



instituto de
ciências farmacêuticas
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

Iara Garcia Miller de Souza

Triagem virtual na busca por produtos naturais inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase de *Sporothrix schenckii*

**Macaé
2022**



instituto de
ciências farmacêuticas
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

Iara Garcia Miller de Souza

Triagem virtual na busca por produtos naturais inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase de *Sporothrix schenckii*

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio de Janeiro - Campus Macaé, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharel em farmácia.

Orientadora: Prof^a Dra. Paula Alvarez Abreu

Macaé
2022

Iara Garcia Miller de Souza

Triagem virtual na busca por produtos naturais inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase de *Sporothrix schenckii*

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 21 de dezembro de 2022.

Comissão avaliadora:

Prof^a. Dr^a Paula Alvarez Abreu
<http://lattes.cnpq.br/1275935652105959>
Orientador e Presidente da Banca
UFRJ/Campus Macaé

Prof^a. Dr^a Elaine dos Anjos da Cruz da Rocha
<http://lattes.cnpq.br/5154038840072425>
UFRJ/Campus Macaé
1º Examinador

Dr. Evenilton Pessoa Costa
<http://lattes.cnpq.br/7545026099459274>
UFRJ/Instituto de Biodiversidade
e Sustentabilidade (NUPEM)
2º Examinador

S729t

Souza, Iara Garcia Miller de

Triagem virtual na busca por produtos naturais inibidores da enzima
3- hidroxí-3-metilglutaril coenzima A redutase de *Sporothrix schenckii*. / Iara Garcia
Miller de Souza. -- Macaé, 2022.
83 f.

Orientador: Paula Alvarez Abreu

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de
Janeiro, CM UFRJ Macaé, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em
Farmácia, 2022.

1. Química farmacêutica. 2. Desenho de fármacos. 3. Micologia. 4. Esporotricose.
I. Abreu, Paula Alvarez, orient. II. Título.

CDD 615.19

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Biblioteca Central - Centro Multidisciplinar UFRJ Macaé
Bibliotecário(a) Rosangela Ribeiro Magnani Diogo CRB7/3719

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Jesus Cristo por todo amor, carinho e bênçãos concedidos a minha vida. Tenho pessoas que me dedicam imenso amor e saúde e isso é tudo que alguém pode querer.

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional em tudo que me proponho a fazer. Em especial aos meus avós, Corina e Átila, e minha mãe, Flávia, por acreditarem em mim mais que eu mesma. É um privilégio compartilhar a vida com cada um de vocês e ser alvo de amor e dedicação de vocês, obrigada por contribuírem na minha formação pessoal e profissional. Soma-se a este grupo Gabriel sempre atencioso, amoroso e apaziguador dos turbilhões meu emocionais, principalmente na vida acadêmica.

Às minhas amigas da graduação por todo o aprendizado compartilhado e pelos momentos de leveza em meio às preocupações e adversidades enfrentadas durante a graduação

A minha orientadora Paula Abreu pela paciência, dedicação, confiança, incentivo e apoio. Para ela nada parece impossível, é só querer que a gente consegue.

Ao João Pedro Mello por toda a paciência e boa vontade em co-orientar este trabalho. Sua paciência e ânimo em ensinar tornou esse processo mais fácil e enriquecedor.

A banca examinadora por disponibilizar seu tempo e contribuírem para a ciência e educação no país.

Não posso esquecer de agradecer a todos os meus professores, cada semeou em mim o interesse pelo conhecimento e pela ciência além de mostrarem oportunidades que desconheciam ou pareciam utópicas.

A todos dedico muito carinho, pensamentos positivos e imensa gratidão.

