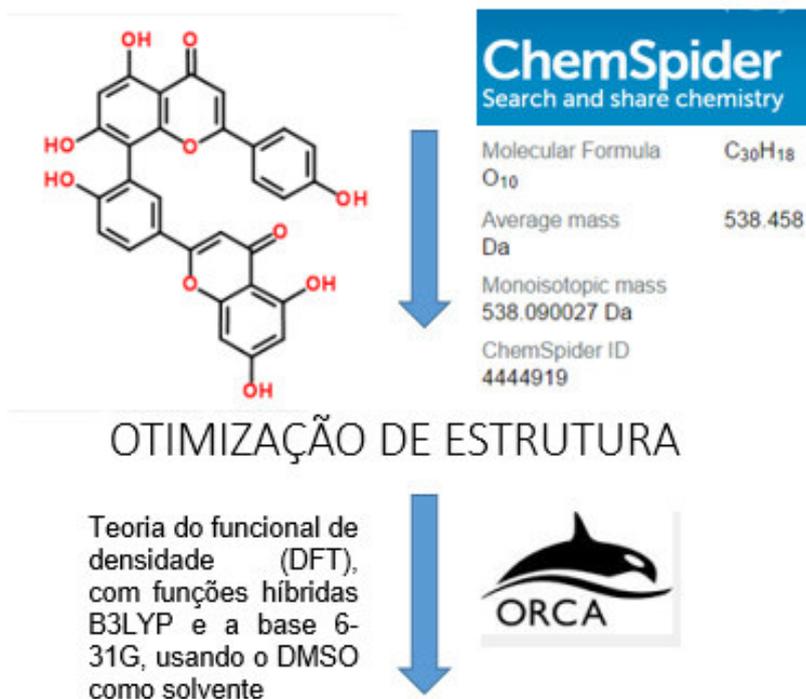
$$\Delta f = f_k^+ - f_k^- \quad (20)$$

$$\Delta\omega = \omega\Delta f \quad (21)$$

Se  $\Delta\omega$  e  $\Delta f > 0$ , o local reativo possui um caráter eletrofílico. Se  $\Delta\omega$  e  $\Delta f < 0$ , o local reativo possui caráter nucleofílico (SPACKMAN; JAYATILAKA, 2009)(UPPAL *et al.*, 2018). Finalmente, o potencial eletrostático molecular foi calculado e plotado usando o código MoCalc2012 v4.2.0.1 (DEPIZZOL *et al.*, 2005).

De forma resumida, a metodologia da caracterização estrutural e eletrônica da amentoflavona pode ser visualizada na Figura 26.

Figura 26 - Metodologia da caracterização estrutural e eletrônica da amentoflavona



Fonte: Elaborada pela autora

### 3.2.2 Docking molecular do biflavonoide Amentoflavona com alvos terapêuticos do *Trypanosoma cruzi* (Cruzaína, TCGAPDH e Tripanotiona redutase)

O docking molecular constitui uma ferramenta computacional eficiente em estudos de processos de reconhecimento molecular (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003), realiza a simulação dos modos de interação, conformação e orientação, possibilitando a estimativa das energias de interação entre duas moléculas no espaço tridimensional, tais como proteína-proteína e ligante-proteína (FREITAS *et al.*, 2009), fundamentado em dois elementos, uma função de energia potencial, normalmente associada a um campo de força (usada para definir a afinidade de interação entre o ligante e o receptor) e um algoritmo de busca, que define a amostragem do espaço conformacional do ligante que determina o mínimo global de energia para o complexo ligante-receptor (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003).

O processo de reconhecimento molecular ligante-receptor é orientado por efeitos de entalpia e entropia, sendo determinados pela energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), que está relacionada a constante de dissociação ( $K_d$ ), uma medida experimental da interação entre ligante e receptor (macromolécula),

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_d$$

onde  $\Delta H$  é a variação de entalpia,  $T$  é temperatura absoluta,  $\Delta S$  variação de entropia e  $R$  a constante universal dos gases (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003).

O código AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010) foi utilizado para a simulação de docking molecular com três principais alvos terapêuticos, as enzimas envolvidas no ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*: TcGAPDH, cruzaina e tripanotiona redutase, buscando todos os possíveis modos de ligação entre proteína-alvo e ligante.

As estruturas proteicas complexadas com os inibidores, foram obtidas no repositório Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), depositadas sob os códigos PDB 1K3T (TcGAPDH/chalepina), PDB 3IUT (cruzaina/Tetrafluorofenoximetil cetona) e PDB 1GXF (tripanotiona redutase/quinacrina mostarda). A estrutura da amentoflavona utilizada para o docking, foi otimizada por DFT. Como molécula para referência, além dos inibidores já complexados no próprio PDB, foi utilizado o Benznidazol (ChemSpider ID 29299).

Os parâmetros de grid box configurados para o docking molecular da enzima TcGAPDH foram:  $center\_x = 19.822$ ,  $center\_y = 0.455$ ,  $center\_z = 24.804$ ,  $size\_x = 116$ ,  $size\_y = 112$ ,  $size\_z = 122$ ,  $spacing = 0.931$  e  $exhaustiveness = 8$ . No caso da Cruzaina os parâmetros foram:  $center\_x = 6.612$ ,  $center\_y = -0.436$ ,  $center\_z = 8.052$ ,  $size\_x = 116$ ,  $size\_y = 106$ ,  $size\_z = 126$ ,  $spacing = 0.431$  e  $exhaustiveness = 8$  e para a tripanotiona redutase:  $center\_x = 44.196$ ,  $center\_y = 3.102$ ,  $center\_z = -0.054$ ,  $size\_x = 126$ ,  $size\_y = 90$ ,  $size\_z = 126$ ,  $spacing = 0.775$  e  $exhaustiveness = 8$ .

Ao final da simulação de docking molecular, a diferença entre as conformações é medida pelo valor do Desvio Médio Quadrático da Raiz (RMSD), uma medida quantitativa muito utilizada para a similaridade entre duas coordenadas atômicas sobrepostas. Os valores de RMSD são apresentados em Å e calculados pela equação:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d_i^2}$$

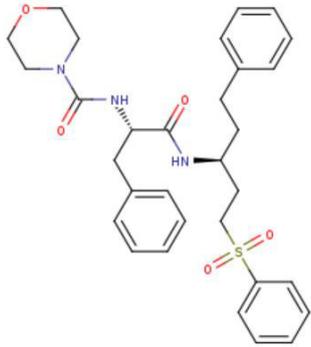
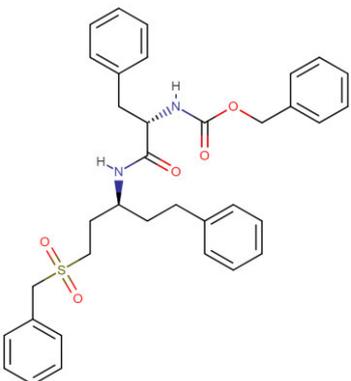
na qual a média é realizada sobre os  $n$  pares de átomos equivalentes e  $d_i$  é a distância entre os dois átomos no  $i$ -ésimo par. Desta forma, quanto maior o valor de RMSD,

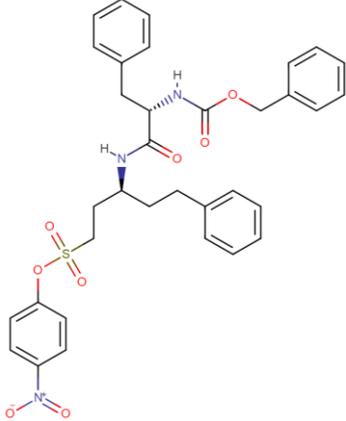
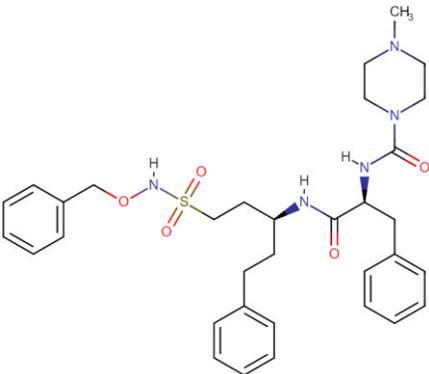
maior é a diferença estrutural entre as proteínas ou estruturas que estão sendo alvo de comparação (KUFAREVA I.; ABAGYAN R., 2011), sendo consideradas confiáveis as poses que apresentam valores de RMSD menores que 2.0 Å (HUEY R., MORRIS M.G., OLSON J.A., 2007; YUSUF *et al.*, 2008).

### 3.2.3 Docking molecular do biflavonoide Amentoflavona com a enzima cruzaína complexada com derivados vinil sulfônicos

As estruturas proteicas da cruzaína complexadas com os inibidores, derivados do vinil sulfona, identificados como VSI, VSII, VSIII e VSIV (Figura 27) foram obtidas no repositório *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Figura 27 - Estrutura bidimensional dos inibidores VSI, VSII, VSIII e VSIV

CÓDIGO	NOME	ESTRUTURA BIDIMENSIONAL
VSI	3-[[N-[Morpholin-N-Yl]-Carbonyl]-Phenylalaninyl-Amino]-5- Phenyl-Pentane-1-Sulfonylbenzene	
VSII	3-[N-[Benzyloxycarbonyl]-Phenylalaninyl-Amino]-5-Phenyl-Pentane-1-Sulfonylmethylbenzene	

VSIII	3-[N-[Benzyloxycarbonyl]-Phenylalaninyl-Amino]-5-Phenyl-Pentane-1-Sulfonic Acid 4-Nitro-Phenyl Ester	
VSIV	3-[[N-[4-Methyl-Piperazinyl]Carbonyl]-Phenylalaninyl-Amino]-5-Phenyl-Pentane-1-Sulfonic Acid Benzyloxy-Amide	

Fonte: Elaborada pela autora

As estruturas complexadas da cruzaina com os inibidores, estavam depositadas com os códigos PDB 1F29, 1F2A, 1F2B e 1F2C, obtidas a partir de difração de raio X, com resolução de 2,15 Å, 1,6 Å, 1,8 Å e 2,0 Å, respectivamente, sendo estas classificadas como hidrolases, expressas em *Escherichia coli*, organismo *Trypanosoma cruzi* (BRAK K., KERR I.D., BARRET K.T., FUCHI N., DEBNATH M., ENGEL J.C., MCKERROW J.H., DOYLE P.S., BRINEN L.S., 2011).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estudo *in silico* do ácido anacárdico (AA0)

#### 4.1.1 Mapa de Superfície do Potencial Eletrostático (MESP) do Ácido Anacárdico

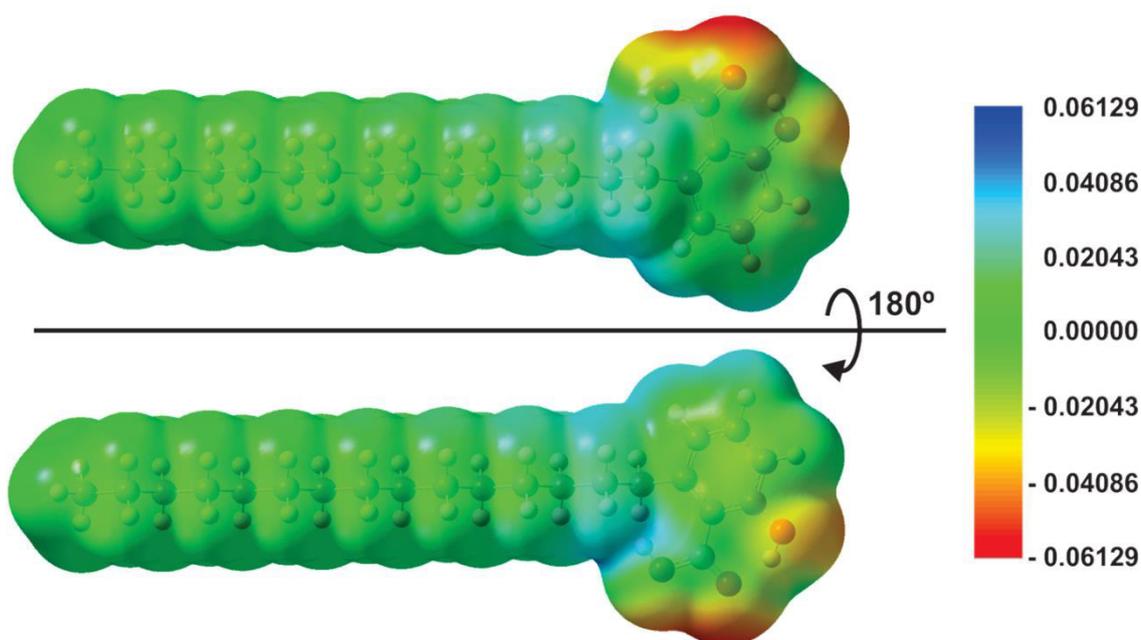
O mapa de superfície do potencial eletrostático (MESP), fornece um método visual para entender a polaridade relativa dos compostos (REED; WEINHOLD, 1985) e nos permite prever o local de ligação entre moléculas biológicas e seus receptores (POLITZER; MURRAY, 2002; YEARLEY *et al.*, 2008), além de ser uma importante ferramenta no estudo de novas drogas (HIBBS *et al.*, 2004; POLITZER; MURRAY; PERALTA-INGA, 2001). Associada ao momento dipolar, a eletronegatividade e a carga parcial do potencial eletrostático molecular (OPHARDT, 2003) podem ser usadas para prever os tipos de interação intermolecular, a molécula pode carregar tanto quanto os locais dessas interações. O potencial eletrostático em um ponto (x, y, z) é dado pela energia eletrostática potencial entre um ião imaginário positivamente carregado (+1) localizado em (x, y, z) e a molécula. Se o íon é atraído para a molécula, então o potencial é negativo. Se o íon é repellido pela molécula, então o potencial é positivo. Assim, as regiões ricas em elétrons geralmente têm potenciais negativos e as regiões pobres em elétrons geralmente têm potenciais positivos. O potencial eletrostático molecular (MEP) em um ponto r no espaço em torno de uma molécula (em unidades atômicas) pode ser expresso como (PRABAVATHI; NILUFER; KRISHNAKUMAR, 2013):

$$V(r) = \sum_A \frac{Z_A}{|\vec{R}_A - \vec{r}|} - \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}'$$

onde  $Z_A$  é a carga no núcleo A, localizada em  $R_A$  e  $\rho(r')$  é a função de densidade eletrônica da molécula.  $V(r)$  é o efeito resultante da rede eletrostática produzido no ponto r por ambos os elétrons e os núcleos da molécula, onde o primeiro termo representa as contribuições devido ao potencial de elétrons e o segundo termo devido aos núcleos. O conhecimento da distribuição de carga, identificando suas densidades parciais, ajuda a entender a forma de interação entre uma molécula e outra, e assim, pode-se identificar o sítio reativo molecular (HERRING *et al.*, 2007; SEMINARIO, 1996).

O mapa de potencial eletrostático mostrado na Figura 28, ilustra as distribuições de carga tridimensionais da molécula, enquanto os potenciais eletrostáticos negativos são mostrados em vermelho, cuja intensidade é proporcional ao valor absoluto da energia potencial, e os potenciais eletrostáticos positivos são mostrados em azul, enquanto verde indica áreas de superfície onde os potenciais estão próximos de zero.

Figura 28 - Mapa de Superfície do Potencial eletrostático do ácido anacárdico.



Fonte: Elaborada pela autora

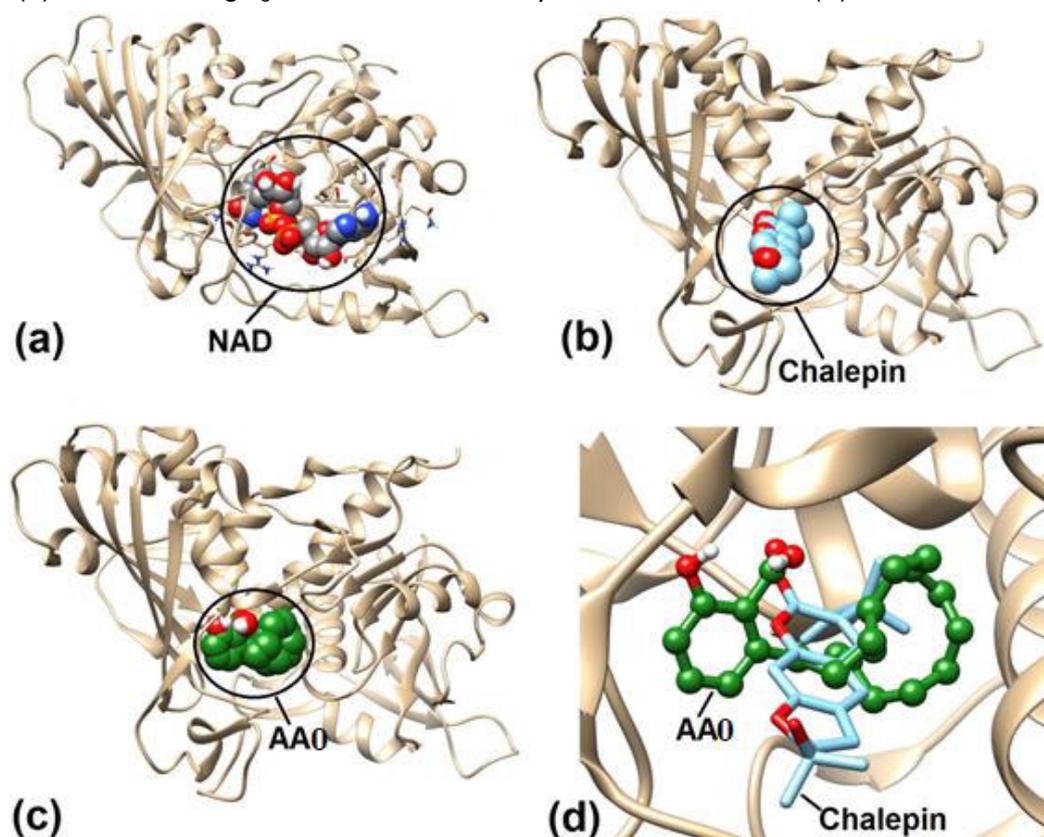
Observa-se uma densidade de carga parcial negativa do grupo carboxila localizado na região, indicando assim uma região rica em elétrons e este fato deve-se à presença de pares de elétrons não-ligantes de oxigênio, fazendo com que a região se torne um sítio nucleofílico. Enquanto nos grupos alquila (região verde), observa-se uma região com um potencial próximo de zero (ligações C-C), caracterizando uma região hidrofóbica da molécula (região predominantemente não polar).

#### 4.1.2 Docking Molecular e MFCC do ácido anacárdico

A melhor conformação de encaixe na simulação de acoplamento do AA0 é mostrada na Figura 29, juntamente com a configuração de encaixe da chalepina (obtida a partir de dados cristalográficos do complexo TcGAPDH – chalepina) para

comparação. Pode-se observar que a molécula AA0 ocupa uma região próxima ao sítio ativo da molécula chalepina na enzima TcGAPDH. O AA0 pode interagir com número elevado de resíduos devido à sua longa cadeia. Além disso, consiste em uma cabeça polar com um anel de benzeno e uma longa cauda hidrofóbica. A cabeça polar favorece a formação de ligações de hidrogênio, enquanto a cauda pode interagir com aminoácidos que possuem um caráter hidrofóbico. O complexo TcGAPDH-AA0 (melhor conformação de encaixe na simulação de acoplamento do AA0) foi usado nos cálculos do MFCC.

Figura 29 - Complexos TcGAPDH cristalizados com (a) nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD), (b) chalepina. Docking entre TcGAPDH e ácido anacárdico (AA0) (c) e local de ligação de AA0 e chalepina na TcGAPDH (d).



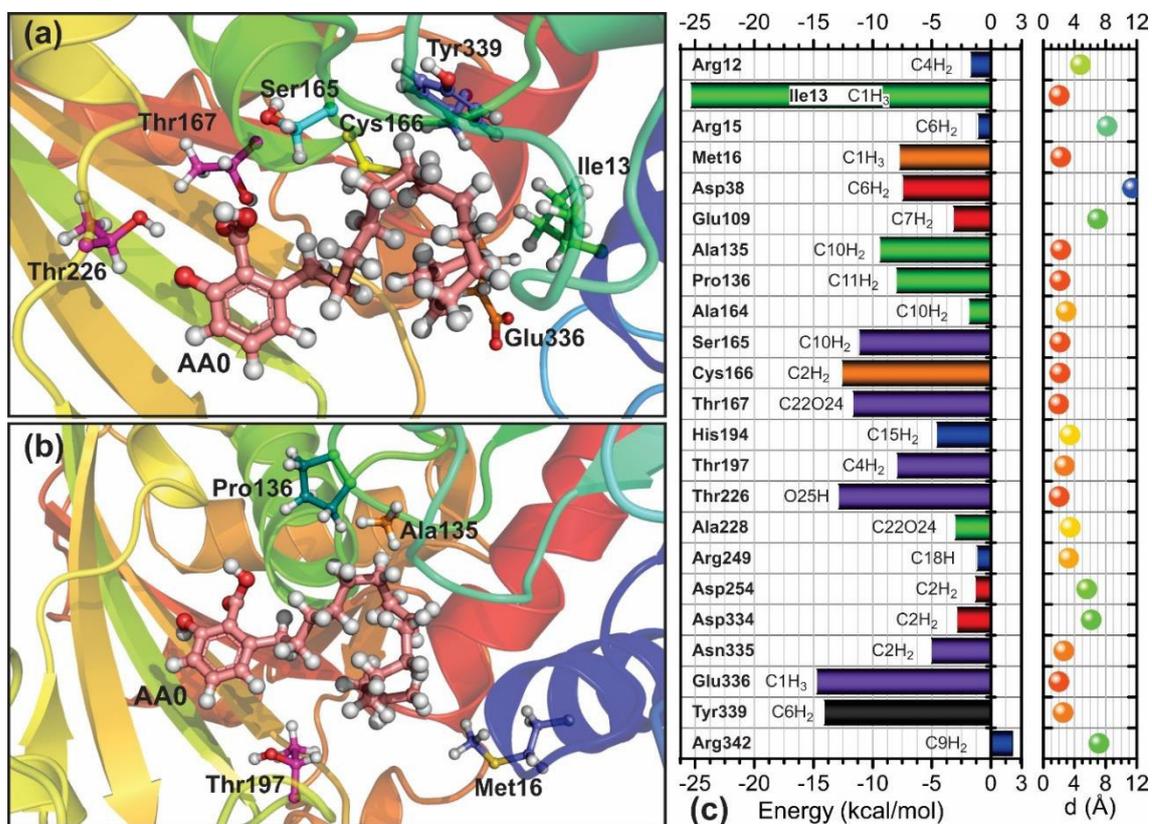
Fonte: Elaborada pela autora

Através de cálculos computacionais utilizando o método de fragmentação com capas conjugadas MFCC, a energia de interação dos resíduos de aminoácidos foi determinada com base na teoria do funcional da densidade DFT. Os aminoácidos que apresentaram energia de interação relevante para a estabilização do Ácido

Anacárdico (AA0) são os seguintes: Ile13, Met16, Ser134, Ala135, Pro136, Ala164, Cys165, Thr167, His194, Thr197, Ser224, Thr226, Gly227, Ala228, Arg249, Asp334, Asn335, Glu336 e Tyr339. Como o AA0 é um ligante longo, isso faz com que o mesmo ative um número grande de resíduos, além disso, o ligante possui uma cabeça polar que têm a presença de um anel benzeno e uma longa cauda hidrofóbica. Essa parte polar do ligante favorece interações do tipo ligações de hidrogênio e por outro lado a cauda pode interagir com aminoácidos que possuam caráter hidrofóbico.