RESUMO

A esporotricose é a infecção fúngica subcutânea hiperendêmica no Brasil, podendo ser considerada uma doença negligenciada. Também pode se apresentar na forma linfocutânea e na forma disseminada. Ela é causada principalmente por *Sporothrix schenckii* e *S. brasiliensis*, fungos termodimórficos de transmissão sapronótica ou zoonótica, respectivamente. O seu tratamento farmacológico longo e caro e na esporotricose felina há o alto risco de transmissão gato-cuidador. As estatinas são empregadas no controle de dislipidemias e colesterol através da inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A Redutase (HMGR) e observou-se ação antifúngica *in vitro* para cepas de *Sporothrix spp.* (BRILHANTE *et al.*, 2020). Assim, a busca por inibidores da SsHMGR a partir das estatinas usando modelagem molecular pode contribuir para novos fármacos para o tratamento da esporotricose. Identificar potenciais inibidores da HMGR de *Sporothrix schenckii* (SsHMGR) através da triagem virtual baseada no farmacóforo e no receptor e avaliar as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas *in silico*. A estrutura tridimensional da SsHMGR foi construída por modelagem comparativa no SWISS-MODEL e validada pela análise do gráfico de Ramachandran no PROCHECK e nos servidores SAVES e Prosa. A validação do método de docking foi feita pelo redocking das estatinas na estrutura cristalográfica HMGR de *H. sapiens*. O modelo de farmacofórico foi construído no servidor Pharmit e a triagem virtual realizada nos bancos de dados Nubbe. As moléculas que respeitaram o farmacóforo tiveram propriedades farmacocinéticas e toxicológicas avaliadas nos servidores FAF-DRUGS4, pkCSM e Osiris Property Explorer. Para a construção dos modelos, o molde usado foi o cristal PDB:2Q1L da HMGR de *Homo sapiens* com percentual de identidade acima de 50% e de cobertura de 33%. O desvio médio quadrado (RMSD) da sobreposição entre o molde e os modelo foi de 0,26 Å. O modelo apresentou mais de 90% de resíduos nas regiões favoráveis do gráfico de Ramachandran, pela análise do Verify 3D o modelo teve 88,53% resíduos de aminoácidos com pontuação 0,2 e energia global (score-Z) DE -9,13. Os redocking das estatinas apresentaram RMSD de 0.969 a 1.688 Å e energias de ligação teórica de -9.4 a -7.0 kcal/mol. Tanto o modelo quanto a metodologia de docking foram validados. A atorvastatina foi o inibidor escolhido para a construção do modelo farmacofórico por conservar no modelo, interações importantes observadas também nas estruturas cristalográficas e na literatura. As interações hidrofóbicas com os resíduos de Leu1186 e/ou Val895 e ligação de hidrogênio com Ser1020, Lys1071, Asn 1091 se conservaram nas enzimas fúngicas e humana, sendo consideradas no modelo farmacofórico. A triagem virtual no Nubbe identificou inicialmente 10.047 possíveis inibidores da SsHMGR, após filtragem no servidor FAF-Drugs 4 sobraram 973, das quais 110 moléculas foram submetidas a uma inspeção visual. As 6 moléculas que respeitaram o farmacóforo tiveram propriedades farmacocinéticas e toxicológicas e interações, destas 4 apresentaram perfil farmacocinético e toxicológico teórico promissor. O modelo construído é adequado para propor novos antifúngicos para o combate da esporotricose. A triagem identificou quatro produtos naturais como potenciais inibidores da SsHMGR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
BHI	<i>Blood Heart Infusion</i> , Infusão cérebro coração
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
EL	Energia de ligação
GAFFI	<i>Global Action For Fungal Infections</i> , Fundo Global de Ações contra Infecções Fúngicas
hERG	Canais de potássio <i>ether-a-go-go</i>
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase
HsHMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase de <i>Homo sapiens</i>
LBVS	<i>Ligand-based virtual screening</i> , Triagem virtual baseada em ligante
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i> , Concentração inibitória mínima
ml	Mililitros
NADPH	Nicotinamida adenina difosfato
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
PAINS	<i>Pan Assay Interference Compounds</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i> , Banco de Dados de Proteínas
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSD	<i>Root mean square deviation</i> , Desvio médio da raiz quadrada
SAVES	<i>Structure Analysis and Verification Server</i>
SBVS	<i>Structure-based virtual screening</i> , Triagem virtual baseada na estrutura do alvo molecular
SMILES	<i>Simplified molecular-input line-entry system</i>
SPDBV	<i>Swiss PDB Viewer</i>
SsHMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase de <i>Sporothrix schenckii</i>
µg	Microgramas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Manifestações clínicas da esporotricose em humanos (A) Apresentação cutânea (B) Apresentação linfocutânea em que há ulceração no local do trauma e nódulos linfáticos longo do vaso linfático. 3
- Figura 2. Manifestações clínicas da esporotricose felina (A) Edema e lesão ulcerada na região nasal (B) Lesões cutâneas ulceradas na região da face e próximas à orelha. 4
- Figura 3. Características morfológicas de *S. schenkii*. (A) células em forma de charuto ou ovais parecidas com leveduras dentro de macrófagos (B) forma filamentosa (C) Macromorfologia das colônias de *S. brasiliensis*. 5
- Figura 4. Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos e seus principais alvos. 6
- Figura 5. Estrutura Química dos antifúngicos azóis divididos em imidazóis: (a) Miconazol, (b) Clotrimazol, (c) Cetoconazol e em triazóis: (d) Fluconazol, (e) Voriconazol, (f) Isavuconazol, (g) Itraconazol, (h) Posaconazol 8
- Figura 6. Estrutura química do antifúngicos (a) Anfotericina B e (b) Nistatina. 10
- Figura 7. Estrutura Química dos antifúngicos (a) Caspofungina e (b) Micafungina da classe equinocandinas. 12
- Figura 8. Estrutura Química do antifúngicos flucitosina. 13
- Figura 9. Estrutura química do antifúngicos (a) Terbinafina e (b) Naftifina. 13
- Figura 10. Estrutura Química do ergosterol e colesterol 16
- Figura 11. Via biossintética do ergosterol em fungos. 17
- Figura 12. Representação e equação geral da reação catalisada pela HMGR. 18
- Figura 13. Estrutura Química do substrato HMG-CoA e produto mevalonato da HMGR e da estatina mevastatina na forma ácida aberta. 20
- Figura 14. Estrutura Química das estatinas (1) Mevastatina, (2) Lovastatina, (3) Sinvastatina, (4) Pravastatina, (5) Fluvastatina, (6) Cerivastatina, (7) Atorvastatina e (8) Rosuvastatina (9) Inibidor sintético da HMGR baseado no pirrol presente no PDB: 2Q1L. 22

- Figura 15. Alinhamento entre as sequências de resíduos de aminoácidos das enzimas HMGR de *H. sapiens*, *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*. 37
- Figura 16. Modelo tridimensional da enzima SsHMGR obtido colorido por cadeia. 40
- Figura 17. Gráficos de Ramachandran do (A) molde de HMGR de *H. sapiens*, (B) modelo de HMGR *S. schenckii*. 41
- Figura 18. Perfil 3D-1D do (A) molde de HMGR de *H. sapiens*, (B) modelo de HMGR *S. schenckii*. 42
- Figura 19. Gráfico de Z-score calculado para (A) molde HsHMGR e (B) modelo SsHMGR para qualidade geral. Gráfico de energia em função de cada resíduo para (C) molde HsHMGR e (D) modelo para qualidade local 43
- Figura 20. (A) Proteína molde HsHMGR (rosa) e o modelo de SsHMGR (verde) sobrepostos, com ampliação dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das enzimas num raio de 5 Å de distância do inibidor (9) complexa a estrutura da HsHMGR (código PDB: 2Q1L). (B) Descrição dos resíduos de aminoácidos das enzimas HsHMGR e SsHMGR 44
- Figura 21. Redocking dos inibidores nas estruturas cristalográficas de HMGR de *H. sapiens*, com seus valores de códigos PDB, RMSD em ângstroms (Å) e energia de ligação (EL). 45
- Figura 22. Sobreposição dos inibidores complexados nas estruturas cristalográficas de HMGR de *H. sapiens*. 46
- Figura 23. (A) Interações e modo de ligação da atorvastatina no sítio ativo da SsHMGR obtido por docking molecular, EL = -8,5 kcal/mol (B) Conformação da atorvastatina obtida por docking sobreposta a conformação observada para a estatina complexada à estrutura cristalográfica de HMGR de *H. sapiens*. 47
- Figura 24. Modelos farmacofóricos construídos a partir da atorvastatina com as distâncias e ângulos entres os pontos farmacofóricos. Em laranja pontos aceptores de ligação de hidrogênio e em roxo ponto aromático. 48
- Figura 25. Sobreposição das poses dos produtos naturais obtidos na triagem virtual com a atorvastatina. 49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais interações conservadas entre os inibidores complexados com as estruturas cristalográficas de *HsHMGR* e o modelo *SsHMGR*. 46