A nova versão do painel BIRD (Figura 30) mostra um painel gráfico com energias de interação entre o ligante ácido anacárdico e os resíduos de aminoácidos mais importantes, que compõem o sítio de ligação da enzima gGAPDH. Este painel é uma nova versão do BIRD (em inglês, *Binding site, Interaction energy and Residues Domain*) apresentado por (DA COSTA *et al.*, 2012) e mostra: (i) A energia de interação (em kcal/mol) de cada resíduo com o ligante usando barras horizontais, a partir do qual pode-se estimar quantitativamente o papel de cada resíduo no sítio de ligação, ou seja, sua eficácia para atrair ou repelir a droga; (ii) os resíduos mais importantes que contribuem para a ligação no lado esquerdo; (iii) os átomos que possuem a menor distância entre o resíduo de aminoácido e o ligante; (iv) no lado esquerdo painel contendo a distância mínima em angstroms entre aminoácido-ligante; (v) as barras que indicam a intensidade de interação entre o ligante e os resíduos da enzima gGAPDH apresentam cores que dependem da classificação da cadeia lateral de cada aminoácido (ver Figura 31).

Figura 30 - Análise de MFCC e Sítio de ligação, energia de interação e resíduos do domínio- BIRD.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: (a) Sítio de ligação do ácido anacárdico obtido a partir de docking molecular destacando resíduos importantes da *TcGAPDH*: Tyr339, Ser165, Cys166, Thr167, Ile13, Thr226 e Glu336. (b) Outra visão do sítio de ligação do ácido anacárdico obtido a partir de docking molecular destacando os resíduos Pro136, Ala 135, Thr197 e Met16. (c) Sítio de ligação, energia de interação e resíduos do domínio (*Binding site, Interaction energy an Residues Domain – BIRD*), mostrando resíduos relevantes interagindo com o ácido anacárdico contribuindo para sua estabilização energética no sítio de ligação da enzima *TcGAPDH*.

Figura 31 - Classificação dos aminoácidos de acordo com a polarização e características estruturais das cadeias laterais.

Amino acids	Initials	Characteristics (side chains)
Glycine	Gly	
Alanine	Ala	Nonpolar,
Proline	Pro	
Valine	Val	Aliphatic
Leucine	Leu	
Isoleucine	Ile	
Phenylalanine	Phe	
Tyrosine	Tyr	Aromatic
Tryptophan	Trp	
Asparagine	Asn	Polar,
Glutamine	Gln	
Serine	Ser	Uncharged
Threonine	Thr	
Amino acids	Initials	Characteristics (side chains)
Methionine	Met	Sulfur-Containing
Cysteine	Cys	
Aspartate	Asp	Charged
Glutamate	Glu	Negative (Acidic)
Arginine	Arg	Charged
Lysine	Lys	Positive (Basic)
Histidine	His	

Fonte: Elaborada pela autora

\*Há uma correspondência com as cores das barras no painel BIRD (Figura 30).

Podemos ver no BIRD (Figura 30) que vinte e dois resíduos contribuem para a estabilização do AA0: Arg12, Ile13, Arg15, Met16, Asp38, Glu109, Pro136, Ala164, Ser165, Cys166, Thr167, His194, Thr197, Thr226, Ala228, Arg249, Asp254, Asp334, Asn335, Glu336, Tyr339, Arg342, enquanto apenas um resíduo de aminoácido Ala135 apresenta energia de interação positiva (repulsiva). Pavão *et al.*, (2002) apontaram que os resíduos Thr167, Cys166, Arg249, Asp210 da enzima gGAPDH possuem importantes interações com a chalepina. O resíduo Thr167 interage com o oxigênio do grupo CO da Chalepina através da W739. O Cys166 realiza uma interação de característica hidrofóbica com o grupo 1,1-dimetilalil, também é relatado uma interação de hidrogênio com o Arg249 e finalmente, uma fraca interação de hidrogênio com Asp210 intermediada pela água W812. Devido as diferenças estruturais dos ligantes, os aminoácidos acima poderão ou não apresentar interações moleculares relevantes para a estabilização do AA0, como poderemos constatar observando o BIRD.

O resíduo Ile13 exibe a energia de ligação mais forte (cerca de 25 kcal/mol) com o AA0, através de uma forte interação de Van der Waals envolvendo a cauda do AA0 e a cadeia lateral da Ile13, ambas com características hidrofóbicas. Apesar das interações hidrofóbicas serem reconhecidamente umas das mais fracas, esta é relativamente forte devido à proximidade entre os grupos químicos de ambos ligante-resíduo que é de cerca de 2 Å, bem como a extensão da cadeia lateral do resíduo Ile13 que é de aproximadamente 4 Å. O segundo aminoácido com energia de interação mais forte é Glu336, com energia de ligação de cerca de 15,0 kcal/mol devido a formação natural de um dipolo eletrostático do AA0 dentro do sítio de ligação a cauda fica com ausência de elétrons o que favorece a interação com aminoácidos que possuem átomos ou cadeias laterais mais eletronegativas, que é o caso do Glu336 que possui o grupo COO<sup>-</sup>. O terceiro resíduo mais importante, Tyr339, possui energia de ligação com o AA0 de 14,1 kcal/mol devido a uma interação sigma-pi devido à presença de um anel aromático rico em elétrons na cadeia lateral desse aminoácido e caráter positivo da cauda do AA0.

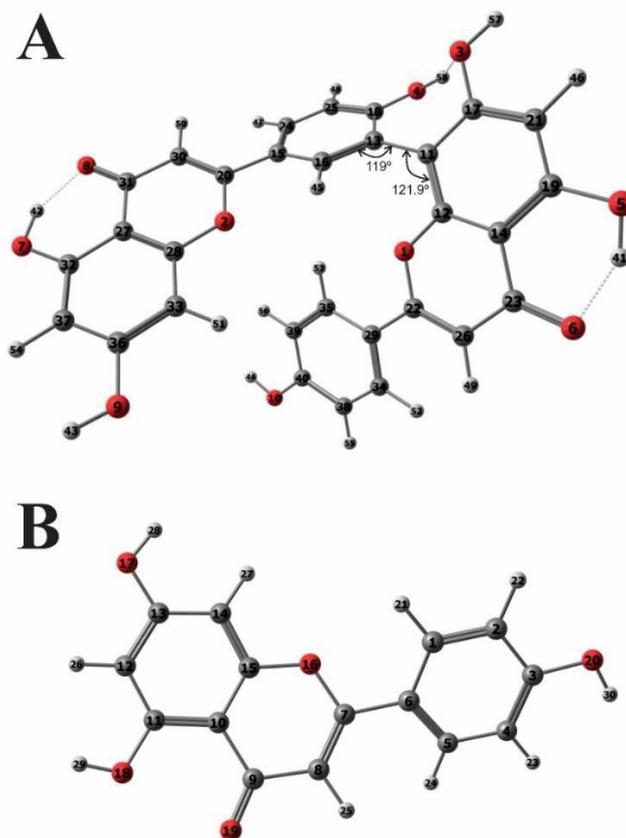
Podemos observar ainda, que o método utilizado para cálculo da energia de interação, foi capaz de descrever uma interação do tipo pi-pi entre os anéis aromático do AA0 e da cadeia lateral do resíduo His194, com intensidade de cerca de 5,0 kcal/mol. Os resíduos Thr167 e Thr226 interagem com o AA0 através de interação de hidrogênio de cerca de 12,0 kcal/mol e 13,0 kcal/mol, respectivamente. O hidrogênio do grupo OH do Thr167 interage com o oxigênio do grupo CO da região polar do AA0 que estão separados por uma distância de 1,95 Å e a outra ligação de hidrogênio é devido a interação do hidrogênio da hidroxila do resíduo Thr226 e o oxigênio do grupo hidroxílico do AA0. A Ser165 e Cys166 juntas criam uma região com um potencial eletrostático positivo o que acopla com a região da cauda hidrofóbica do AA0 que possui características eletronegativas fazendo assim aparecer uma interação atrativa relevante entre estes aminoácidos da ordem de 13,0 kcal/mol.

## **4.2 Estudo *in silico* do biflavonoide Amentoflavona**

### **4.2.1 Caracterização estrutural e eletrônica do biflavonoide Amentoflavona**

A Figura 32 mostra as estruturas otimizadas para amentoflavona (1A) e apigenina (1b) calculadas pelo método DFT usando o funcional B3LYP e o conjunto de bases 6-31G (d, p). As energias eletrônicas mínimas para essas duas moléculas são respectivamente -1905,272361641479 Eh e -953,205695677572 Eh. As duas moléculas de apigenina reagem para produzir uma molécula de amentoflavona através da formação de uma ligação covalente entre C14 para uma molécula de apigenina e C2 para a outra. Quando as duas estruturas monoméricas estão ligadas, a molécula de dímero não é plana, como pode ser visto na Figura 1, existe uma cavidade entre os dois monômeros com os ângulos C11-C12-C13 de 121,9° e C11-C13-C16 de 119°, portanto, a estrutura A é estável nessa configuração devido à ligação intramolecular de hidrogênio entre O3-H58, O6-H41 e O8-H42. Esta cavidade pode ter uma importante implicação biológica, sendo possível interagir com um resíduo de aminoácido ou pode ser mais estabilizada por moléculas de solvente. Esses dados são corroborados pelo estudo de PAN *et al.*, 2005.

Figura 32 - Estruturas otimizadas para amentoflavona (A) e apigenina (B) calculadas pelo método DFT usando B3LYP funcional e conjunto de bases 6-31G (d, p).



Fonte: Elaborada pela autora

#### 4.2.2 Infravermelho e análise Termodinâmica

De acordo com estudos experimentais a espectroscopia no infravermelho é um dos métodos eficientes para caracterizar a estrutura molecular. Neste trabalho, o espectro infravermelho é usado para verificar se a geometria calculada para a amentoflavona está localizada nos mínimos verdadeiros da energia potencial. Os números de onda experimentais do espectro infravermelho da amentoflavona foram obtidos no trabalho de YEH *et al.*, 2012 e foram correlacionados com os números de onda calculados na fase gasosa, como pode ser visto na Tabela 2. Como resultado da correlação eletrônica e das deficiências do conjunto de bases (ARJUNAN; MOHAN, 2009)(ZEROKA; JENSEN; SAMUELS, 1999)(ZACHARIAS *et al.*, 2018), os números de onda teóricos são frequentemente, mais altos que os valores correspondentes experimentais. Para reduzir a discrepância do valor teórico para o experimental, um fator de escala apropriado é introduzido medindo-se explicitamente as correções anarmônicas. Os números de onda teóricos foram dimensionados em 0,962 no nível B3LYP / 6-31G (d, p) usando o software MoCalc 2012 v4.2.0.1 (DEPIZZOL *et al.*, 2005).

Considerando o principal modo vibracional em cada número de onda: a banda de  $938\text{ cm}^{-1}$  é a curvatura de O5-H41 para fora do plano molecular; a banda a  $1110\text{ cm}^{-1}$  é a flexão no plano de C21-H46, O3-H57, C16-H45 e C24-H47; a banda a  $1178\text{ cm}^{-1}$  é a flexão no plano molecular de C33-H51 e O9-H43; a banda a  $1247\text{ cm}^{-1}$  é a flexão no plano de O4-H58, C25-H48, C16-H45 e C30-H50; a banda a  $1327\text{ cm}^{-1}$  é a dobra no plano de O5-H41, C26-H49 e C34-H52; a banda a  $1539\text{ cm}^{-1}$  é a curvatura no plano dos hidrogênios do anel aromático C16-H45 e C25-H48; a banda em  $1557\text{ cm}^{-1}$  é a curvatura no plano de O7-H42; a banda em  $1657\text{ cm}^{-1}$  é a curvatura no plano de O5-H41; a banda a  $1672\text{ cm}^{-1}$  é o alongamento assimétrico de C28-C33-C36, C27-C32-C37 e a flexão no plano de O7-H42, O9-H43 e o alongamento do grupo carbonil C31-O8; a banda a  $1716\text{ cm}^{-1}$  é a dobra no plano de O7-H49 e o alongamento do grupo carbonil C31-O8; as bandas de  $3560\text{ cm}^{-1}$ ,  $3014\text{ cm}^{-1}$  e  $2942\text{ cm}^{-1}$  estão relacionadas ao grupo hidroxila que se estende por O4-H58, O7-H42 e O5-H41, respectivamente.

A partir dos resultados abaixo (Tabela 2), os números de onda calculados estão em concordância satisfatória com os números de onda experimentais, mostrando um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,9993 (Figura 33) e demonstraram

que a estrutura teórica otimizada da amentoflavona descreve a estrutura molecular real.

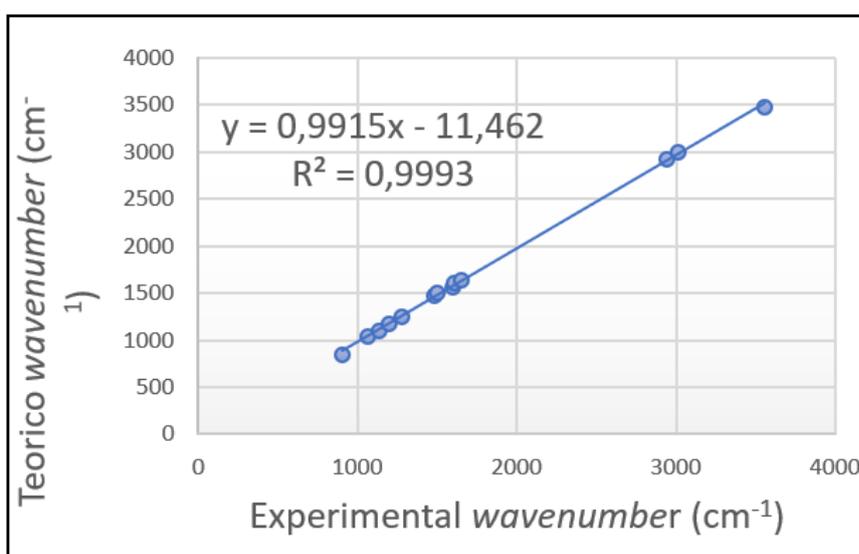
Tabela 2 - Os assinalamentos (wavenumbers) de IR calculados e experimentais e suas atribuições de amentoflavona

Calculado wavenumber B3LYP/6-31G(d,p)	Calculado wavenumber at B3LYP/6-31G(d,p) usando fator de escalonamento	Experimental wavenumber FT-IR (YEH <i>et al.</i> , 2012)	Assinalamentos teóricos
938	902	842	$\gamma$ O5-H41
1110	1068	1040	$\delta$ C21-H46 + $\delta$ O3-H57 + $\delta$ C16-H45 + $\delta$ C24-H47 + $\delta$ C39-H56 + $\delta$ C35-H53 + $\delta$ C34-H52 + $\delta$ O5-H41 + $\nu_s$ C14-C12-O1 + $\nu$ C23-C26 + $\nu_s$ C21-C17-O3
1178	1134	1102	$\delta$ C33-H51 + $\delta$ O9-H43 + $\delta$ C37-H54 + $\delta$ C30-50
1247	1199	1172	$\delta$ O16-H45 + $\delta$ O3-H57 + $\delta$ O4-H58 + $\delta$ C25-H48 + $\delta$ C30-H50 + $\delta$ C24-H47 + $\delta$ C37-H54 + $\delta$ O9-H43
1327	1277	1251	$\delta$ O3-H57 + $\delta$ C16-H45 + $\delta$ O5-H41 + $\delta$ C26-H49 + $\delta$ C34-H52 + $\delta$ C35-H53 + $\delta$ C3-H56 + $\nu$ C40-O10
1539	1481	1465	$\delta$ O7-H42 + $\delta$ O5-H41 + $\delta$ O3-H57 + $\delta$ C16-H45 + $\delta$ C21-H46 + $\delta$ C25-H48 + $\delta$ C24-H47
1557	1498	1504	$\delta$ O7-H42 + $\delta$ C37-H54 + $\delta$ O9-H43 + $\delta$ C33-H51 + $\nu$ C33-C36
1657	1594	1567	$\delta$ H41-O5-C19 + $\delta$ H57-O3-C17 + $\nu_{as}$ C21-C17-C11 + $\nu_{as}$ C19-C14-C12 + $\nu$ C26-C27 + $\delta$ C26-H49 + $\delta$ H44-O10-C40
1672	1609	1605	$\delta$ O5-H41 + $\delta$ C16-H45 + $\delta$ C25-H48 + $\delta$ C30-H50 + $\delta$ C38-H55 + $\delta$ C35-H53 + $\delta$ C33-H51 + $\delta$ C37-H54 + $\delta$ O9-H43 + $\delta$ O7-H42 + $\nu_{as}$ C28-C33-C36 + $\nu_{as}$ C27-C32-C37 + $\nu$ C31-O8
1716	1650	1644	$\delta$ H41-O5-C19 + $\delta$ H42-O7-C32 + $\nu$ C31-O8 + $\nu$ C23-O6 + $\nu$ C19-C21+

			$\nu\text{C32-C37} + \delta\text{C37-H54} + \delta\text{C30-H50} + \delta\text{C26-H49} + \delta\text{C21-H46}$
3058	2942	2923	$\nu\text{O5-H41}$
3133	3014	2993	$\nu\text{O7-H42}$
3700	3560	3475	$\nu\text{O4-H58}$

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 33 - Coeficiente de correlação entre o espectro infravermelho teórico e experimental da amentoflavona.



Fonte: Elaborada pela autora

As propriedades termodinâmicas são muito significativas nos estudos de espécies químicas, uma vez que estão diretamente relacionadas à formação do próprio composto. A energia livre de Gibbs é usada para determinar a estabilidade termodinâmica, uma vez que utiliza os fatores energéticos e entrópicos. Uma molécula mais estável tem um valor mais baixo de energia livre de Gibbs. Assim, como observado nos resultados da Tabela 3, o valor para amentoflavona é mais baixo que para a apigenina, o que implica que a dimerização da apigenina para produzir a molécula de amentoflavona é termodinamicamente favorável.

Tabela 3 - Propriedades termodinâmicas calculadas da Amentoflavona e Apigenina pelo método B3LYP / 6-31G (d, p)

Propriedade	Energia Interna (U/Eh)	Entalpia (H/Eh)	Entropia (S/Eh)	Energia livre de Gibbs (G/Eh)
Amentoflavona	-1904,81718	-1904,81624	0,000301	-1904,90605
Apigenina	-952,96864	-952,96769	0,000197	-953.02655

Fonte: Elaborada pela autora

#### 4.2.3 Orbitais de Fronteira e Descritores de Reatividade

Os descritores de reatividade calculados para as moléculas de amentoflavona e apigenina são mostrados na Tabela 4. Os resultados dos descritores da amentoflavona estão de acordo com estudo realizado por (PAN *et al.*, 2005).

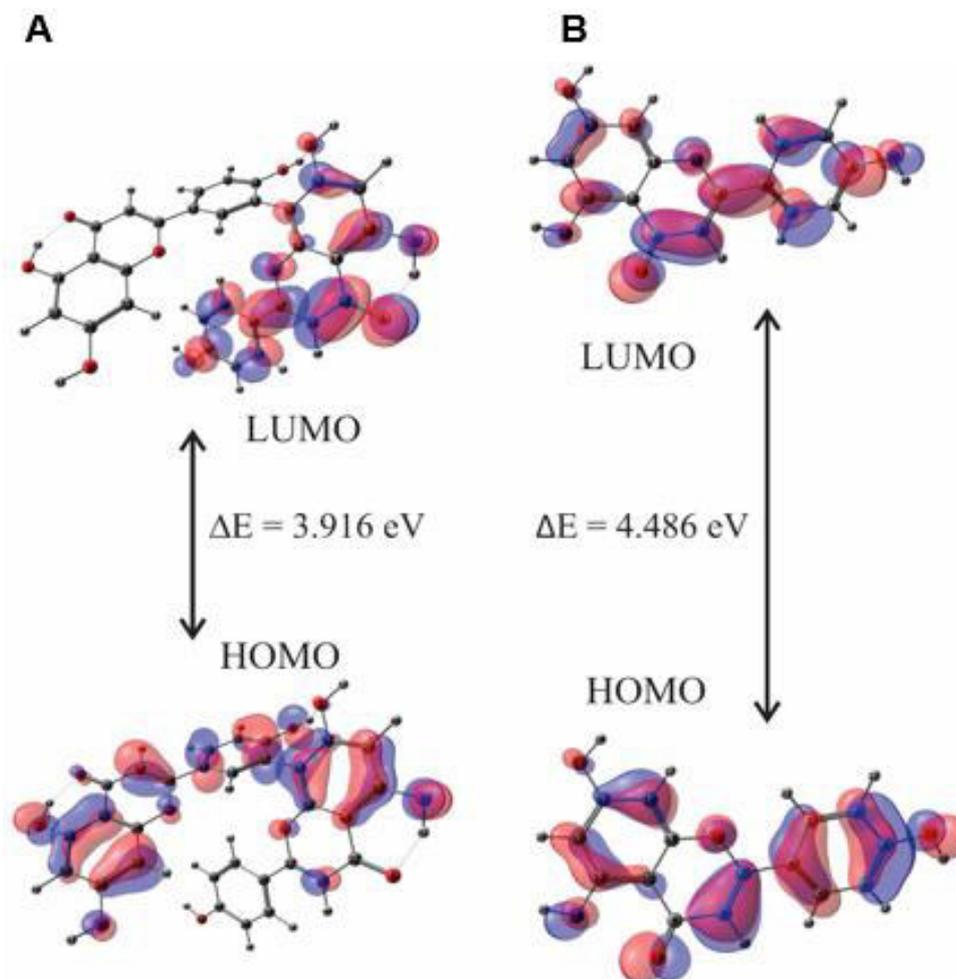
Tabela 4 - Valores calculados de energia de Amentoflavona pelo método B3LYP / 6-31G (d, p)

Descritor de Reatividade	Amentoflavona	Apigenina
$E_{HOMO}$ (eV)	-5,809	-5,770
$E_{LUMO}$ (eV)	-1,894	-1,284
$\Delta E_{Gap}$ (eV)	3,916	4,486
I (eV)	5,809	5,770
A (eV)	1,894	1,284
$\chi$ (eV)	3,852	3,527
$\mu$ (eV)	-3,852	-3,527
$\eta$ (eV)	3,916	4,486
S ( $eV^{-1}$ )	0,255	0,223
$\omega$ (eV)	1,894	1,386
$\varepsilon$ ( $eV^{-1}$ )	0,528	0,721

Fonte: Elaborada pela autora

Apesar do orbital HOMO da apigenina ter valor energético  $E_{HOMO} = -5,770 \text{ eV}$ ) ligeiramente superior ao orbital HOMO da amentoflavona ( $E_{HOMO} = -5,809 \text{ eV}$ ), sugerindo que o elétron de valência da apigenina está mais disponível para reagir do que amentoflavona. No entanto, o orbital LUMO da amentoflavona tem um valor energético ( $E_{LUMO} = -1,894 \text{ eV}$ ) menor que o orbital LUMO da apigenina ( $E_{LUMO} = -1,284 \text{ eV}$ ), o que significa que a amentoflavona é mais suscetível a aceitar um elétron (ou densidade eletrônica, portanto a molécula de amentoflavona deve ser mais reativa que a apigenina. Essa tendência pode ser observada usando o gap de energia ( $\Delta E_{Gap}$ ), pois a reatividade de uma espécie química está diretamente relacionada à menor diferença de energia (menor gap de energia). O gap de energia da amentoflavona ( $\Delta E_{Gap} = 3,916 \text{ eV}$ ) é menor que o gap de energia da apigenina ( $\Delta E_{Gap} = 4,486 \text{ eV}$ ), o que implica em mais reatividade química à amentoflavona, como visto na figura 34.

Figura 34 - Orbitais de fronteira e gap ( $\Delta E_{\text{Gap}}$ ) de Amentoflavona (A) e Apigenina (B).



Fonte: Elaborada pela autora

Nesta perspectiva, devido ao menor valor de energia orbital HOMO, a amentoflavona mantém seus elétrons mais fortes que a apigenina, o que corresponde a uma maior energia de ionização, como visto na Tabela 4. A molécula de amentoflavona possui uma afinidade eletrônica mais alta ( $A = 1,894 \text{ eV}$ ) do que a apigenina ( $A = 1,284 \text{ eV}$ ) devido ao menor valor energético do orbital LUMO, como descrito acima.

Ambas as moléculas demonstraram estabilidade química devido ao valor negativo do potencial químico. De acordo com a teoria HSAB de Pearson (PEARSON, 1963)(PARR; PEARSON, 1983)(PEARSON, 1990), ocorre uma interação favorável entre dois compostos quando ambas são moléculas duras ou moles, portanto a

molécula de apigenina é considerada dura devido ao valor da dureza global ( $\eta = 4,486$  eV) ou baixo valor da suavidade global ( $S = 0.223$  eV<sup>-1</sup>) e a reação entre eles, em consequência, a formação de amentoflavona, é favorável. Ambos os descritores de reatividade, eletronegatividade e índice de eletrofilicidade para amentoflavona ( $\chi = 3.852$  eV e  $\omega = 1,894$  eV), têm um valor mais alto do que para apigenina ( $\chi = 3,527$  eV and  $\omega = 1,386$  eV).

Portanto, a molécula de amentoflavona é mais suscetível a aceitar a densidade eletrônica, sendo uma boa espécie eletrofílica e a molécula de apigenina devido ao maior valor do índice de nucleofilicidade ( $\varepsilon = 0.721$  eV<sup>-1</sup>) tem bom poder de doação de elétrons.

#### 4.2.4 Funções condensadas de Fukui, descritores duplos e multifílicos

Os resultados relacionados às funções condensadas de Fukui, descritores duplos e multifílicos são mostrados na Tabela 5 para amentoflavona.

Tabela 5 - Função Fukui condensada da amentoflavona

Átomo	$f_k^+$	$f_k^-$	$\Delta f$	$\Delta \omega$
O1	-0,01573	-0,00579	-0,00994	-0,01883
O2	-0,00797	-0,00696	-0,00101	-0,00191
O3	-0,01454	-0,01222	-0,00232	-0,00439
O4	-0,02178	-0,03874	0,016965	0,032132
O5	-0,02883	-0,04687	0,018043	0,034173
O6	-0,05824	-0,02689	-0,03135	-0,05937
O7	-0,02178	-0,04389	0,022118	0,041891
O8	-0,0445	-0,02967	-0,01482	-0,02808
O9	-0,01266	-0,02195	0,009293	0,017601
O10	-0,0284	-0,02315	-0,00525	-0,00994
C11	-0,00862	-0,02632	0,017708	0,033539
C12	-0,0032	-0,00804	0,004833	0,009154
C13	-0,00348	-0,02018	0,016695	0,03162

C14	-0,00522	-0,01489	0,009674	0,018323
C15	-0,00849	-0,02082	0,012325	0,023344
C16	-0,00656	-0,00734	0,00078	0,001477
C17	-0,01967	-0,01477	-0,00489	-0,00927
C18	-0,02347	-0,03056	0,007093	0,013434
C19	-0,02167	-0,02571	0,004043	0,007657
C20	-0,02943	-0,01016	-0,01927	-0,0365
C21	-0,02099	-0,02608	0,00509	0,00964
C22	-0,04865	-0,00819	-0,04046	-0,07663
C23	-0,04381	-0,00819	-0,03563	-0,06748
C24	-0,02333	-0,02711	0,003782	0,007163
C25	-0,01756	-0,02186	0,004295	0,008135
C26	-0,03067	-0,03182	0,001153	0,002184
C27	-0,00349	-0,01866	0,01517	0,028732
C28	-0,00054	-0,00544	0,00490	0,009281
C29	-0,00994	-0,00621	-0,00373	-0,00706
C30	-0,02358	-0,04342	0,019847	0,03759
C31	-0,03102	-0,00955	-0,02148	-0,04068
C32	-0,0148	-0,02184	0,007046	0,013345
C33	-0,00442	-0,03781	0,033386	0,063233
C34	-0,02418	-0,01092	-0,01326	-0,02512
C35	-0,01964	-0,00076	-0,01888	-0,03575
C36	-0,01419	-0,01789	0,003703	0,007013
C37	-0,01625	-0,0224	0,006149	0,011646
C38	-0,02136	-0,0167	-0,00466	-0,00883
C39	-0,01394	-0,00693	-0,007	-0,01327
C40	-0,03341	-0,01619	-0,01722	-0,03261
H41	-0,00956	-0,01116	0,001594	0,003019
H42	-0,00738	-0,01071	0,003334	0,006315

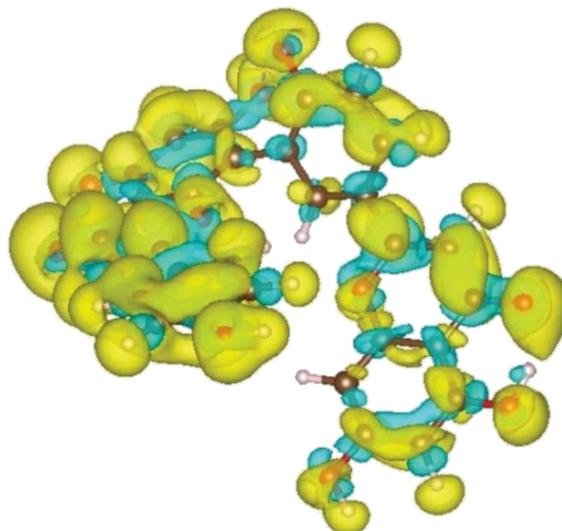
H43	-0,00984	-0,01333	0,003491	0,006612
H44	-0,01224	-0,00789	-0,00435	-0,00824
H45	-0,00342	-0,00655	0,003134	0,005936
H46	-0,01689	-0,01771	0,000817	0,001547
H47	-0,01317	-0,0148	0,00163	0,003087
H48	-0,01531	-0,01781	0,002502	0,004739
H49	-0,0177	-0,01497	-0,00273	-0,00516
H50	-0,01371	-0,01693	0,003219	0,006097
H51	-0,00109	-0,01237	0,011278	0,021361
H52	-0,01354	-0,0083	-0,00525	-0,00994
H53	-0,00567	0,002696	-0,00836	-0,01584
H54	-0,01353	-0,01692	0,003386	0,006413
H55	-0,01756	-0,01294	-0,00462	-0,00876
H56	-0,01047	-0,0039	-0,00658	-0,01245
H57	-0,01222	-0,01272	0,000498	0,000943
H58	-0,00672	-0,01078	0,004069	0,007707

Fonte: Elaborada pela autora

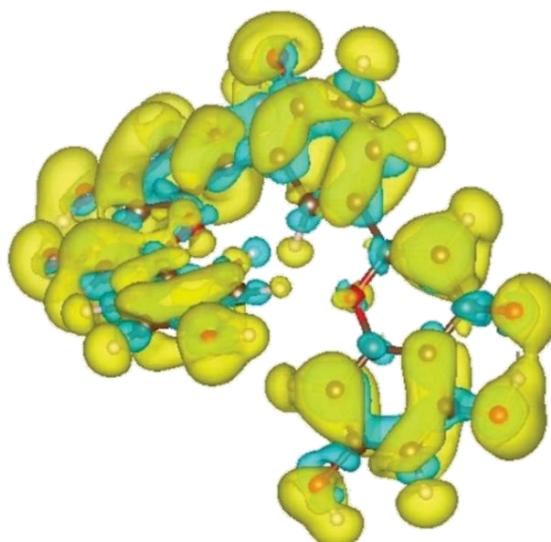
O gráfico usando o software VESTA 3 (MOMMA; IZUMI, 2011) de Fukui condensado funciona para ataque nucleofílico ( $f^+$ ), para ataque eletrofílico ( $f^-$ ) e para o descritor duplo ( $\Delta f$ ) são mostrados na Figura 35a, Figura 35b e Figura 36, respectivamente.

Figura 35 - Isosuperfícies da função condensada da amentoflavona para ataque nucleofílico (f+)(a) e ataque eletrofílico (f-) (b).

(a)

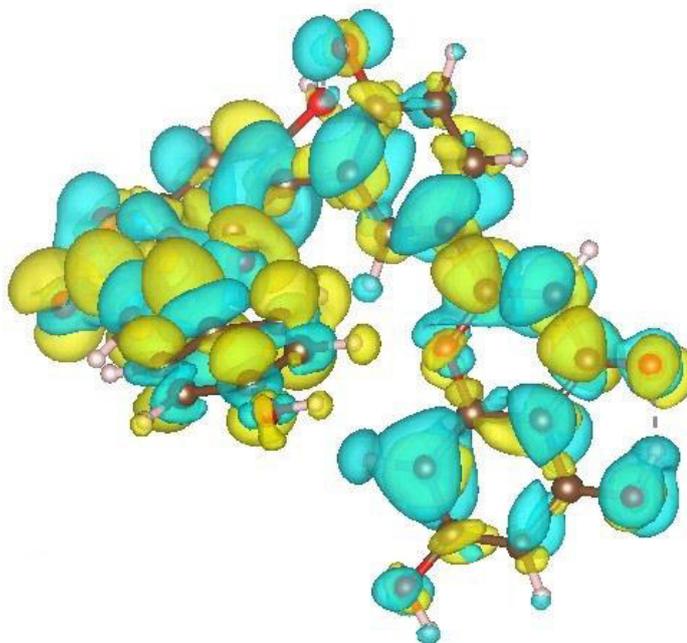


(b)



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 36 - Isosuperfícies da função Fukui condensada da amentoflavona para o descritor duplo ( $\Delta f$ ).



Fonte: Elaborada pela autora

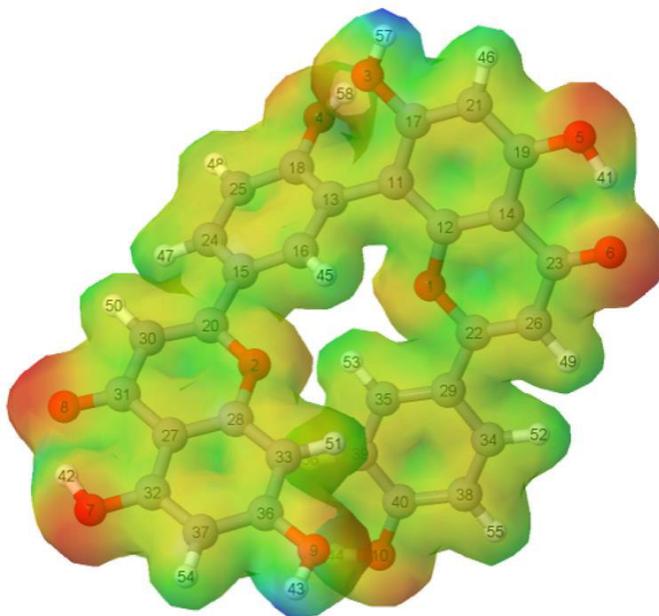
Os *cube files* foram gerados pelo software Multiwfn (LU; CHEN, 2012). As superfícies amarela e azul correspondem aos sinais negativo e positivo da função condensada e da função descritor duplo, respectivamente. Sendo possível concluir que os seguintes átomos O4, O5, O7, O9, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C18, C19, C21, C24, C25, C26, C27, C28, C30, C32, C33, C36 e C37 demonstram ter um sítio eletrofílico, ou seja, são propensos a ataques nucleofílicos porque possuem  $\Delta f$  e  $\Delta\omega > 0$ . Considerando que, O1, O2, O3, O6, O8, O10, C17, C20, C22, C23, C29, C31, C34, C35, C38, C39 e C40 exibem um sítio nucleofílico, isso significa que é propenso a ataques eletrofílicos porque possuem  $\Delta f$  e  $\Delta\omega < 0$ . Os átomos C22, C23 e O6 têm o maior valor de descritores duplos e multifílicos (em módulo) e são os mais suscetíveis ao ataque eletrofílico, embora o átomo C33 tenha o maior valor de  $\Delta f$  e  $\Delta\omega$  e seja o mais suscetível ao ataque nucleofílico.

#### 4.2.5 Mapa de Superfície do Potencial eletrostático da amentoflavona

O diagrama do Potencial Eletrostático Molecular (MESP) é uma ferramenta útil para analisar a distribuição de carga na molécula. O MESP está associado à densidade total de elétrons. É usado para prever os locais eletrofílicos ou nucleofílicos na molécula, incluindo a possibilidade de formar ligações de hidrogênio. O esquema de cores foi usado para a superfície MESP da seguinte maneira: cor azul para uma região deficiente em elétrons ou carga parcialmente positiva; cor verde para uma região levemente deficiente em elétrons; cor amarela para uma região levemente rica em elétrons; cor vermelha para uma região rica em elétrons ou carga parcialmente negativa. As regiões com carga negativa estão relacionadas ao ataque eletrofílico. As regiões carregadas positivamente estão associadas ao ataque nucleofílico (MEHRI *et al.*, 2018).

O diagrama MESP calculado no nível de B3LYP / 6-31G (d, p) para amentoflavona é mostrado na Figura 37. As regiões ricas em elétrons estão principalmente sobre os átomos de oxigênio e esses átomos são as regiões mais favorecidas para ataques eletrofílicos. Esse resultado já era esperado devido à análise de Fukui na seção acima. Os átomos de oxigênio O1, O2, O3, O6, O8, O10 são mais propensos a serem submetidos a ataques eletrofílicos. As regiões com deficiência de elétrons estão espalhadas pelos átomos de hidrogênio. A carga positiva sobre os átomos de hidrogênio H41, H58 e H52 é menor do que para os outros devido à estabilização das ligações de hidrogênio. Esses resultados são corroborados por (PAN *et al.*, 2005).

Figura 37 - Mapa de superfície do potencial eletrostático do biflavonoide amentoflavona



Fonte: Elaborada pela autora

#### 4.2.6 Docking molecular da amentoflavona e alvos enzimáticos

As simulações de docking molecular, são um conjunto de algoritmos computacionais que tentam identificar as interações não covalentes de macromoléculas ou, mais frequentemente, de uma macromolécula (receptor) e uma molécula pequena (ligante), tendo como principal objetivo, prever as conformações das ligações e a afinidade de ligação (energia) (TROTT; OLSON, 2010).

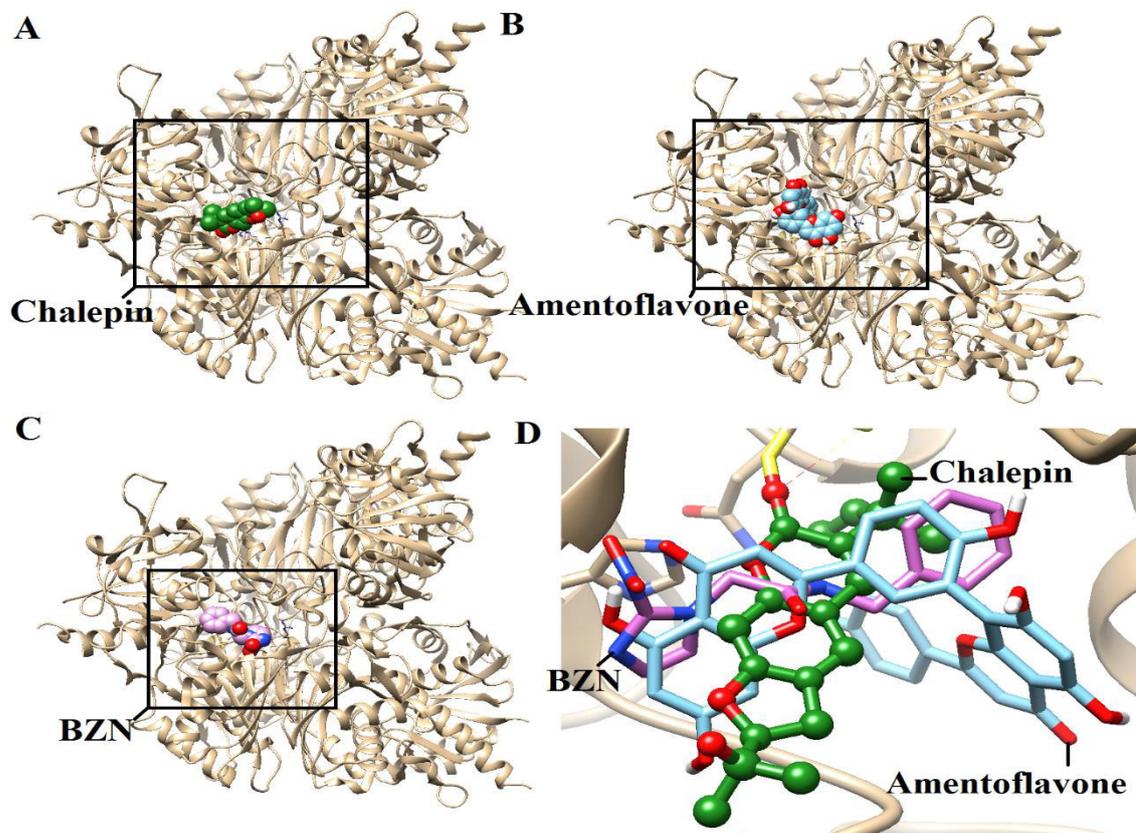
O docking molecular analisa a afinidade de um ligante ao sítio de ligação de um receptor, em que as conformações ativas de moléculas e enzimas exibem complementaridade geométrica e química, as quais são essenciais para o sucesso de tratamentos terapêuticos (ALENCAR, S. A., 2010; DA SILVA-JUNIOR *et al.*, 2017). Como critério de validação das rotinas foi utilizado o desvio médio quadrático (RMSD), tendo como parâmetro ideal, valores inferiores a 2.0 Å (HUEY R., MORRIS M.G., OLSON J.A., 2007; YUSUF *et al.*, 2008), foi possível observar que a amentoflavona apresentou valores ideais em todas as simulações (RMSD: TcGAPDH = 1.379 Å; Cruzaína = 0.990 Å e Tripanotiona redutase = 1.758 Å).