Quadro 2. Produtos naturais selecionados por triagem virtual a partir do banco de dados do Nubbe. Energia de ligação (EL) estimada pelo programa *Autodock Vina* 1.1.2 (em Kcal/mol). 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentual de identidade entre as sequências de diferentes espécies de fungos e *H. sapiens*. 39

Tabela 2. Propriedades farmacocinéticas e toxicológicas teórica de produtos naturais potenciais inibidores da SsHMGR por triagem virtual, atorvastatina e itraconazol. 57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Esporotricose.	1
1.2 Mecanismo de ação dos antifúngicos disponíveis atualmente	5
1.2.1 Azóis	6
1.2.2 Polienos	9
1.2.3 Equinocandinas	10
1.2.4 Análogos de Pirimidinas	12
1.2.5 Alilaminas	13
1.3 Tratamento da esporotricose	14
1.4 Biossíntese do ergosterol	15
1.4.1 Enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR) como alvo terapêutico antifúngico.	17
1.4.2 Estatinas como inibidores da HMGR	19
1.6 Produtos naturais como fonte para o desenvolvimento de novos fármacos.	23
1.7 Modelagem Molecular no desenvolvimento de novos fármacos	24
1.7.1 <i>Docking</i> molecular e triagem virtual	24
1.7.2 Modelagem comparativa para obtenção da estrutura 3D de alvos moleculares	26
1.7.3 Propriedades ADMET <i>in silico</i>	26
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivos Gerais	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Construção dos modelos tridimensionais da HMGR de <i>S. schenckii</i> (SsHMGR) por modelagem comparativa	30
4.2 <i>Docking</i> molecular de inibidores conhecidos na HMGR de <i>S. schenckii</i> (SsHMGR)	31
4.3 Triagem virtual baseada em farmacóforo para busca de potenciais inibidores da SsHMGR	32
4.4 <i>Docking</i> molecular dos produtos naturais (PNs) brasileiros na SsHMGR	33
4.5 Análise das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas teóricas <i>in silico</i> dos ligantes resultantes na triagem virtual	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Construção e Avaliação do modelo tridimensional da SsHMGR	36
5.2 <i>Docking</i> molecular e avaliação do modo de ligação de inibidores conhecidos com a enzimas SsMMGR	44
5.3 Triagem virtual baseada em farmacóforo de produtos naturais brasileiros com potencial para inibidores da SsHMGR	47
5.4 Análise das propriedades ADMET <i>in silico</i> dos produtos naturais com potencial inibidor da SsHMGR.	56
6 CONCLUSÃO	58
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

O impacto médico das infecções causadas por fungos ainda é subestimado, a inclusão de doenças fúngicas na lista de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) da organização mundial da saúde ocorreu apenas em 2016, sendo o micetoma a primeira (WHO, 2021; RODRIGUES e NOSANCHUK, 2020). O Fundo Global de Ações contra Infecções Fúngicas (GAFFI - Global Action Fund for Fungal Infections) defende que outras doenças fúngicas ainda devam ser incluídas na lista de DTNs da OMS, são essas a esporotricose, paracoccidiodomicose e ceratite fúngica (GAFFI, 2021).