Ainda como critério de validação utilizou-se os valores de energia de afinidade, com valores de referência menores que -6.0 kcal/mol (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014). A amentoflavona, também apresentou resultados ideais em todas as simulações em relação à afinidade (Afinidade: TcGAPDH = -10.1 kcal/mol; Cruzaína = -8.0 kcal/mol e Tripanotiona redutase = -9.4 kcal/mol), tendo em vista que quanto menor for o valor da afinidade da conformação do ligante no acoplamento molecular, mais favorável será a ligação encontrada (RASCHKA, 2014).

Ao conjunto de resíduos de aminoácidos diretamente relacionados à reação de catálise de uma proteína, foi chamado de sítio catalítico, o qual entende-se por regiões na superfície de uma enzima, modeladas especificamente para interagir com outras moléculas. A busca pelo sítio ativo configura-se como uma forma de prever a função de uma proteína (SANKARARAMAN *et al.*, 2010).

Inicialmente, ao visualizar os acoplamentos com a TcGAPDH de forma comparativa, foi possível observar que a amentoflavona e BZ ficaram muito próximos ao sítio de ligação da chalepina, um potente inibidor da TcGAPDH (Figura 38), sugerindo um potencial de interferência na atividade dessa enzima. Amentoflavona apresentou interação com oito resíduos de aminoácidos (Ile13, Pro136, Cys166, Thr167, His194, Thr197, Asp210, Arg249), no qual pode-se destacar a interação com o sítio catalítico (Cys166, Thr167, His194, Asp210 e Arg249) que apresentaram interações do tipo Pi-Alquil e ligações de hidrogênio convencionais, com uma distância de 3.7 Å, 3.0 Å, 3.3 Å, 6.5 Å e 3.3 Å, respectivamente (Tabela 6), todas com valores inferiores ao BZ, sendo um indicativo de melhor acoplamento.

Figura 38 - Complexos TcGAPDH cristalizados com chalepin (a). Acoplamento entre TcGAPDH e Amentoflavona (b), Benznidazol (BZ) (c) e local de ligação da amentoflavona, BZ e chalepin no TcGAPDH (d).



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: BZN – benznidazol.

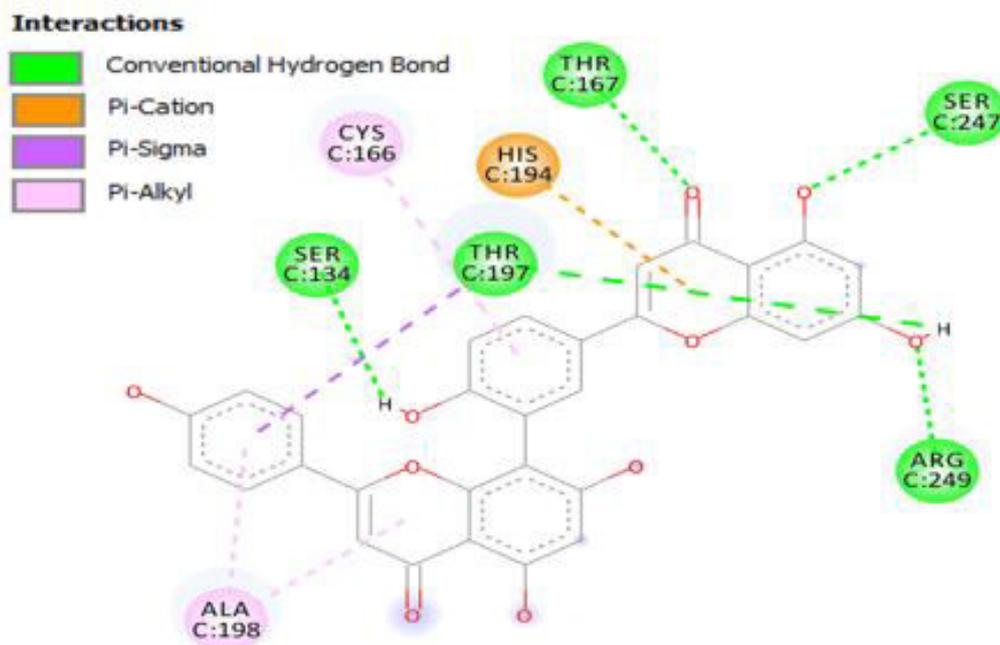
Tabela 6 - Distâncias dos ligantes Amentoflavona, Benznidazol, chalepina dos resíduos de aminoácidos da TcGAPDH

TcGAPDH resíduos	Ligantes		
	Amentoflavona	Benznidazol	Chalepina (BRZ)
Ile13	4.1 Å	3.6 Å	5.4 Å
<u>Pro136</u>	4.4 Å	5.5 Å	6.3 Å
<u>Cys166</u>	3.7 Å	3.8 Å	1.2 Å
<u>Thr167</u>	3.0 Å	4.1 Å	3.7 Å
<u>His194</u>	3.3 Å	3.3 Å	3.2 Å
Thr197	2.9 Å	5.0 Å	4.4 Å
<u>Asp210</u>	6.5 Å	7.5 Å	3.7 Å
<u>Arg249</u>	3.3 Å	5.0 Å	3.3 Å

Fonte: Elaborada pela autora

Destacamos ainda a importância das interações tipo Pi-Alquil dos grupos aromáticos e alquílicos da amentoflavona e do resíduo Cys166, que tem sido considerado resíduo chave no estudo de substâncias com atividade tripanocida, indicando assim um forte indicativo de atividade antichagásica da Amentoflavona (Figura 39).

Figura 39 - Mapa 2D representativo das principais interações entre amentoflavona e resíduos de aminoácidos TcGAPDH.

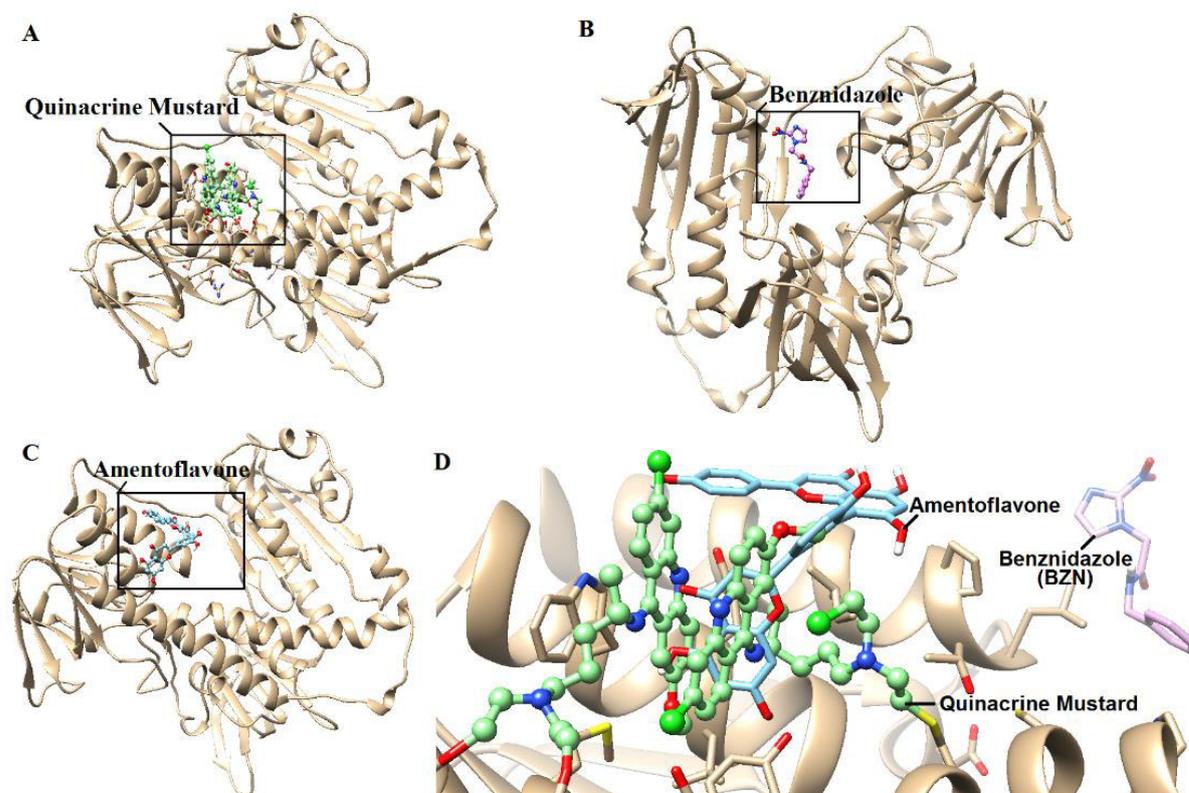


Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Resíduos de aminoácidos: CYS – cisteína; HIS – histidina; SER - serina; THR – treonina; ALA – alanina.

O segundo alvo analisado foi a tripanotona redutase, ao comparar os acoplamentos, pode-se observar que a amentoflavona encontra-se próxima à região do ligante quinacrine mustard, um inibidor irreversível da tripanotona redutase do *Trypanosoma cruzi* (SARAVANAMUTHU *et al.*, 2004) que está complexado na enzima (PDB 1GXF), mostrando-se próxima ao sítio catalítico (Figura 40). A amentoflavona interagiu com dez resíduos de aminoácidos, destacando a interação com o sítio catalítico (Glu19, Trp22, Ser110, Tyr111, Met114, Asp117 and Ile339) com a maioria dos valores de distâncias próximos aos do inibidor quinacrina mostarda (Tabela 7), mostrando ser potencialmente capaz de interferir na atividade dessa enzima.

Figura 40 - Tripanotona redutase complexada com (a) quinacrina mostarda. Docking entre tripanotona redutase e Benznidazol (BZ) (B) Amentoflavona (C) e local de ligação de Amentoflavona, BZ e quinacrina mostarda na Tripanotona Redutase (d).



Fonte: Elaborada pela autora

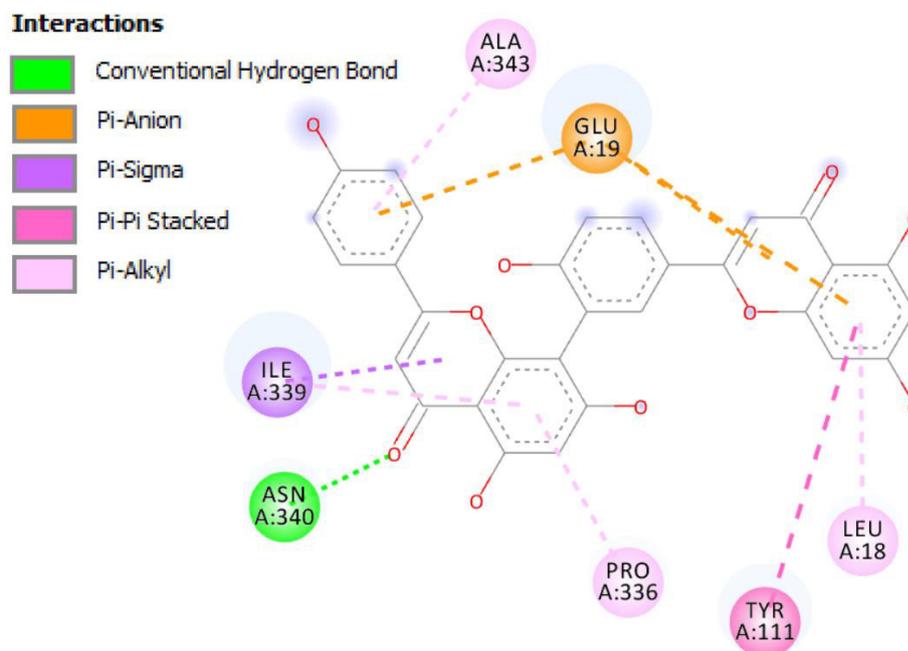
Tabela 7 - Distâncias entre os ligantes amentoflavona, Benznidazol, quinacrina mostarda e resíduos de aminoácidos de tripanotona redutase

Tripanotona Redutase resíduos	Ligante		
	Amentoflavona	Benznidazol	Quinacrine Mustard
Ser15	3.6 Å	13.4 Å	4.2 Å
<a href="#">Leu18</a>	3.4 Å	19.6 Å	3.2 Å
Glu19	3.5 Å	18.1 Å	2.7 Å
Trp22	3.7 Å	24.1 Å	3.5 Å
Ser110	8.2 Å	26.4 Å	4.2 Å
Tyr111	2.5 Å	19.5 Å	2.6 Å
Glu113	10.0 Å	29.6 Å	1.5 Å
<a href="#">Met114</a>	3.5 Å	26.1 Å	3.3 Å
Asp117	11.0 Å	33.0 Å	1.5 Å
Ile339	3.9 Å	12.6 Å	3.5 Å

A Figura 41 mostra os tipos de interações da amentoflavona com quatro resíduos de interesse: Glu 19 (Pi-ânion), Tyr 111 (Pi-Pi empilhado), Ile339 (Pi-Sigma

e Pi-álquil) e Leu18 (Pi-álquil) Vale ressaltar que o BZ aparece em outra região, mais distante do sítio ativo.

Figura 41 - Mapa 2D representativo das principais interações entre os resíduos de aminoácidos da amentoflavona e da tripanotona redutase.

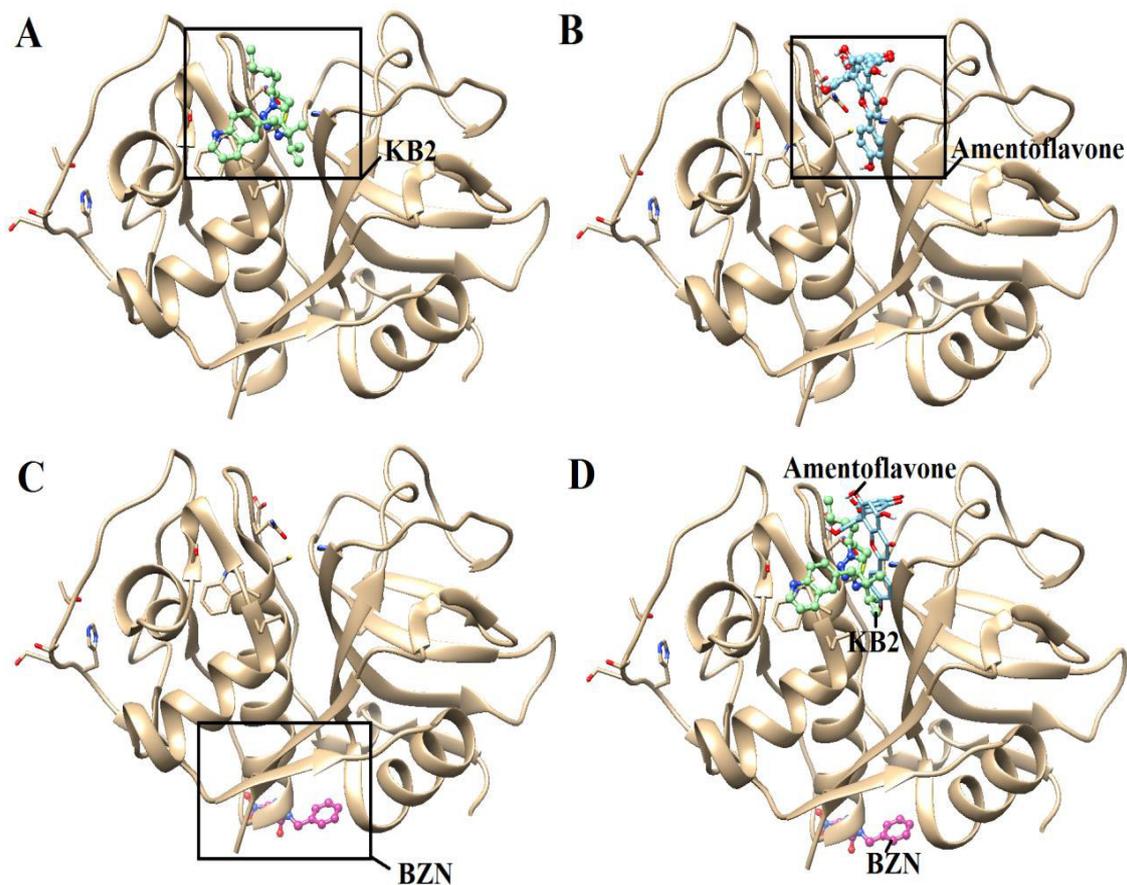


Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Resíduos de aminoácidos: ILE – isoleucina; GLU – ácido glutâmico; LEU - leucina; PRO – prolina; TYR – tirosina; ALA – alanina.

A cruzaina, terceiro alvo importante para a busca de novos agentes tripanocidas é a principal enzima cisteíno protease do *T. cruzi*, fundamental para a replicação intracelular do parasito (BRAK K., KERR I.D., BARRET K.T., FUCHI N., DEBNATH M., ENGEL J.C., MCKERROW J.H., DOYLE P.S., BRINEN L.S., 2011). Os resultados do docking molecular da amentoflavona e a cruzaina, bem como os acoplamentos comparativos com o BZ e o inibidor (KB2) complexado com a enzima (PDB 3IUT), mostram a amentoflavona na região próxima ao sítio de ligação do KB2 (Figura 42), inferindo um potencial efeito inibitório da cruzaina.

Figura 42 - Complexos de cruzaina com inibidor de tetrafluorofenoximetil cetona (KB2) (A), amentoflavona (B), Benznidazol (BZ) (C) e sítio de ligação da amentoflavona, BZ e KB2 na cruzaina (D).



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: BZN – benznidazol; KB2 – inibidor tetrafluorofenoximetil cetona.

A cruzaina possui um sítio catalítico onde se destacam os resíduos (Glu208, Gly66, Asp161, Gln19, His162, Cys25), com distâncias de 4.7 Å , 4.5 Å , 4.2 Å , 3.8 Å , 3.8 Å e 4.0 Å, respectivamente (Tabela 8). Destacamos ainda, os resíduos Ser61 e Trp184 que possuem um importante papel na ligação dos inibidores (BRACK, KERR I.D., BARRET K.T., FUCHI N., DEBNATH M., ENGEL J.C., MCKERROW J.H., DOYLE P.S., BRINEN L.S., 2011; SAJID *et al.*, 2011).

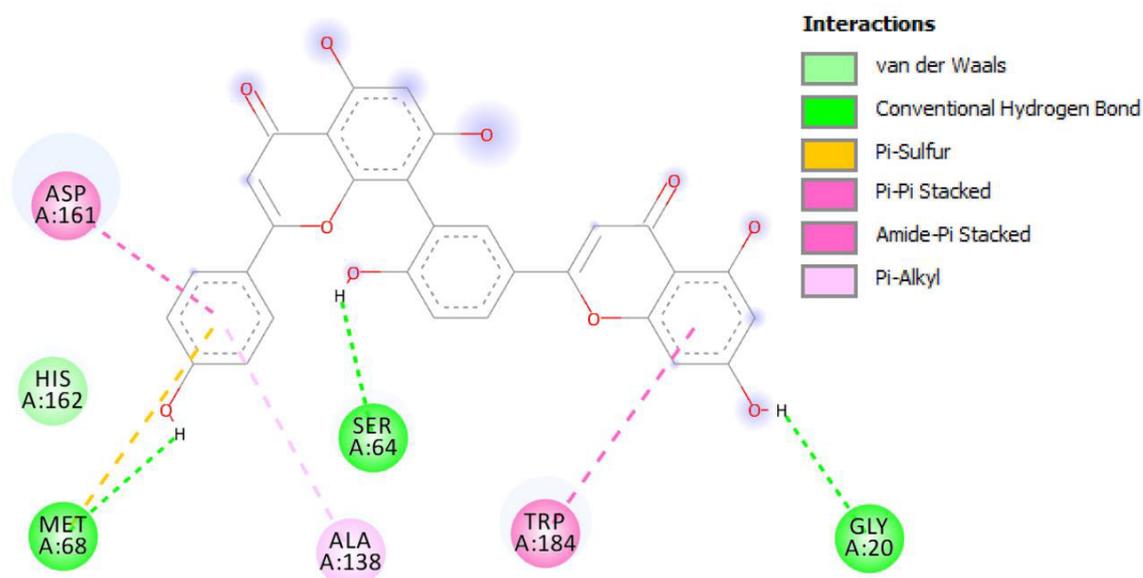
Tabela 8 – Distâncias entre os ligantes amentoflavona, Benznidazol, KB2 e os resíduos de aminoácidos da cruzaina

Cruzaina resíduos	Ligantes		
	Amentoflavona	Benznidazol	KB2
Gln19	3.8 Å	26.4 Å	3.1 Å
<u>Cys25</u>	4.0 Å	23.8 Å	1.8 Å
Ser61	6.7 Å	33.3 Å	2.8 Å
Gly65	3.6 Å	30.4 Å	3.2 Å
Gly66	4.5 Å	28.3 Å	2.9 Å
Leu67	5.6 Å	25.0 Å	3.9 Å
Asp161	4.2 Å	30.2 Å	3.4 Å
<u>His162</u>	3.8 Å	26.0 Å	3.3 Å
Asn182	6.8 Å	20.3 Å	7.7 Å
Trp184	3.4 Å	26.9 Å	6.3 Å
Glu208	4.7 Å	22.6 Å	4.0 Å

Fonte: Elaborada pela autora

Baseando-se na simulação que apresentou menor distância entre o ligante e o sítio catalítico, foram avaliadas as interações entre a amentoflavona e cruzaina, onde se destaca as interações não covalentes entre os anéis aromáticos ( $\pi$ - $\pi$ ) com os resíduos Asp161 e Trp184, indicando uma importante via de inibição, ressaltada pela interação com o resíduo His162 (interação de van der Waals) (Figura 43).

Figura 43 - Mapa 2D representativo das principais interações entre amentoflavona e resíduos de aminoácidos da cruzaína.



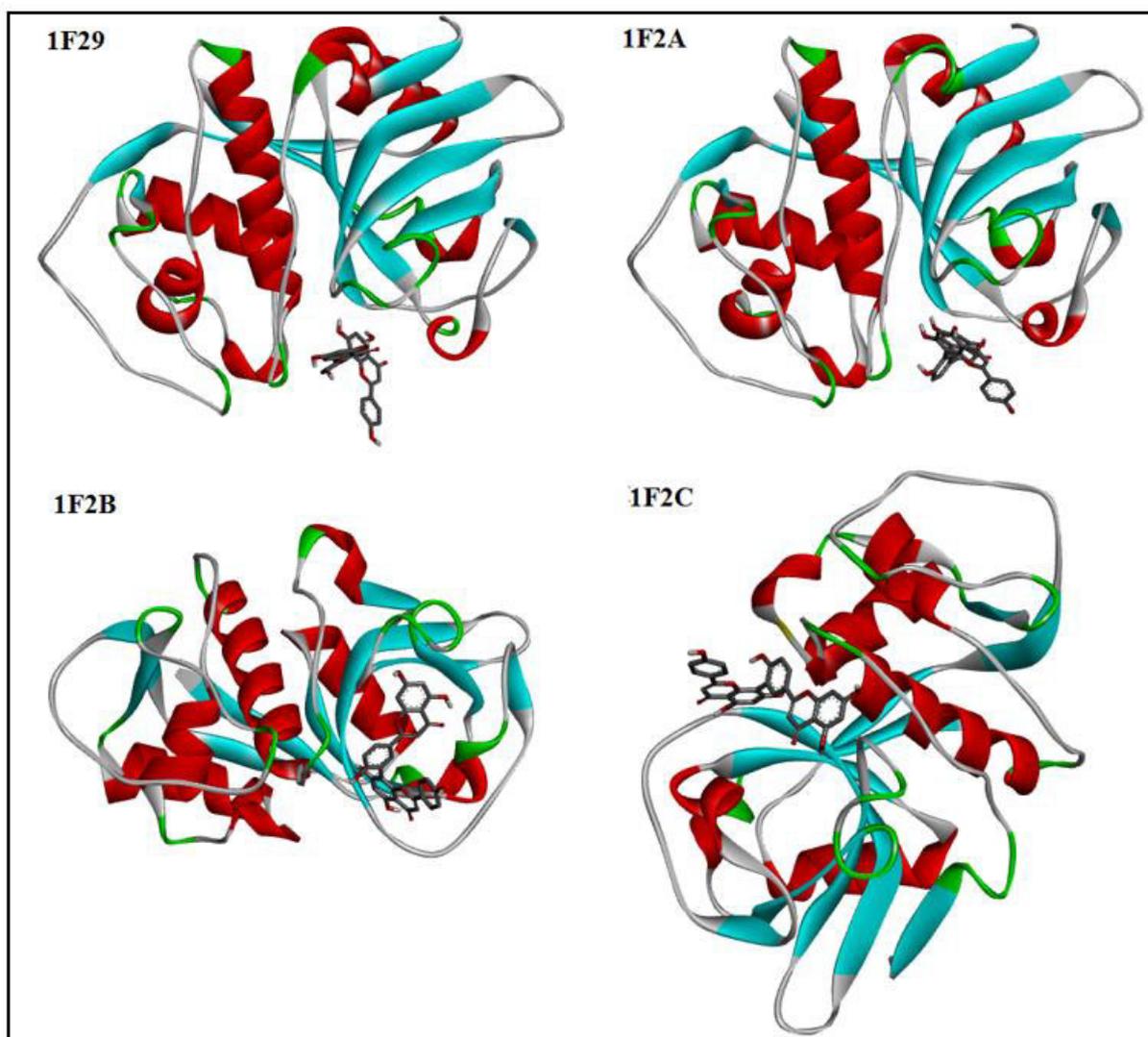
Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Resíduos de aminoácidos: HIS – histidina; GLY – glicina; ASP - ácido aspártico; TRP – triptofano; SER – serina; ALA – alanina.

#### 4.2.7 Docking molecular da amentoflavona e cruzaína (PDB 1F29, 1F2A, 1F2B, 1F2C)

No acoplamento molecular da cruzaína (Figura 44) com a amentoflavona, foi analisado o desvio existente entre o ligante e a proteína, onde o valor do desvio médio quadrático entre as estruturas foi RMSD 0,970 Å, afinidade de -8,0 kcal/mol e 9 torções ativas. Para a 1F2A: RMSD 1,025 Å, afinidade de -8,1 kcal mol<sup>-1</sup> e 9 torções ativas. Já no acoplamento molecular da cruzaína (1F2B) o valor de RMSD entre as estruturas foi: RMSD 1,060 Å, afinidade de -8,3 kcal mol<sup>-1</sup> e 9 torções ativas. No acoplamento molecular da cruzaína (1F2C) os valores calculados foram: RMSD 1,088 Å, afinidade de -8,7 kcal mol<sup>-1</sup> e 9 torções ativas. Tendo como parâmetro o RMSD favorável menor que 2,0, todas as simulações apresentaram-se válidas para o estudo de acoplamento, além de apresentarem uma afinidade próxima de -8,1 kcal mol<sup>-1</sup>.

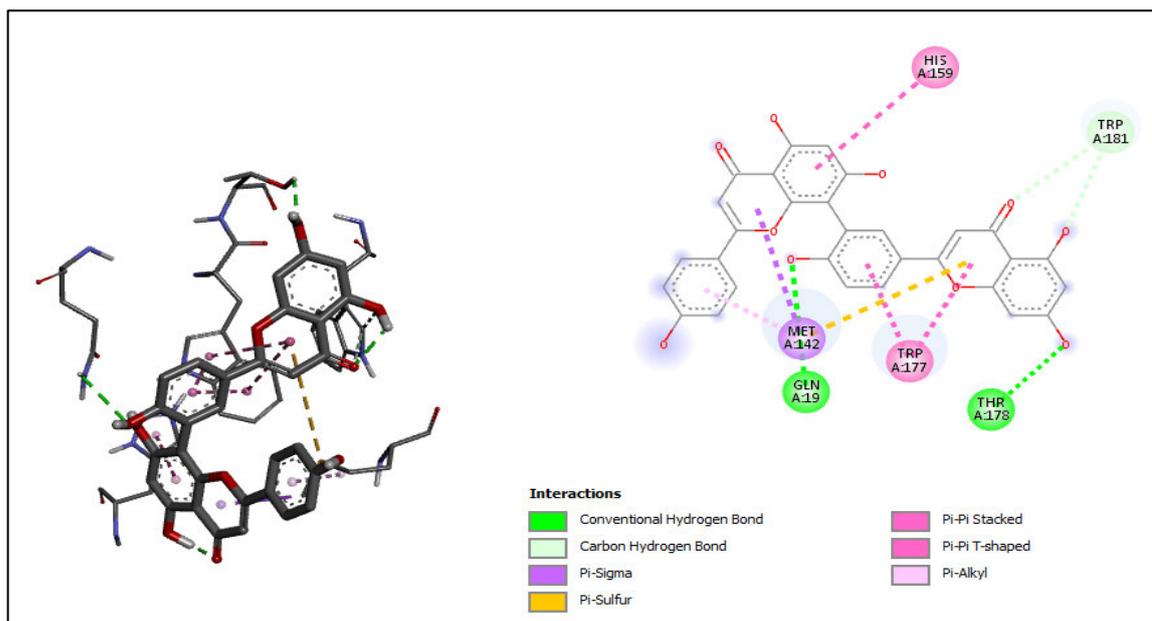
Figura 44 - Docking molecular entre o ligante amentoflavona e a cruzaína.



Fonte: Elaborada pela autora

A cruzaína possui um sítio catalítico situado na interseção de dois domínios, um predominantemente composto de  $\alpha$ -hélices e o outro de folhas- $\beta$  antiparalelas, onde se destacam a tríade catalítica (resíduos Asn175, Cys25 e His159 e) e os resíduos Gln19 e Trp177, que possuem um importante papel na ligação dos inibidores (BRAK *et al.*, 2011; SAJID *et al.*, 2011). Tendo como parâmetros a simulação que apresentou menor distância entre o ligante e o sítio catalítico, foram avaliadas as interações entre a amentoflavona e cruzaína (PDB 1F2B), onde se destaca as interações não covalentes entre os anéis aromáticos ( $\pi$ - $\pi$  stacking) com o resíduo Trp177 e His159, indicando uma importante via de inibição, ressaltada pelas interações com os resíduos Gln19 e Thr178 (ligação de H) e Met142 ( $\pi$ -sigma) e Trp181 (Carbono -Hidrogênio) (Figura 45).

Figura 45 - Interações entre o ligante amentoflavona e a cruzaína (PDB 1F2B).

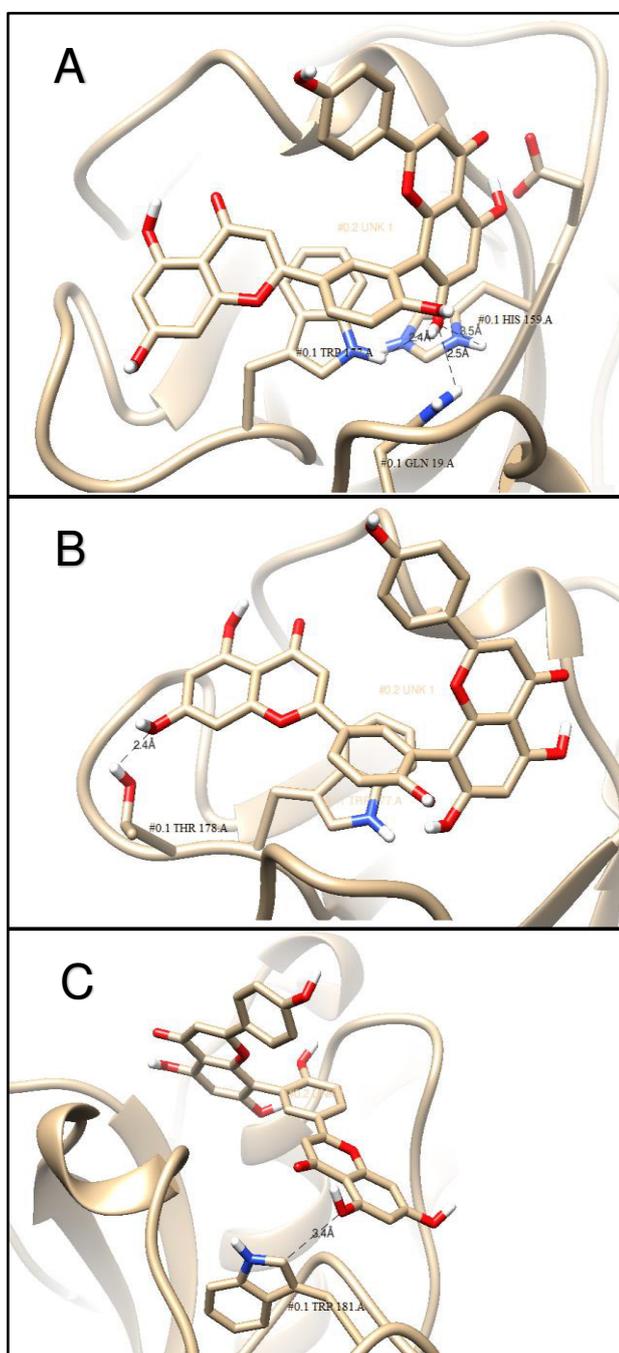


Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Resíduos de aminoácidos: HIS – histidina; GLN – glutamina; MET - metionina; TRP – triptofano; THR – treonina.

Observando essa conformação de acoplamento, podemos destacar as distâncias em angstroms entre a proteína cruzaína e o ligante amentoflavona, sendo elas Trp177 a 2,4 Å de distância, Gln19 a 2,5 Å, His159 a 3,5 Å, Thr178.A a 2,4 Å e Trp181 a 3,4 Å de distância (Figura 46).

Figura 46 - Visualização das distâncias entre a amentoflavona e os resíduos da cruzaina



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Resíduos de aminoácidos da cruzaina (A) Trp177, His159 e Gln19 (B) Thr178 e (C) Trp181.

Com relação as distâncias da tríade catalítica, a amentoflavona apresenta uma distância muito próxima das medidas obtidas no PDB original (Tabela 9), como obtidas por *redocking* em relação aos ligantes vinílicos sulfônicos, destacando o

comparativo com o VSI (obtido no *redocking*), salientando ainda, a interação com o TRP177 o qual apresentou um valor de 2,4 Å, um valor próximo ao dos ligantes vinílicos sulfônicos, tanto os medidos no PDB como obtidos por *redocking*.

Tabela 9 - Distanciamento dos resíduos da cruzaina e os ligantes vinílicos sulfônicos

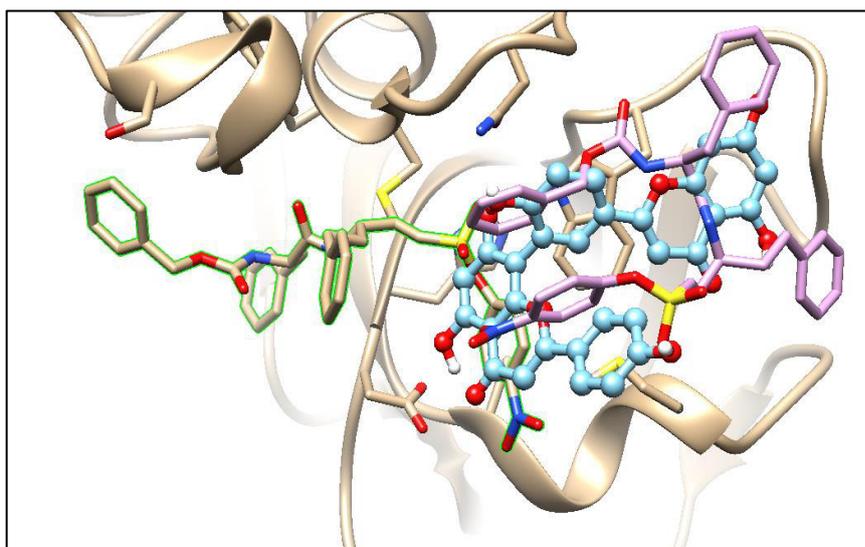
Resíduo	Ligantes								Amentoflavona
	VSI		VSII		VSIII		VSIV		
	*PDB	Redocking	*PDB	Redocking	*PDB	Redocking	*PDB	Redocking	
His159	2.8	3.7	3.0	3.0	3.4	5.5	3.1	4.0	3.5
Cys 25	2.7	3.6	2.7	5.3	2.7	6.7	2.6	3.7	3.0
Asn 175	6.1	6.2	6.0	6.6	6.5	6.0	6.1	6.0	6.3
Gln19	2.6	2,6	2.4	2.9	2.1	3.2	2.2	2.5	2.5
Trp 177	2.4	2.3	2.3	2.9	2.6	2.1	2.3	2.3	2.4

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: \*PDB: valor medido direto do PDB; Redocking: valor obtido no *redocking*. Resíduos de aminoácidos: His – histidina; Cys – cisteína; Asn – asparagina; Gln – glutamina; Trp – triptofano.

Quando visualizamos a sobreposição da simulação de docking (amentoflavona) e *redocking* (VSI) e o PDB original, observa-se que ambos os ligantes ficam muito próximos, indicando assim, a amentoflavona, novamente, como um potencial inibidor da cruzaina (Figura 47).

Figura 47 - Docking comparativo entre a amentoflavona e *redocking* VSI da cruzaina (1F29).



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Ligante VSI complexado na cruzaina (PDB 1F29) estão selecionados com bordas na cor verde; o docking da amentoflavona está destacado pela cor azul e o *redocking* do VSI destacado pelo ligante na cor lilás.

## 5. CONCLUSÃO

Em relação à abordagem teórica, os resultados do docking molecular demonstraram, em todos os alvos, a interação da amentoflavona com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico das referidas enzimas, ou seja, interagiu na região próxima à local ocupado por inibidores já complexos com TcGAPDH, Cruzaina e Tripanotiona redutase. Este resultado sugere que a amentoflavona é capaz de interferir com a atividade das três enzimas, mostrando-se um promissor agente antichagásico. No tocante ao ácido anacárdico, foi verificado que a molécula ocupa uma região próxima ao local ativo do inibidor chalepina na enzima TcGAPDH e que o resíduo Ile13 possui a energia de ligação mais forte, aproximadamente 25 kcal / mol com AA0, através de uma forte interação de Van der Waals, mostrando-se promissor também no estudo *in silico* como potencial efeito tripanocida.

## REFERÊNCIAS

- ADADE, Camila M. *et al.* Crovirin, a Snake Venom Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) with Promising Activity against Trypanosomes and Leishmania. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 10, 2014.
- ADADE, Camila M. *et al.* Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon*, v. 69, p. 227–239, jul. 2013.
- ALENCAR, J.E. *História natural da Doença de Chagas no Estado do Ceará*. [S.l.: s.n.], 1987.
- ALENCAR, S. A. *Utilização de ferramentas computacionais para o estudo do impacto funcional e estrutural de nsSNPs em genes codificadores de proteínas*. 2010. 113 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.
- ALVES, F. C. S. *AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE INFUSÕES DE FOLHAS DE CAJUEIRO (Anacardium occidentale Lin) FRENTE A BACTÉRIA Streptococcus mutans*. MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA. 2011. 61 f. 2011.
- ALVES, F. C. S. *Uso de microscopia de força atômica como modelo de estudo em atividades parasitárias e efeito do ácido anacárdico em formas epimastigota e tripomastigota de Trypanosoma cruzi*. 2018. 72 f. Universidade Federal do Ceará, 2018.
- ARJUNAN, V.; MOHAN, S. Fourier transform infrared and FT-Raman spectra, assignment, ab initio, DFT and normal co-ordinate analysis of 2-chloro-4-methylaniline and 2-chloro-6-methylaniline. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009.
- ARYA, Ranjiana *et al.* Phytochemical examination of the leaves of *Anacardium occidentale*. *Journal of the Indian Chemical Society*, 1989.
- BAKKER, Barbara M. *et al.* Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 106, n. 1, p. 1–10, 2000.
- BANDEIRA, I.C.J. *et al.* Antichagasic effect of crotalicidin, a cathelicidin-like viperacidin, found in *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake's venom gland. *Parasitology*, 2017.
- BANDEIRA LIMA, Dânya *et al.* The dinoponeratoxin peptides from the giant ant *Dinoponera quadricaps* display in vitro antitrypanosomal activity. *Biological Chemistry*, v. 0, n. 0, jan. 2017.
- BARROSO-NETO, Ito L. *et al.* Inactivation of ovine cyclooxygenase-1 by bromoaspirin and aspirin: A quantum chemistry description. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 116, n. 10, p. 3270–3279, 2012.
- BECKE, Axel D. A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories. *The Journal of Chemical Physics*, 1993a.
- BECKE, Axel D. A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories |

- Browse - Journal of Chemical Physics. *The Journal of Chemical Physics*, 1993b.
- BECKE, Axel D. A real-space model of nondynamical correlation. *Journal of Chemical Physics*, 2003.
- BERGER et al. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II . Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi* 1. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 62, n. July 1996, p. 107–115, 1998.
- BERN, C. et al. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 4, p. 655–681, out. 2011.
- BERN, Caryn. Chagas' Disease. *The new england journal of medicine*, v. 375, n. 5, p. 456–466, 2015.
- BEZERRA, E M et al. Quantum mechanical *ab initio* calculations of the Raman scattering from psoralens. *Journal of Physics: Condensed Matter*, v. 18, n. 35, p. 8325–8336, 2006.
- BONNEY, Kevin M. Chagas disease in the 21st Century: A public health success or an emerging threat? *Parasite*, 2014.
- BRAINER, M. S. C. P.; VIDAL, M. F. Cajucultura nordestina em recuperação. *Caderno Setorial ETENE*, v. 54, n. 3, p. 1–13, 2018.
- BRAK K., KERR I.D., BARRET K.T., FUCHI N., DEBNATH M., ENGEL J.C., MCKERROW J.H., DOYLE P.S., BRINEN L.S., ELLMAN J.A. Nonpeptidic Tetrafluorophenoxymethyl Ketone Cruzain Inhibitors as Promising New Leads for Chagas Disease Chemotherapy. *J Med Chem*, v. 4, n. 53, p. 1763–73, 2011.
- BROOIJMANS, Natasja; KUNTZ, Irwin D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, v. 32, n. 1, p. 335–373, 2003.
- CAMPETELLA, O. et al. A superfamily of *trypanosoma cruzi* surface antigens. *Parasitology Today*, 1992.
- CHABI, Sika K. et al. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* L. leaves and barks extracts on pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, v. 8, n. 25, p. 2458–2467, 2014.
- CHAN, Eric Wei Chiang et al. Ulam herbs: A review on the medicinal properties of *Anacardium occidentale* and *Barringtonia racemosa*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2017.
- CHATELAIN, Eric. *Chagas disease drug discovery: Toward a new era. Journal of Biomolecular Screening*. [S.l: s.n.], 2015
- CHATELAIN, Eric. *Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? Computational and Structural Biotechnology Journal*. [S.l: s.n.], 2017
- CHAVES, Mariana H. et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2010.