Os casos de infecções fúngicas invasivas impactam significativamente na saúde do seu hospedeiro, segundo a GAFFI mais de 300 milhões de pessoas sofrem de uma infecção fúngica grave por ano. O número de casos dessas doenças está crescendo tanto na comunidade como nos serviços de saúde, assim se tornando um problema de saúde pública (RODRIGUES e NOSANCHUK, 2020). Este crescimento, especialmente nos ambientes hospitalares, está relacionado com o aumento de pacientes imunocomprometidos. As mudanças climáticas e os aumentos das viagens também podem estar relacionados com mudanças geográficas na distribuição dos fungos (VALLABHANENI *et al.*, 2016; RODRIGUES e NOSANCHUK, 2020).

As zoonoses são doenças transmitidas entre animais vertebrados e humanos tendo bactéria, vírus, ectoparasita, um helminto, protozoário ou fungo como agentes etiológicos. A transmissão pode ser direta, através de mordidas, arranhões e do contato com secreções, ou indireta que ocorre por meio de vetores ou alimentos e água contaminados (AKRITIDIS, 2011; SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Algumas das infecções fúngicas com transmissão zoonótica estão entre o grupo das doenças fúngicas mais comuns, como a esporotricose, dermatofitose e histoplasmose. Outras doenças negligenciadas causadas por outros agentes biológicos também são zoonoses (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

1.1 Esporotricose.

A esporotricose é a infecção fúngica subcutânea com distribuição mundial causada principalmente por *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix globosa* e *Sporothrix*

brasiliensis (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; ROSSOW *et al.*, 2020). A infecção com *S. schenckii* e *S. globosa* é tradicionalmente sapronótica, ocorrendo através de sua inoculação traumática por matéria vegetal, como solo e plantas. Assim, passou a ser conhecida como "doença dos jardineiros". Mais raramente também pode ocorrer pela inalação dos conídios causando uma infecção pulmonar. Já a infecção pelo *S. brasiliensis* ocorre principalmente por transmissão zoonótica e epizootica através de arranhões e mordidas profundas ou contato com o exsudato das lesões cutâneas de animais infectados principalmente gatos (BARROS *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2014; ROSSOW *et al.*, 2020). A primeira epidemia de esporotricose transmitida por gatos parece ter ocorrido no Rio de Janeiro em 1998, onde atualmente é considerada hiperendêmica (ROSSOW *et al.*, 2020; SCHECHTMAN *et al.*, 2022).

O primeiro relato de esporotricose ocorreu em 1898 nos EUA (Schenck, 1898). Já o primeiro relato de transmissão zoonótica foi em 1952 também nos EUA e pela primeira vez no Brasil em 1955 onde alcançou o status de epidemia a partir de 1998 no Estado do Rio de Janeiro. Desde então a expansão e incidência da esporotricose de transmissão felina ocorrem de forma exponencial alcançando outros estados e países, como Argentina, Paraguai e Panamá (RIOS *et al.*, 2018; CÓRDOBA *et al.*, 2018; GREMIÃO *et al.*, 2021; ROSSOW *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2020; Lopes-Bezerra *et al.*, 2018). No Brasil ocorre principalmente nas regiões Sul e Sudeste (ROSSOW *et al.*, 2020; GREMIÃO *et al.*, 2021). Além disso, a esporotricose também é endêmica em países como Índia, Austrália, Japão, China, África do Sul e na América Latina (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017)

Apenas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no Rio de Janeiro foram registrados 4.517 casos de esporotricose humanos entre 1991 a 2015, 244 cães foram diagnosticados entre 1998 e 2014 e 4.703 gatos até 2015 (GREMIÃO *et al.*, 2017). Segundo a Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro, entre os anos de 2019 e 2020 foram confirmados 2.616 casos em humanos. Desde de julho de 2013 a esporotricose é considerada um agravo de notificação compulsória estadual no Rio de Janeiro (SES/RJ, 2021). No Rio Grande do Sul de 1958 a 1987 observou-se 311 casos de esporotricose em humanos e mais de 304 casos entre 1967 e 2002 na região sul. O surto nesta região do país apresenta características parecidas com as do Rio de Janeiro (DA ROSA *et al.*, 2005).