- CHERMETTE, H. Chemical reactivity indexes in density functional theory. *Journal of Computational Chemistry*, 1999.
- CHEUKA, Peter Mubanga *et al.* The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. *Molecules*, v. 22, n. 1, 2017.
- COULERIE, Paul *et al.* Structure-activity relationship study of biflavonoids on the dengue virus polymerase DENV-NS5 RdRp. *Planta Medica*, 2013.
- COURA, José Rodrigues; BORGES-PEREIRA, José. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 3, p. 286–296, 2012.
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. January, p. 3–24, 2002.
- CROFT, Simon L.; BARRETT, Michael P.; URBINA, Julio A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 11, p. 508–512, 2005.
- DA COSTA, Roner F. *et al.* Explaining statin inhibition effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 14, n. 4, p. 1389–1398, 2012.
- DA SILVA-JUNIOR, E. F. *et al.* Molecular Docking Studies Applied to a Dataset of Cruzain Inhibitors. *Current Computer-Aided Drug Design*, 2017.
- DA SILVA, Jackeline G. *et al.* Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, n. 4, p. 572–577, 2007.
- DE CARVALHO NILO BITU, Vanessa *et al.* Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015.
- DE MARCHI, Anderson Aparecido *et al.* New 3-piperonylcoumarins as inhibitors of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 18, p. 4823–4833, 2004.
- DE SOUZA, Wanderley; DE CARVALHO, Tecia Maria Ulisses; BARRIAS, Emile Santos. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*, v. 2010, p. 1–18, 2010.
- DELLEY, B. An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. *The Journal of Chemical Physics*, v. 92, n. 1, p. 508–517, 1990.
- DELLEY, B. From molecules to solids with the DMol3 approach. *The Journal of Chemical Physics*, v. 113, n. 18, p. 7756–7764, 2000.
- DEPIZZOL, Daniela Bertolini *et al.* MoCalc: A new graphical user interface for molecular calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 2005.

DEVIPRIYA, B.; KUMARADHAS, P. Charge density distribution and the electrostatic moments of CTPB in the active site of p300 enzyme: A DFT and charge density study. *Journal of Theoretical Biology*, v. 335, p. 119–129, 2013.

DEVIPRIYA, B.; KUMARADHAS, P. Probing the effect of intermolecular interaction and understanding the electrostatic moments of anacardic acid in the active site of p300 enzyme via DFT and charge density analysis. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 34, p. 57–66, 2012.

DIAS, Luiz C.; DESSOY, Marcos A. Quimioterapia da doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quimica Nova*, 2009.

DITCHFIELD, R.; HEHRE, W. J.; POPLE, J. A. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. *The Journal of Chemical Physics*, 1971.

DNDI. *About Chagas Disease – DNDi*.

DNDI. *Chagas Fact sheet*.

DOONAN, Francesca; COTTER, Thomas G. Morphological assessment of apoptosis. *Methods*, 2008.

DVORAK, James A.; HYDE, Thomas P. Trypanosoma cruzi: Interaction with vertebrate cells in vitro. I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Experimental Parasitology*, 1973.

ESTEVAM, E.B.B et Al. Avaliação das atividades antibacteriana , tripanocida e citotóxica do extrato hidroalcoólico das raízes de Tradescantia sillamontana Matuda ( Veludo Branco ) ( Commelinaceae ). *Rev. Bras. Pl. Med.*, v. 18, n. 2, p. 415–422, 2016.

FERREIRA, Elizabeth Igne. Drug design for chagas'disease: Advances and challenges. *Revista Virtual de Química*, v. 4, n. 3, p. 225–246, 2012.

FIDALGO, A. S. O. B. V. *et al.* Insect vectors of chagas disease (Trypanosoma cruzi) in Northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2018.

FIGUEREDO, Fernando G *et al.* Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de Piper arboreum ( Piperaceae ) e de suas frações. n. July 2016, p. 148–154, 2014.

FRANCISCO, Amanda F *et al.* Biological factors that impinge on Chagas disease drug development. *Parasitology*, v. 144, n. 14, p. 1871–1880, dez. 2017.

FREITAS, Renato F. *et al.* Discovery of novel Trypanosoma cruzi glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 6, p. 2476–2482, 2009.

FUKUI, Kenichi. Role of frontier orbitals in chemical reactions. *Science*, 1982.

GRIMME, Stefan. Supramolecular binding thermodynamics by dispersion-corrected density functional theory. *Chemistry - A European Journal*, 2012.

HAMAD, Fatma B.; MUBOFU, Egid B. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, v.

16, n. 4, p. 8569–8590, 2015.

HANAU, Stefania *et al.* 6-phosphogluconate dehydrogenase: a target for drugs in African trypanosomes. *Current medicinal chemistry*, v. 11, n. 19, p. 2639–50, 2004.

HANWELL, Marcus D. *et al.* Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 2012.

HARRIS, J.I.; WATERS, M. The Enzymes. In: BOYER, P.D (Org.). . 3 ed ed. New York: Academic Press, 1976. p. 1–49.

HASSLOCHER-MORENO, Alejandro M. *et al.* Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, n. 5, p. 1261–1266, maio 2012.

HEMSHEKHAR, Mahadevappa *et al.* Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: A pharmacological overview. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 110, n. 2, p. 122–132, 2012.

HERRING, Geoff E. *et al.* *General Chemistry: Principles & Modern Applications*. ninth ed. New Jersey: Pearson Education Inc, 2007.

HIBBS, David E *et al.* Experimental and Theoretical Charge Density Studies of Tetrafluorophthalonitrile and Tetrafluoroisophthalonitrile. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 108, n. 11, p. 3663–3672, 2004.

HUBER, K. P.; HERZBERG, G. *Molecular Spectra and Molecular Structure*. [S.l: s.n.], 1979.

HUEY R., MORRIS M.G., OLSON J.A., GOODSELL D.S. A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, v. 28, p. 1145–52, 2007.

ICZKOWSKI, R P; MARGRAVE, J L. Electronegativity - Journal of the American Chemical Society (ACS Publications). *Journal of the American Chemical ...*, 1961.

INADA, Yasuji; ORITA, Hideo. Efficiency of Numerical Basis Sets for Predicting the Binding Energies of Hydrogen Bonded Complexes: Evidence of Small Basis Set Superposition Error Compared to Gaussian Basis Sets. *Journal of Computational Chemistry*, n. 29, p. 225–232, 2008.

IRIGOÍN, Florencia *et al.* *Insights into the redox biology of Trypanosoma cruzi: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification*. *Free Radical Biology and Medicine*. [S.l: s.n.], , 2008

IRWIN, John J *et al.* ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 52, n. 7, p. 1757–1768, jul. 2012.

ISLAM, Nazmul; CHANDRA GHOSH, Dulal. A new algorithm for the evaluation of the global hardness of polyatomic molecules. *Molecular Physics*, 2011.

JACKSON, Yves *et al.* Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of chagas disease among latin American migrants in Geneva, Switzerland. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 2, p. 1–7, 2010.

JAIN, M. V. et al. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med*, v. 17, n. 1, p. 12–29, 2013.

JAISWAL, Y. S. et al. Antidiabetic activity of extracts of *Anacardium occidentale* Linn. leaves on n-streptozotocin diabetic rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2017.

JANAK, J. F. Proof that  $\partial E/\partial n_i = \epsilon$  in density-functional theory. *Physical Review B*, 1978.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research*, v. 90, n. SUPPL. 2, p. 55–62, 2003.

KITCHEN, Douglas 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, 2004.

KOH, Cho Yeow; KINI, R. Manjunatha. *From snake venom toxins to therapeutics - Cardiovascular examples. Toxicol.* [S.l: s.n.], 2012

KONAN, N A et al. Cytotoxicity of cashew flavonoids towards malignant cell lines. *Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 2012.

KONAN, Nzi André; BACCHI, Elfriede Marianne. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 112, n. 2, p. 237–242, 2007.

KOOPMANS, T. Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms. *Physica*, 1934.

KUBO, Isao et al. Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chemistry*, v. 99, n. 3, p. 555–562, 2006.

KUFAREVA I.; ABAGYAN R. Methods of Protein Structure Comparison. *Homology Modeling*. [S.l: s.n.], 2011. p. 231–57.

LADAME, Sylvain et al. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with an analogue of 1,3-bisphospho-D-glyceric acid: Selective inhibition by structure-based design. *European Journal of Biochemistry*, v. 270, n. 22, p. 4574–4586, 2003.

LAJKO, M. et al. Photoreceptor oxidative stress in hyperoxia-induced proliferative retinopathy accelerates rd8 degeneration. *PLoS One*, v. 12, n. 7, p. 1–22, 2017.

LEE, Chengteh; YANG, Weitao; PARR, Robert G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B*, 1988.

LU, Tian; CHEN, Feiwu. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. *Journal of Computational Chemistry*, 2012.

MADKOUR, Loutfy H. et al. Quantum chemical calculations, molecular dynamic (MD) simulations and experimental studies of using some azo dyes as corrosion inhibitors

for iron. Part 2: Bis-azo dye derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 2018.

MARINHO, E. S. A DFT study of synthetic drug topiroxostat: MEP, HOMO, LUMO. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, v. 7, n. July, p. 1264–1270, 2016.

MEHRI, Mouna *et al.* Synthesis, electrochemical and classical evaluation of the antioxidant activity of three  $\alpha$ -aminophosphonic acids: Experimental and theoretical investigation. *Journal of Molecular Structure*, 2018.

MEIRA, Cássio Santana *et al.* In vitro and in vivo antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, v. 22, n. 11, p. 969–74, out. 2015.

MEIRELLES, M. N. *et al.* Functional and antigenic properties of the major cysteine proteinase (GP57/51) of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. [S.l.: s.n.], 1990

MELLO, Clarissa Perdigão *et al.* Evaluation of the antichagasic activity of batroxidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland. *Toxicon*, v. 130, p. 56–62, maio 2017.

MENDES, NM; OLIVEIRA, AB. Atividade moluscicida da mistura de ácidos 6-n-alquil salicílicos (ácido anacárdico) e dos seus complexos com cobre (II) e chumbo (II). *Rev. Soc. bras. Med. ...*, v. 3, n. II, 1990.

MENDOZA-HUIZAR, Luis Humberto; RIOS-REYES, Clara Hilda. Chemical reactivity of Atrazine employing the Fukui function. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 2011.

MENEZES, Irwin R A *et al.* 3D QSAR studies on binding affinities of coumarin natural products for glycosomal GAPDH of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2003.

MESQUITA, Mariana Laundry De *et al.* Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. v. 100, n. September, p. 783–787, 2005.

MOLINA-GARZA, Zinnia Judith *et al.* Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. *Acta Tropica*, p. 1–5, 2014.

MOMANY, Frank A.; RONE, Rebecca. Validation of the general purpose QUANTA @3.2/CHARMm@ force field. *Journal of Computational Chemistry*, v. 13, n. 7, p. 888–900, 1992.

MOMMA, Koichi; IZUMI, Fujio. VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data. *Journal of Applied Crystallography*, 2011.

MORAIS, Selene M. *et al.* Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. *Pharmaceuticals*, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

MORELL, Christophe; GRAND, André; TORO-LABBÉ, Alejandro. New dual descriptor for chemical reactivity. *Journal of Physical Chemistry A*, 2005.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NAGAJYOTHI, Fnu *et al.* Disease. v. 14, n. 5, p. 634–643, 2013.

NASCIMENTO, José Eranildo Teles Do *et al.* Chemical composition and antifungal in vitro and in silico, antioxidant, and anticholinesterase activities of extracts and constituents of ouratea fieldingiana (DC.) Baill. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2018, 2018.

NEESE, Frank. Software update: the ORCA program system, version 4.0. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2018.

NEESE, Frank. The ORCA program system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2012.

NOWICKI, Matthew W. *et al.* Design, synthesis and trypanocidal activity of lead compounds based on inhibitors of parasite glycolysis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 9, p. 5050–5061, 2008.

NWAKA, Solomon; HUDSON, Alan. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, n. 11, p. 941–955, 2006.

OBOT, I. B.; MACDONALD, D. D.; GASEM, Z. M. *Density functional theory (DFT) as a powerful tool for designing new organic corrosion inhibitors: Part 1: An overview. Corrosion Science*. [S.l.: s.n.], 2015

OLIVEIRA, Maria de Fátima *et al.* Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 2008.

OLIVEIRA, Micheline Soares Costa *et al.* Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. *Acta Tropica*, v. 117, n. 3, p. 165–170, 2011.

OPHARDT, Charles E. *Virtual ChemBook*.

PADMANABHAN, J. *et al.* Multiphilic descriptor for chemical reactivity and selectivity. *Journal of Physical Chemistry A*, 2007.

PAES, Leonardo *et al.* ESTUDO DFT DO ALCALOIDE DICENTRINA: GAP, HOMO, LUMO, MESP E MULLIKEN. *JOIN*, n. 1, 2017.

PAN, Xulin *et al.* Amentoflavone and its derivatives as novel natural inhibitors of human Cathepsin B. v. 13, p. 5819–5825, 2005.

PARR, Robert G. *et al.* Electronegativity: The density functional viewpoint. *The Journal of Chemical Physics*, 1978.

PARR, Robert G.; CHATTARAJ, Pratim K. Principle of Maximum Hardness. *Journal of the American Chemical Society*, 1991.

PARR, Robert G.; PEARSON, Ralph G. Absolute Hardness: Companion Parameter to Absolute Electronegativity. *Journal of the American Chemical Society*, 1983.

PARR, Robert G.; SZENTPÁLY, László V.; LIU, Shubin. Electrophilicity index. *Journal of the American Chemical Society*, 1999.

PAUCAR, Rocio; MORENO-VIGURI, Elsa; PÉREZ-SILANES, Silvia. Challenges in Chagas Disease Drug Discovery: A Review. *Current Medicinal Chemistry*, 2016.

PAVÃO, F. *et al.* Structure of Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. *FEBS Letters*, v. 520, n. 1–3, p. 13–17, 2002.

PEARSON, Ralph G. Hard and soft acids and bases-the evolution of a chemical concept. *Coordination Chemistry Reviews*, 1990.

PEARSON, Ralph G. Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Chemical Society*, 1963.

PEDRO, V. *Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de Anacardium occidentale L. em ratos submetidos à colite ulcerativa.* 2015. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2015.

PEREIRA, Douglas Henrique *et al.* New perspectives on the role of frontier molecular orbitals in the study of chemical reactivity: A review. *Revista Virtual de Química*, 2016.

PEREIRA, Junia M. *et al.* Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 19, p. 8889–8895, 2008.

PETTERSEN, Eric F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PIRES, Ricardo *et al.* Compositional analysis of cashew ( Anacardium occidentale L .) peduncle bagasse ash and its in vitro antifungal activity against Fusarium species. p. 200–205, 2011.

POLITZER, Peter; MURRAY, Jane S. The fundamental nature and role of the electrostatic potential in atoms and molecules. *Theoretical Chemistry Accounts*, v. 108, n. 3, p. 134–142, 2002.

POLITZER, Peter; MURRAY, Jane S; PERALTA-INGA, Zenaida. Molecular Surface Electrostatic Potentials in Relation to Noncovalent Interactions in Biological Systems. v. 684, p. 676–684, 2001.

PRABAVATHI, N.; NILUFER, A.; KRISHNAKUMAR, V. Vibrational spectroscopic (FT-IR and FT-Raman) studies, natural bond orbital analysis and molecular electrostatic potential surface of isoxanthopterin. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 114, p. 101–113, 2013.

PROKOPCZYK, Igor M *et al.* Integration of methods in cheminformatics and biocalorimetry for the design of trypanosomatid enzyme inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*, v. 6, n. 1, p. 17–33, dez. 2013.

RASCHKA S. *Molecular docking, estimating free energies of binding, and AutoDock's semi-empirical force field.*

RASSI, Anis; RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. Chagas disease. *The Lancet*, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

REED, Alan E.; WEINHOLD, Frank. Natural localized molecular orbitals. *The Journal of Chemical Physics*, v. 83, n. 4, p. 1736–1740, 1985.

RODRIGUES, Jean Henrique da Silva *et al.* A Quinoxaline Derivative as a Potent Chemotherapeutic Agent, Alone or in Combination with Benznidazole, against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. e85706, jan. 2014.

SAJID, Mohammed *et al.* Cruzain: The path from target validation to the clinic. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 712, p. 100–115, 2011.

SAKTHIVEL, K. M.; GURUVAYOORAPPAN, C. Amentoflavone inhibits iNOS, COX-2 expression and modulates cytokine profile, NF- $\kappa$ B signal transduction pathways in rats with ulcerative colitis. *International Immunopharmacology*, 2013.

SALEM, Manar; WERBOVETZ, Karl. Natural Products from Plants as Drug Candidates and Lead Compounds Against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 21, p. 2571–2598, 2006.

SANKARARAMAN, Sriram *et al.* Active site prediction using evolutionary and structural information. *Bioinformatics*, v. 26, n. 5, p. 617–624, 2010.

SANTOS, Ricardo P. *et al.* Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes. *Journal of Food Engineering*, v. 79, n. 4, p. 1432–1437, 2007.

SARAVANAMUTHU, Ahilan *et al.* Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: A template for drug design. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 28, p. 29493–29500, 2004.

SCHMELZER, Gabriëlla Harriët; GURIB-FAKIM, ; ; Ameenah. *Plant Resources of Tropical Africa 11(1) : Medicinal plants 1*. [S.l.: s.n.], 2008. v. 11.

SCHMUNIS, G A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. PAHO 2006, p. 75–85, 2007.

SEMINARIO, Jorge (Org.). *Recent Developments and Applications of Modern Density Functional Theory*. 1st. ed. Amsterdam, The Netherland: [s.n.], 1996.

SHENY, D. S.; MATHEW, Joseph; PHILIP, Daizy. Phytosynthesis of Au, Ag and Au-Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of *Anacardium occidentale*. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 79, n. 1, p. 254–262, 2011.

SHITYAKOV, Sergey; FÖRSTER, Carola. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, v. 7, n. 1, p. 23–36, 2014.

SILVEIRA, Antônio Carlos; DIAS, João Carlos Pinto. O controle da transmissão vetorial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. SUPPL. 2, p. 52–63, 2011.

SOODERHJELM, S. G. Par; RYDE, U. Protein-Ligand Interactions. In: ED. H. GOHLKE (Org.). [S.l.]: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2012. p. 121–144.

SOUSA, Sérgio Filipe; FERNANDES, Pedro Alexandrino; RAMOS, Maria João. Protein-ligand docking: Current status and future challenges. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006.

SOUTO-PADRON, T. *et al.* Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: Immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *Journal of Cell Science*, 1990.

SOUZA, R. O. S. (Universidade Federal do Ceará). *Estudo in vitro da atividade tripanocida de polissacarídeos vegetais*. 2017. 155 f. 2017.

SPACKMAN, Mark A.; JAYATILAKA, Dylan. Hirshfeld surface analysis. *CrystEngComm*, 2009.

SURESH KUMAR, S.; ATHIMOOLAM, S.; SRIDHAR, B. XRD, vibrational spectra and quantum chemical studies of an anticancer drug: 6-Mercaptopurine. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015.

TAN, Jing *et al.* Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) induces apoptosis of prostate cancer cells through inhibition of androgen receptor and activation of p53 signaling. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*, v. 24, n. 4, p. 275–83, 2012.

TROTT, Oleg; OLSON, Aj. NIH Public Access. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

TYMAN, J. H. P. Long-chain Phenols. Part III Identification of the Components of a Novel Phenolic Fraction in *Anacardium occidentale* (Cashew Nut-shell Liquid) and Synthesis of the Saturated Member. *Journal of the Chemistry Society Perkin*, v. 1, p. 1639–1647, 1973.

UPPAL, Anshul *et al.* Synthesis, structural, vibrational, electronic, thermal and Fukui analysis of diethyl (hydroxy(4-methoxyphenyl) methyl) phosphonate. *Journal of Molecular Structure*, 2018.

VIEIRA, Paulo C. *et al.* Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. *Pure and Applied Chemistry*, v. 73, n. 3, p. 617–622, 2001.

VON KARSTEDT, Silvia; MONTINARO, Antonella; WALCZAK, Henning. Exploring the TRAILS less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nature reviews. Cancer*, v. 17, n. 6, p. 352–366, maio 2017.

VON SZENTPÁLY, László. Studies on electronegativity equalization. Part 1. Consistent diatomic partial charges. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 1991.

WISHART, David S. DrugBank. *Principles of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics*. [S.l.: s.n.], 2012. .

YANG, Shiqiong *et al.* Molecular design, synthesis and biological evaluation of BP-O-

DAPY and O-DAPY derivatives as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 65, p. 134–143, 2013.

YANG, W.; PARR, R. G. Hardness, softness, and the Fukui function in the electronic theory of metals and catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985.

YEARLEY, Eric J. *et al.* Experimental electron density studies of non-steroidal synthetic estrogens: Diethylstilbestrol and dienestrol. *Journal of Molecular Structure*, v. 890, n. 1–3, p. 240–248, 2008.

YEH, Pen Ho *et al.* Naturally occurring cytotoxic [3'→8'']-biflavonoids from podocarpus nakaii. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2012.

YUSUF, Dilmurat *et al.* An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 2008.

ZACHARIAS, Adway Ouseph *et al.* DFT, spectroscopic studies, NBO, NLO and Fukui functional analysis of 1-(1-(2,4-difluorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)ethylidene)thiosemicarbazide. *Journal of Molecular Structure*, 2018.

ZANATTA, Geancarlo; BARROSO-NETO, Ito L.; JUNIOR, Victorio Bambini-. Quantum Biochemistry Description of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with the Selective Antagonist Eticlopride. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, v. 05, n. 07, p. 155–162, 2012.

ZEROKA, Daniel; JENSEN, James O.; SAMUELS, Alan C. Infrared spectra of some isotopomers of ethylamine and the ethylammonium ion: A theoretical study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 1999.

ZHANG, Da W.; ZHANG, J. Z.H. Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein-molecule interaction energy. *Journal of Chemical Physics*, v. 119, n. 7, p. 3599–3605, 2003.

ZIEGLER, Tom; AUTSCHBACH, Jochen. Theoretical methods of potential use for studies of inorganic reaction mechanisms. *Chemical Reviews*, v. 105, n. 6, p. 2695–2722, 2005.

ZINSSER, Veronika L. *et al.* Biochemical characterisation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1844, n. 4, p. 744–749, 2014.

**ANEXO**

ARTIGO PUBLICADO DO PROJETO DE TESE

## MOLECULAR FRACTIONATION WITH CONJUGATE CAPS STUDY OF THE INTERACTION OF THE ANACARDIC ACID WITH THE ACTIVE SITE OF *TRYPANOSOMA CRUZI* GAPDH ENZYME: A QUANTUM INVESTIGATION

MÁRCIA MACHADO MARINHO<sup>1\*</sup>, RICARDO PIRES DOS SANTOS<sup>2</sup>, EVELINE MATIAS BEZERRA<sup>3</sup>, RONER FERREIRA COSTA<sup>3</sup>, CIRO SIQUEIRA FIGUEIRA<sup>2</sup>, ALICE MARIA COSTA MARTINS<sup>1</sup>, PEDRO LIMA NETO<sup>4</sup>, EMMANUEL SILVA MARINHO<sup>5</sup>, VALDER NOGUEIRA FREIRE<sup>6</sup>, EUDENILSON LINS ALBUQUERQUE<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceara, Ceara, Brazil. <sup>2</sup>Department of Computer Engineering/Biotechnology, Federal University of Ceara, Ceara, Brazil. <sup>3</sup>Department of Exact and Natural Sciences, Federal Rural University of Semiárid (UFERSA), Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. <sup>4</sup>Department of Analytical Chemistry and Physical-Chemistry, Federal University of Ceara, Ceara, Brazil. <sup>5</sup>Dom Aureliano Matos Faculty of Philosophy, Ceara State University, Ceara, Brazil. <sup>6</sup>Department of Physics, Federal University of Ceara, Ceara, Brazil. <sup>7</sup>Department of Biophysics and Pharmacology, Federal University of Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Brazil. Email: marinho.marcia@gmail.com

Received: 27 September 2019, Revised and Accepted: 09 November 2019

### ABSTRACT

**Objective:** The objective of this study was to use the molecular fractionation with conjugate caps (MFCC) method to elucidate the possible interaction mechanism of anacardic acid (AA) with the saturated alkyl chain (AA0) in the *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TcGAPDH) enzyme.

**Methods:** Initially, the geometry optimization of the AA three-dimensional structure (with the pentadecyl chain) was performed using density functional theory (B3LYP) calculations. With the AA0 optimization data, it was possible to plot the molecular electrostatic potential (MESP) surface. Molecular docking simulation was performed using automated coupling with the AutoDock Vina program. The best-fit conformation in the docking simulation of AA0 is the binding site used for the construction of the TcGAPDH-AA0 complex. Interaction energies between the AA0 molecule and the amino acid residues of the TcGAPDH enzyme were estimated using the MFCC strategy.

**Results:** To obtain more reliable quantitative information on the interaction of AA with the active site of the TcGAPDH enzyme, the fragmentation method was combined with conjugated layers (MFCC) and molecular docking. It can be observed that the AA0 molecule occupies a region near the active site of the cholepin molecule in the TcGAPDH enzyme, and the Ile13 residue has the strongest binding energy of approximately 25 kcal/mol with AA0, through a strong Van der Waals interaction.

**Conclusion:** The paper presents an improved quantitative analysis approach for assessing the contribution of individual amino acids to the free energy of interaction between AA and TcGAPDH. Specifically, the paper illustrates the advantageous approach of combining molecular docking with the MFCC method.

**Keywords:** Anacardic acid, Chagas disease, Density functional theory, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Trypanosoma cruzi*, Molecular electrostatic potential, Molecular fractionation with conjugate caps, molecular docking.

© 2019 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i12.36193>

### INTRODUCTION

Caused by the parasite protozoan hemoflagellate *Trypanosoma cruzi* (TC), Chagas disease is commonly transmitted to humans by the insect vector *Triatoma infestans* [1]. This is an endemic disease in tropical and subtropical regions of Latin America, Africa, and Asia, affecting millions of people each year [2]. Through immigration, the disease has also affected non-endemic regions, such as the United States [3,4]. Benznidazole and nifurtimox, the drugs used to treat Chagas disease, are not effective against certain forms of the disease, in addition to having significant side effects [5,6]. Therefore, it is important to develop new drugs so these problems can be minimized or eliminated.

The mechanism of action of trypanocidal drugs is generally not well elucidate. Many published studies assume that the drug produces free radicals to which TC is particularly sensitive [7], but some of the proposed mechanisms of action have been challenged [8]. The inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from TC (TC glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [TcGAPDH]), on the other hand, was also proposed as an explanation for the trypanocidal effect

of drugs [9-11]. This enzyme is responsible, in the glycolytic pathway of the parasite, for the conversion of glyceraldehyde-3-phosphate into 1,3-bisphosphoglycerate in the presence of nicotinamide-adenine-dinucleotide (NAD)<sup>+</sup> inorganic phosphate [12,13]. Through anaerobic glycolysis in the cytoplasm, its inhibition can modify the energetic metabolism and the production of adenosine triphosphate, important for the parasite's life cycle [14,15]. In addition to its primordial role in glycolysis in the cytoplasm, GAPDH has also been associated with several non-metabolic events, such as the onset of apoptosis, axoplasmic transport, activation of transcription, and transport of ER to Golgi [16,17]. Thus, this enzyme can be an important target for the rational planning of new drugs.

Various substances extracted from medicinal plants have been tested for TcGAPDH inhibition [18-20]. For instance, cholepin, a furanocoumarin isolated from species of the *Rutaceae* family, showed a high inhibitory effect on TcGAPDH [21,22]. Another important natural product inhibitor of TcGAPDH is the 2-hydroxy-6-pentadecyl-benzoic acid, also known as anacardic acid (AA) [23]. It is found in the shells of cashew nuts, the *Anacardium occidentale*, a plant native to the Northeastern

Brazilian coast, and also found in Central America and countries such as India, Asia, and Africa [24]. Several biological activities of AA have been reported: Antimicrobial, antifungal, antioxidant, antitumoral, antiparasitic, molluscicidal, larvicidal, and insecticidal [25-29]. The AA is a phenolic lipid, having the structure of a salicylic acid substituted by an alkyl chain with 15 carbons. The alkyl chain may be saturated or unsaturated (monoene, diene, or triene) [30]. All forms of AA (saturated or unsaturated alkyl chain) show an inhibitory effect on TcGAPDH; however, the form with the saturated alkyl chain shows the greatest effects [31]. Because of its high inhibition capacity, the AA has been studied as a promising trypanocidal drug with  $IC_{50}$  of 28  $\mu$ M [23]. TcGAPDH has not yet been cocrystallized with AA, and details of its mechanism of interaction with the enzyme site of action are not well elucidated.

Computational chemistry has been widely used for the planning of biologically active compounds and the understanding of their mechanisms of action [32,33]. Density functional theory (DFT) is a quantum computational method that allows the determination (with acceptable accuracy) of various drug properties, such as geometric configurations of the lowest energy, expected positions of the constituent atoms, electronic charge distributions, and vibrational frequencies [34,35]. Changes in the geometric configuration and charge distribution of a drug molecule caused by its interaction with the active site of an enzyme play a key role in its biological activity [36,37]. Molecular docking is a computational method usually based on force fields of classical molecular mechanics that predict the mode of binding of a small-molecule ligand to the active site of a macromolecular ligand to form a stable complex [38], this method is used in the search for new ligands for drug therapy because of their low computational cost when compared to methods based on quantum mechanics [39]. However, the typically used docking methods do not correctly predict the binding energy of a ligand-receptor complex [40,41]; moreover, the molecular fractionation with conjugate caps (MFCC) is a more powerful approach using quantum mechanics calculations to determine interaction energies for protein-ligand systems [42,43]. In this method, the interaction energy is calculated by summing the interactions between the individually capped protein fragments (individual amino acid-based fragments) and the ligands [44]. The MFCC combined with the docking approach can provide more reliable quantitative information on the interaction of drugs with the active site of macromolecular targets.

Devipriya and Kumarad have [45] performed molecular docking and the DFT approach to show changes in the conformation and charge density of AA molecules before and after interaction with the active site of the p300 enzyme. Da Silva *et al.* [46] and Freitas *et al.* [31] studied the interaction of AA and analogs with TcGAPDH through molecular docking and biochemical assays. However, a more detailed analysis of this interaction (using the MFCC method) together with conformational and charge density changes of the ligand molecule (before and after docking) have not been conducted. To better elucidate the possible interaction mechanism of AA with the saturated alkyl chain (AA0) in the TcGAPDH enzyme, molecular docking and MFCC analyzes of the AA0 molecule were performed at the active site of the enzyme. Results were compared with the binding energy (calculated by MFCC) of NAD<sup>+</sup> cofactor crystalized with TcGAPDH. From this perspective, the present work aims using the MFCC quantum method to measure the interaction of AA (with the saturated alkyl chain) and the TcGAPDH enzyme, identifying the component residues of their binding sites, as well as assessing the peculiarities surrounding the drug-receptor complexes, thus elucidating the interaction mechanism.

## METHODS

### Geometry optimization and molecular electrostatic potential (MESP) surface

Initially, the geometry optimization of the AA three-dimensional (3D) structure (with the pentadecyl chain) obtained from the ZINC database (ZINC code: 8234355) [47] was performed using DFT

(B3LYP) calculations. The Gaussian 03 program (Gaussian, Inc.) was used, adopting the B3LYP hybrid functional exchange-correlation and the 6-311+G (d, p) basis set to expand the electronic states. Structural convergence of isolated neutral AA0 (gas phase) was reached when the following thresholds were met: Maximum force per atom  $<1.5 \times 10^{-5}$  Ha  $\text{\AA}^{-1}$  and RMS force  $<1.0 \times 10^{-5}$  Ha  $\text{\AA}^{-1}$ , self-consistent field energy variation  $<10^{-7}$  Ha, and maximum atomic displacement  $<6 \times 10^{-5}$   $\text{\AA}$ . The lowest energy configuration (optimized) was represented as AA0. With the AA0 optimization data, it was possible to plot the MESP surface.

### Molecular docking

Molecular docking simulation was performed using automated coupling with the AutoDock Vina program (Molecular Graphics Lab) [48]. The crystallographic structure of TcGAPDH complexed with cholepin (TcGAPDH-cholepin) was obtained from RCSB protein data bank (PDB) (code: 1K3T) [49]. The ligand used was the optimized AA0, and the receptor was the chain C of the TcGAPDH enzyme after the removal of the cholepin of the complex. A box region with 820 nm<sup>3</sup> centered on and encompassing the active site was defined as the receptor search volume. The best-fit conformation in the docking simulation of AA0 is the binding site used for the construction of the TcGAPDH-AA0 complex. To compare the position of the ligand at the binding site, the Chain A of the TcGAPDH-NAD<sup>+</sup> cofactor (PDB code: 1QXS) complexes were used [10]. Molecular graphics and docking were displayed using the UCSF Chimera 1.8 package [50] and Discovery Studio Visualizer.

### MFCC

To estimate the total energy of interaction, all 359 amino acid residues of the C chain of the enzyme of the TcGAPDH-AA0 complex were taken into account, seeking to disregard not important interactions. For each amino acid residue, sets of four amino acids were used as caps, two on each side, to increase accuracy when measuring the interaction energy. Interaction energies between the AA0 molecule and the amino acid residues of the TcGAPDH enzyme were estimated using the MFCC strategy [36,45]. The binding energy between the inhibitor molecule AA0 and the amino acid residue  $R_i$  is given by  $E(\text{AA}-R_i)$ :

$$E(\text{AA}-R^i) = E(\text{AA}-C^{i-1}R^iC^{i+1}) - E(C^{i-1}R^iC^{i+1}) - E(\text{AA}-C^{i-1}C^{i+1}) + E(C^{i-1}C^{i+1})$$

where the  $C^i$  (cap) is obtained by attaching a carboxyl or amine group to the dangling bond of the residue  $R^i$ . On the right side of the equation,  $E(\text{AA}-C^{i-1}R^iC^{i+1})$ , is the total energy of the system formed by the AA molecule and the capped residue; the  $E(C^{i-1}R^iC^{i+1})$  term is the total energy of the blocked residue alone; and  $E(\text{AA}-C^{i-1}C^{i+1})$  is the total energy of the system formed by the AA and the covers alone. To conclude,  $E(C^{i-1}C^{i+1})$  is the total energy of the system formed only by the molecular caps. For the first-principles calculations, the methodology seen in early works [44,51], the positions of the non-hydrogen atoms were kept fixed while the positions of the hydrogen atom and AA0 were in principle optimized using the CHARMM force field [52], which has parameters specific for amino acids. Simulations were performed within the formalism of the DFT, using local density approximation for the correlation-change functional with a dispersion correction scheme (DFT/LDA/OBS) was carried out using the Dmol3 code [53,54]. To expand the Kohn-Sham electron orbitals, a set of numerical bases and double polarization (dynamic nuclear polarization [DNP]) was selected, considering all electrons, explicitly, and with restricted spin. The DNP basis set has an accuracy equivalent to the 6-311+G (3df, 2pd) Gaussian basis set [53,55], with negligible basis set superposition error. The orbital cutoff radius for this basis set was set to 3.7  $\text{\AA}$  and the self-consistent field convergence threshold to  $10^{-6}$  Ha. The binding energy of chain A of TcGAPDH-NAD<sup>+</sup> cofactor complexes was also calculated (by MFCC) to be compared with the TcGAPDH-AA0 complex.

## RESULTS AND DISCUSSION

### The MESP surface

The MESP surface allows to visualize the relative polarity of the compounds [56] and allows to predict the binding site between biological

molecules and their receptors [57,58], as well as being an important tool in the study of new drugs [59,60]. Associated with the dipole moment, the electronegativity and partial charge of the MESP [61], can be used to predict the types of intermolecular interaction, the molecule may carry as well as the sites of these interactions.

Given the electrostatic potential energy between a hypothetically positively charged ion (+1) located at a point (x, y, and z) and the molecule, the electrostatic potential at x, y, and z is calculated. The ion repulsion means the potential is positive, being the ion attracted by the molecule, then the potential is negative. Thus, electron-poor regions usually have positive potentials and electron-rich regions usually have negative potentials, the MEP at a point  $r$  in the space around a molecule (in atomic units) can be expressed as follows [62]:

$$V(r) = \sum_A \frac{Z_A}{|R_A - r|} - \int \frac{\tilde{n}(r')}{|r - r'|} dr'$$

where  $Z_A$  is the charge on nucleus A, located at  $R_A$  and  $\rho(r')$  is the electronic density function for the molecule.  $V(r)$  is the resulting electrostatic net effect produced at the point  $r$  by both the electrons and the cores of the molecule, where the first term represents the contributions due to the potential for electrons and the second term due to the cores. The knowledge of the charge distribution, identifying their partial densities, helps in understanding the form of interaction between a molecule and another, and thus, one can identify the molecular reactive site [63,64].

AA (15:0) has in its structure a nucleus derived from salicylic acid substituted with an alkyl chain composed of 15 carbon atoms, linked

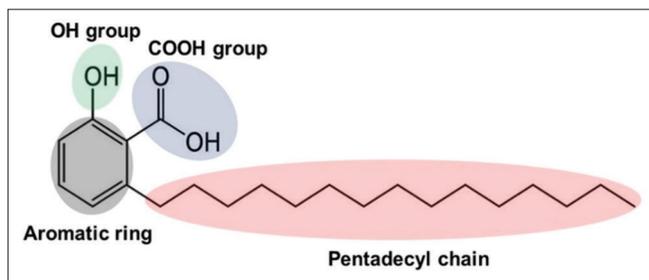


Fig. 1: Two-dimensional molecular structure of saturated alkyl anacardic acid 0

only by typo sigma bonds (Fig. 1), the electrostatic potential map is shown in Fig. 2, the 3D charge distributions of the molecule, while negative electrostatic potentials (with intensity proportional to the absolute value of the potential energy) are shown in red, positive electrostatic potentials are visualized in blue and green, areas with potentials close to zero are perceived.

A negative charge partial density in the carboxyl group indicates a region rich in electrons, this fact can be explained by the presence of pairs of non-binding electrons in oxygen, and by the difference of electronegativity in relation to the carbon atom, being indicative of nucleophilic site. While in the alkyl group, a potential close to zero was observed, characterizing a region predominantly not polar.

#### Molecular docking and MFCC

The best-fit conformation in the docking simulation of (AA0) is shown in Fig. 3, together with the cholepin docking configuration (obtained from crystallographic data of the TcGAPDH complex - cholepin, PDB 1K3T) for comparison. It is possible to observe that the AA0 molecule occupies a region near the active site of the cholepin molecule in the TcGAPDH enzyme. The AA0 can interact with a large number of residues due to its long chain. In addition, it consists of a polar head with a benzene ring and a long hydrophobic tail. The polar head favors the formation of hydrogen bonds, while the tail can interact with amino acids that have a hydrophobic character.

Fig. 4 shows the molecular two-dimensional interaction map for AA0 and TcGAPDH complex. As it can be seen, there are many kinds of interaction, since weak interactions by London dispersion forces (pale pink), sigma-pi interactions (lilac), pi-pi stacking (darker pink), and hydrogen bonding (bright green) are found. Those interactions are in agreement with AA0/cholepin docking with TcGAPDH complex. The TcGAPDH-AA0 complex (with the AA0 better conformation in the docking simulation) was used in the MFCC calculations.

Based on the DFT, the interaction energy of the amino acid residues was determined, through computations using the MFCC approach. The amino acids that showed significant interaction energy for stabilizing the AA0 molecule were: Ile13; Met16; Ser134,224; Ala135,164,228; Pro136; Cys165; Thr167,197,226; His194; Gly227; Arg249; Asp334; Asn335; Glu336; and Tyr339. The binding site, interaction energy, and residues domain (BIRD) panel (Fig. 5) show a graphical display with interaction energies between ligand and the most important amino acid residues comprising the binding site of the TcGAPDH enzyme. This panel shows relevant residues interacting with AA contributing to its energy stabilization at the binding site of the gGAPDH enzyme.

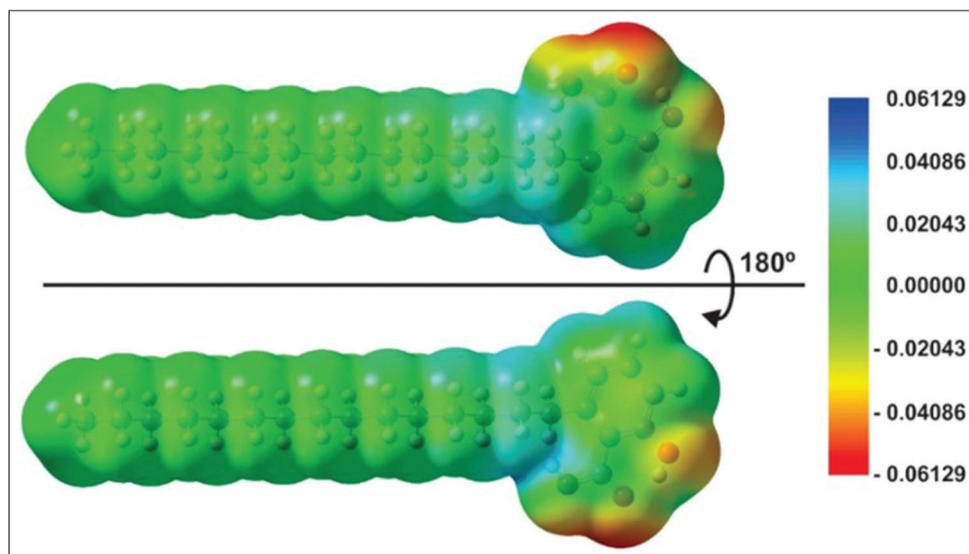


Fig. 2: Molecular electrostatic potential surface of saturated alkyl anacardic acid 0

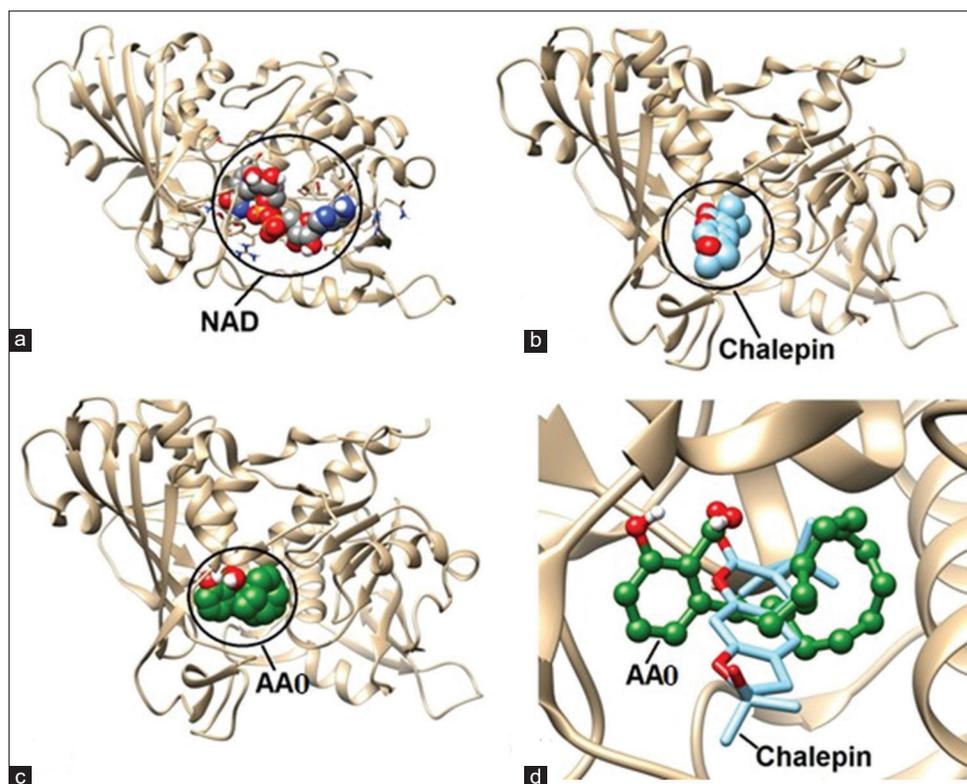


Fig. 3: *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TcGAPDH) complexes crystallized with (a) nicotinamide-adenine-dinucleotide, (b) chalepin. Docking between TcGAPDH and anacardic acid (AAO) (c) and binding site of AAO and chalepin in the TcGAPDH (d)

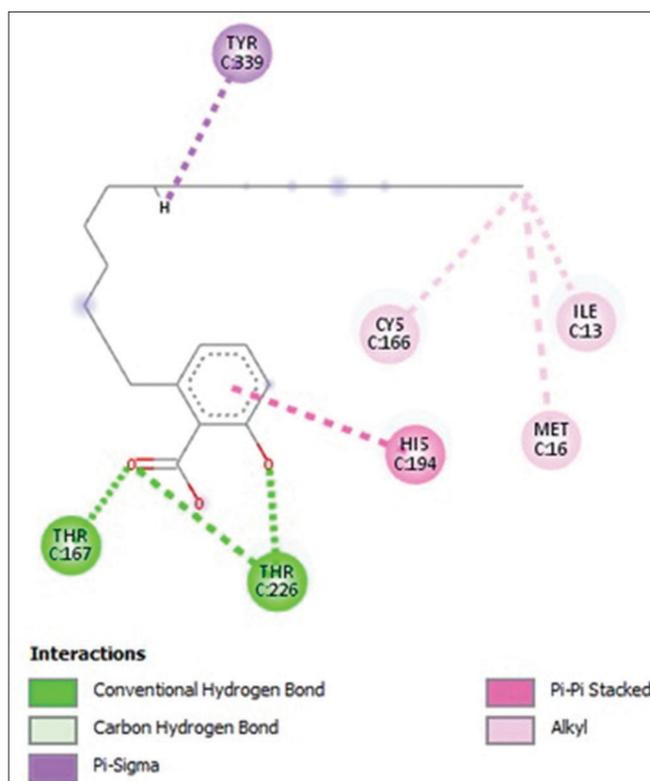


Fig. 4: Two-dimensional molecular map for intermolecular interactions between anacardic acid and *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase residues

This panel is a new version of BIRD [43] and shows: (i) The interaction energy of each residue with the AA0 molecule using horizontal bars, based on which can quantitatively estimate the role of each residue in the binding site, i.e., its efficacy to attract or repel the drug; (ii) the most significant residues for the bond on the left side; (iii) the atoms that show the shortest distance between the amino acid residue and the ligand; (iv) the left side panel containing the minimum distance in angstroms between amino acid ligands; and (v) the bars indicating the interaction strength between ligand and residues of TcGAPDH show colors that depend on the side chain of each amino acid score.

It is possible to see in Fig. 5 the attached BIRD that 22 residues contribute to the stabilization of AA0: Arg12, Ile13, Arg15, Met16, Asp38, Glu109, Pro136, Ala164, Ser165, Cys166, Thr167, His194, Thr197, Thr226, Ala228, Arg249, Asp254, Asp334, Asn335, Glu336, Tyr339, and Arg342, whereas only one Ala135 amino acid residue has positive (repulsive) interaction energy. Pavão *et al.* [49] reported that the residues Thr167, Cys166, Arg249, and Asp210 of the gGAPDH enzyme have important interactions with chalepin. The residue Thr167 interacts with the oxygen of the CO group of chalepin through the W739 [49]. The Cys166 residue shows a characteristic hydrophobic interaction with the 1,1-dimethylallyl group; a hydrogen interaction with the Arg249 is also reported, and finally, a weak interaction of hydrogen with Asp210 is intermediated by W812 water. Due to the structural differences of the ligands, the above amino acids may or may not show molecular interactions relevant to AA0 stabilization, as it can be observed in the BIRD panel.

Residue Ile13 has the strongest binding energy, approximately 25 kcal/mol with AA0, through a strong Van der Waals interaction involving the AA0 tail and the side chain of Ile13, both with hydrophobic characteristics. Although the hydrophobic interactions are admittedly one of the weakest, it is relatively strong because of the proximity

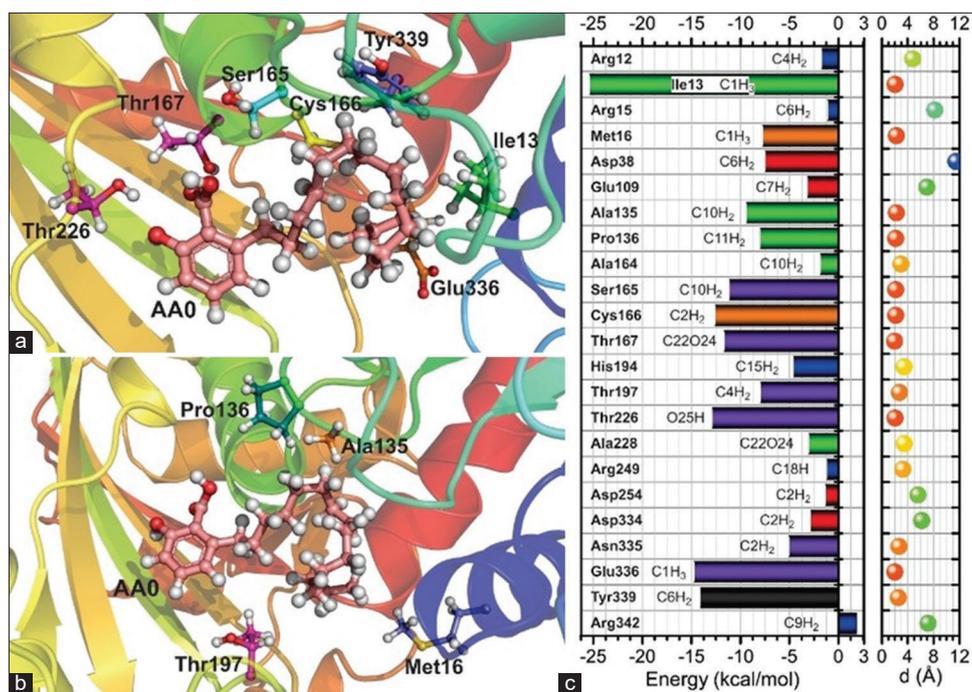


Fig. 5: (a) Anacardic acid (AA) binding site obtained from molecular docking, highlighting important residues of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TcGAPDH): Tyr339, Ser165, Cys166, Thr167, Ile13, Thr226, and Glu336. (b) Another view of the AA binding site obtained from molecular docking, highlighting Pro136, Ala 135, Thr197, and Met16 residues. (c) Interaction energy, binding site, and domain of residues, showing relevant residues interacting with AA, contributing to its energy stabilization at the binding site of the TcGAPDH enzyme. Amino acid residues have colors that depend on the side chain of each: Nonpolar, aliphatic; aromatic; polar, uncharged; sulfur-containing; charged negative (acidic); and charged positive (basic)

between the chemical groups of both binder and residue, which is about 2 Å, as well as the extent of the side chain of the Ile13 residue, which is approximately 4 Å.

The second amino acid with the strongest interaction energy is Glu336, with a binding energy around 15.0 kcal/mol, due to the natural formation of an AA0 electrostatic dipole inside the tail-binding site, with absence of electrons, which favors the interaction with amino acids that have more electronegative atoms or side chains, which is the case of Glu336 that has the COO<sup>-</sup> group.

The third most important residue, Tyr339, has binding energy with the AA0 of 14.1 kcal/mol due to a sigma-pi interaction, caused by the presence of an aromatic ring rich in electrons in the side chain of that amino acid, as well as positive characteristic of the AA0 tail. We can also observe that the method used to calculate the interaction energy was able to describe a pi-pi interaction between the aromatic rings of AA0 and the side chain of the His194 residue, with an intensity of about 5.0 kcal/mol. The residues Thr167 and Thr226 interact with AA0 through a hydrogen interaction of about 12.0 kcal/mol and 13.0 kcal/mol, respectively. The hydrogen of the OH group of Thr167 interacts with the oxygen of the CO group of the polar region of AA0, which are separated by a distance of 1.95 Å, whereas the other hydrogen bond is due to the interaction of the hydroxyl hydrogen of the residue Thr226 and the oxygen of the AA0 hydroxyl group. Together, Ser165 and Cys166 create a region with a positive electrostatic potential, which couples with the region of the AA0 hydrophobic tail that has electronegative characteristics, thus producing a relevant attractive interaction between these amino acids of approximately 13.0 kcal/mol.

## CONCLUSION

The paper presents an improved quantitative analysis approach for assessing the contribution of individual amino acids to the free energy of interaction between organic ligands (such as AA) and target protein (like GAPDH). Specifically, the paper illustrates the advantageous

approach of combining the molecular docking (such as the mostly used AutoDock Vina program) with the MFCC method. It was obtained more reliable quantitative information on the interaction of AA with the active site of the enzyme TcGAPDH by combining MFCC with molecular docking. It has been verified that the AA0 molecule occupies a region near the active site of the chalepin molecule in the TcGAPDH enzyme and that residue Ile13 has the strongest binding energy, approximately 25 kcal/mol with AA0, through a strong Van der Waals interaction.

## ACKNOWLEDGMENTS

Acknowledge the financial support received during the development of this work from the Brazilian National Council (CNPq).

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

The research was developed with: Conceptualization and use of the software by (Prof. Dr. Ricardo Santos and Prof. Dr. Valder Nogueira); Methodology (Msc. Marcia Marinho, Prof. Dr. Ricardo Santos, Dr<sup>a</sup> Eveline Bezerra, Prof. Dr. Roner Costa and Prof. Dr. Emmanuel Marinho); Investigations and resources (Prof. Dr. Ricardo Santos and Msc. Marcia Marinho); Supervision and Project administration (Prof. Dr. Ricardo Santos and Prof. Dr. Eudenilson Albuquerque); Funding Acquisition (Prof. Dr. Ricardo Santos, Prof. Dr. Valder Nogueira, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alice Martins, prof. Dr. Pedro Lima Neto and Prof. Dr. Eudenilson Albuquerque); and Writing-Original Draft Preparation (Msc. Marcia Marinho, Dr<sup>a</sup> Eveline Bezerra, Msc. Ciro Figueira, Prof. Dr. Roner Costa and prof. Dr. Emmanuel Marinho). All authors had a contribution to the final manuscript.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## FUNDING

This research received financial support from Brazilian National Council (CNPq) projects 151182/2013-2 and 447592/2014-9. This

study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

## REFERENCES

- Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010;375:1388-402. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014067361060061X>.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:75-85.
- Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the united states. *Clin Microbiol Rev* 2011;24:655-81.
- Jackson Y, Gétaz L, Wolff H, Holst M, Mauris A, Tardin A, et al. Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among latin American migrants in Geneva, Switzerland. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:1-7.
- Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:3-24.
- Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer E, Mukherjee S, et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell Microbiol* 2013;14:634-43.
- Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized Trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2015;373:1295-306.
- Sosa-Estani S, Viotti R, Leonor ES. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: Insight gained in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:167.
- Bakker BM, Westerhoff HV, Opperdoes FR, Michels PA. Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Mol Biochem Parasitol* 2000;106:1-10.
- Ladame S, Castilho MS, Silva CH, Denier C, Hannaert V, Périé J, et al. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with an analogue of 1,3-bisphospho-D-glyceric acid: Selective inhibition by structure-based design. *Eur J Biochem* 2003;270:4574-86.
- Prokopczyk IM, Ribeiro JF, Sartori GR, Sesti-Costa R, Silva JS, Freitas RF, et al. Integration of methods in cheminformatics and biocalorimetry for the design of trypanosomatid enzyme inhibitors. *Future Med Chem* 2013;6:17-33.
- Harris JL, Waters M. In: Boyer P, editor. *The Enzymes*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Academic Press; 1976. p. 1-49.
- Zinsser VL, Hoey EM, Trudgett A, Timson DJ. Biochemical characterisation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Biochim Biophys Acta* 2014;1844:744-9.
- Nowicki MW, Tulloch LB, Worrall L, McNae IW, Hannaert V, Michels PA, et al. Design, synthesis and trypanocidal activity of lead compounds based on inhibitors of parasite glycolysis. *Bioorg Med Chem* 2008;16:5050-61.
- Yang S, Pannecouque C, Daelemans D, Ma XD, Liu Y, Chen FE, et al. Molecular design, synthesis and biological evaluation of BP-O-DAPY and O-DAPY derivatives as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2013;65:134-43.
- Nicholls C, Li H, Liu JP. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:674-9.
- Tarze A, Deniaud A, Le Bras M, Maillier E, Molle D, Larochette N, et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* 2007;26:2606-20.
- Menezes IR, Lopes JC, Montanari CA, Oliva G, Pavão F, Castilho MS, et al. 3D QSAR studies on binding affinities of coumarin natural products for glycosomal GAPDH of *Trypanosoma cruzi*. *J Comput Aided Mol Des* 2003;17:277-90.
- Hanau S, Rinaldi E, Dallochio F, Gilbert IH, Dardonville C, Adams MJ, et al. 6-phosphogluconate dehydrogenase: A target for drugs in African trypanosomes. *Curr Med Chem* 2004;11:2639-50.
- De Marchi AA, Castilho MS, Nascimento PG, Archanjo FC, Del Ponte G, Oliva G, et al. New 3-piperonylcoumarins as inhibitors of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem* 2004;12:4823-33.
- Schmelzer GH, Gurib-Fakim R, Ameenah B. *Plant Resources of Tropical Africa 11(1): Medicinal Plants 1*. Vol. 11. Wageningen: PROTA Foundation; 2008.
- Vieira PC, Mafezoli J, Pupo MT, Fernandes JB, da Silva MF, de Albuquerque S, et al. Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the rutales. *Pure Appl Chem* 2001;73:617-22.
- Pereira JM, Severino RP, Vieira PC, Fernandes JB, da Silva MF, Zottis A, et al. Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem* 2008;16:8889-95.
- Santos RP, Santiago AA, Gadelha CA, Cajazeiras JB, Cavada BS, Martins JL, et al. Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes. *J Food Eng* 2007;79:1432-7.
- Hemshekhkar M, Santhosh MS, Kemparaju K, Girish KS. Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: A pharmacological overview. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;110:122-32.
- Kubo I, Masuoka N, Ha TJ, Tsujimoto K. Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chem* 2006;99:555-62.
- Mendes N, Oliveira A. Atividade moluscicida da mistura de ácidos 6-n-alquil salicílicos (ácido anacárdico) e dos seus complexos com cobre (II) e chumbo (II). *Rev Soc Bras Med* 1990;23:217-24. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v23n4/07.pdf>.
- Oliveira MS, Morais SM, Magalhães DV, Batista WP, Vieira ÍG, Craveiro AA, et al. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. *Acta Trop* 2011;117:165-70.
- Tan J, Chen B, He L, Tang Y, Jiang Z, Yin G, et al. Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) induces apoptosis of prostate cancer cells through inhibition of androgen receptor and activation of p53 signaling. *Chin J Cancer Res* 2012;24:275-83.
- Tyman JH. Long-chain phenols. Part III identification of the components of a novel phenolic fraction in *Anacardium occidentale* (cashew nut-shell liquid) and synthesis of the saturated member. *J Chem Soc Perkin* 1973;1:1639-47.
- Freitas RF, Prokopczyk IM, Zottis A, Oliva G, Andricopulo AD, Trevisan MT, et al. Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors. *Bioorganic Med Chem* 2009;17:2476-82.
- Dahl SG, Sylte I. Molecular modelling of drug targets: The past, the present and the future. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;96:151-5.
- Roberto CA, Marinho ES, Campos OS. Neo-chlorogenic acid: Conformational and molecular analysis by semi-empirical methods. *Int J Recent Res Rev* 2019;12:21-6.
- Ziegler T, Autschbach J. Theoretical methods of potential use for studies of inorganic reaction mechanisms. *Chem Rev* 2005;105:2695-722.
- Bezerra EM, Flores MZ, Caetano EW, Freire VN, Lemos V, Cavada BS, et al. Quantum mechanical ab initio calculations of the Raman scattering from psoralens. *J Phys Condens Matter* 2006;18:8325-36. Available from: <http://www.stacks.iop.org/0953-8984/18/i=35/a=017?key=crossref.7a39631f55a558529eb9a2b0f6680af9>.
- Devipriya B, Kumaradhas P. Charge density distribution and the electrostatic moments of CTPB in the active site of p300 enzyme: A DFT and charge density study. *J Theor Biol* 2013;335:119-29.
- Pires R, Marinho MM, Sá RA, Martins JL, Teixeira EH, Chagas F, et al. Compositional analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ash and its *in vitro* antifungal activity against *Fusarium* species. 2011;9:200-5.
- Brooijmans N, Kuntz ID. Molecular recognition and docking algorithms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2003;32:335-73. Available from: <http://www.annualreviews.org>.
- Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Protein-ligand docking: Current status and future challenges. *Proteins Struct Funct Bioinf* 2006;65:15-26.
- Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:935-49.
- Sooderhjelms SG, Ryde U. Protein-ligand interactions. In: Gohlke H, editor. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co.; 2012. p. 121-44.
- Zanatta G, Barroso-Neto IL, Junior VB. Quantum biochemistry description of the human dopamine D3 receptor in complex with the selective antagonist eticlopride. *J Proteomics Bioinform* 2012;5:155-62. Available from: <https://www.omicsonline.org/quantum-biochemistry-description-of-the-human-dopamine-d3-receptor-in-complex-with-the-selective-antagonist-eticlopride-jpb.1000229.php?aid=7520>.
- Da Costa RF, Freire VN, Bezerra EM, Cavada BS, Caetano EW, De Lima Filho JL, et al. Explaining statin inhibition effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations. *Phys Chem Phys* 2012;14:1389-98.
- Zhang DW, Zhang JZ. Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein-molecule interaction energy. *J Chem Phys* 2003;119:3599-605.

45. Devipriya B, Kumaradhas P. Probing the effect of intermolecular interaction and understanding the electrostatic moments of anacardic acid in the active site of p300 enzyme via DFT and charge density analysis. *J Mol Graph Model* 2012;34:57-66.
46. Da Silva JG, Souza IA, Higino JS, Siqueira JP, Pereira JV, Pereira MD. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Braz J Pharmacogn* 2007;17:572-7.
47. Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad ES, Coleman RG. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *J Chem Inf Model* 2012;52:1757-68.
48. Trott O, Olson A. NIH public access. *J Comput Chem* 2010;31:455-61.
49. Pavão F, Castilho MS, Pupo MT, Dias RL, Correa AG, Fernandes JB, et al. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. *FEBS Lett* 2002;520:13-7.
50. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004;25:1605-12.
51. Barroso-Neto IL, Marques JP, Da Costa RF, Caetano EW, Cavada BS, Gottfried C, et al. Inactivation of ovine cyclooxygenase-1 by bromoaspirin and aspirin: A quantum chemistry description. *J Phys Chem B* 2012;116:3270-9.
52. Momany FA, Rone R. Validation of the general purpose QUANTA®3.2/CHARMm® force field. *J Comput Chem* 1992;13:888-900.
53. Delley B. An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. *J Chem Phys* 1990;92:508-17.
54. Delley B. From molecules to solids with the DMol3 approach. *J Chem Phys* 2000;113:7756-64.
55. Inada Y, Orita H. Efficiency of numerical basis sets for predicting the binding energies of hydrogen bonded complexes: Evidence of small basis set superposition error compared to gaussian basis sets. *J Comput Chem* 2008;29:225-32.
56. Reed AE, Weinhold F. Natural localized molecular orbitals. *J Chem Phys* 1985;83:1736-40.
57. Politzer P, Murray JS. The fundamental nature and role of the electrostatic potential in atoms and molecules. *Theor Chem Acc* 2002;108:134-42.
58. Yearley EJ, Zhurova EA, Zhurov VV, Pinkerton AA. Experimental electron density studies of non-steroidal synthetic estrogens: Diethylstilbestrol and dienestrol. *J Mol Struct* 2008;890:240-8.
59. Hibbs DE, Overgaard J, Platts JA, Waller MP, Hursthouse MB. Experimental and theoretical charge density studies of tetrafluorophthalonitrile and tetrafluoroisophthalonitrile. *J Phys Chem B* 2004;108:3663-72.
60. Politzer P, Murray JS, Peralta-Inga Z. Molecular surface electrostatic potentials in relation to noncovalent interactions in biological systems. *Int J Quantum Chem* 2001;684:676-84.
61. Ophardt CE. Virtual ChemBook. Elmhurst College; 2003. Available from: <http://www.chemistry.elmhurst.edu/vchembook/index.html>. [Last accessed on 2018 Jan 25].
62. Prabavathi N, Nilufer A, Krishnakumar V. Vibrational spectroscopic (FT-IR and FT-Raman) studies, natural bond orbital analysis and molecular electrostatic potential surface of isoxanthopterin. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 2013;114:101-13.
63. Herring GE, Petrucci RH, Harwood WS, Madura J. General Chemistry: Principles and Modern Applications. 9<sup>th</sup> ed. New Jersey: Pearson Education Inc.; 2007.
64. Seminario J, editor. Recent Developments and Applications of Modern Density Functional Theory. 1<sup>st</sup> ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 1996. p. 3-838. Available from: <https://www.sciencedirect.com/bookseries/theoretical-and-computational-chemistry/vol/4>.