Faz-se necessário ressaltar que os dados epidemiológicos da esporotricose no Brasil provavelmente são subestimados e não se sabe sobre o impacto da morbimortalidade, já que esta doença não pertence a lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória. Apenas em alguns estados como o Rio de Janeiro, Pernambuco, Paraíba e em alguns municípios, como Guarulhos (São Paulo) e Camaçari (Bahia) há a obrigação de notificação (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2020 e SES/RJ, 2021).

Em humanos normalmente acomete pele, tecido celular subcutâneo e vasos linfáticos adjacentes, porém também pode estar na forma disseminada e/ou sistêmica, alcançando ossos, articulações, sistema nervoso central e demais órgãos e tecidos. Suas apresentações clínicas mais frequentes são lesões cutâneas (Figura 1.A) ou linfocutâneas na forma de pápulas (Figura 1.B), nódulos e úlceras que podem surgir dias ou meses após o trauma (BARROS *et al.*, 2011; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2020).



Figura 1. Manifestações clínicas da esporotricose em humanos (A) Apresentação cutânea (B) Apresentação linfocutânea em que há ulceração no local do trauma e nódulos linfáticos longo do vaso linfático. © Apresentação cutânea disseminada. Adaptada de: OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; ROSSOW *et al.*, 2020.

A esporotricose felina pode se apresentar na forma de lesões ulceradas na pele de maior ocorrência na região nasal, cabeça e membros associadas a linfonodos aumentados e a presença de sinais respiratórios como o espirros. As lesões assim como em humanos podem ter início dentro de dias até meses após a exposição, embora possa se estender por meses. Linfangite e lesões mucosas também foram observadas e podem estar associados à falha terapêutica (ROSSOW *et al.*, 2020).

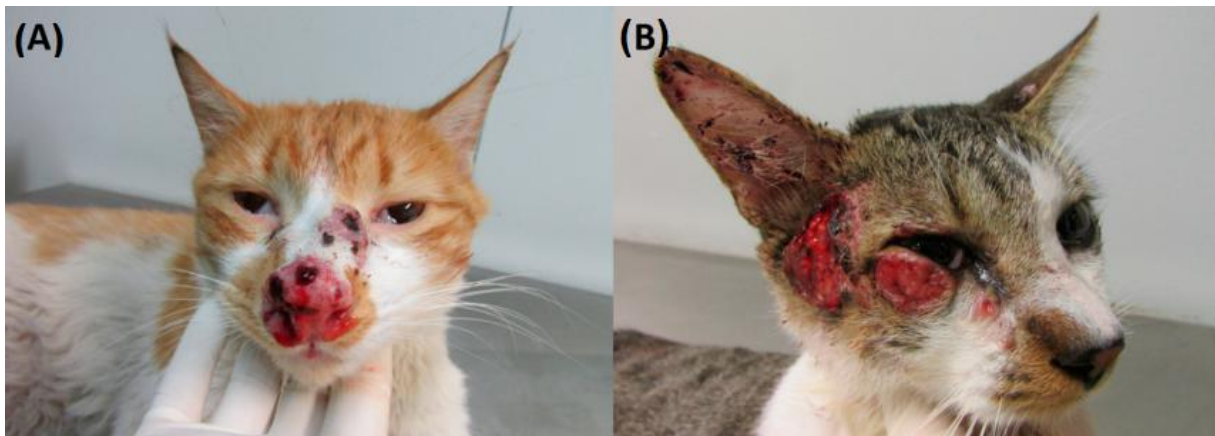


Figura 2. Manifestações clínicas da esporotricose felina (A) Edema e lesão ulcerada na região nasal (B) Lesões cutâneas ulceradas na região da face e próximas à orelha. Adaptada de: ROSSOW *et al.*, 2020.

O gênero *Sporothrix* é um complexo de espécies crípticas de fungos que são amplamente encontrados na natureza, estando presentes no solo, madeira em decomposição, vegetações e excrementos de animais. Apresentam dimorfismo térmico quando em sua fase saprofítica, no ambiente (25 °C), estão morfologicamente na forma de hifas filamentosas (forma de mofo) e podem produzir conídios. Nos tecidos do hospedeiro (35-37 °C) apresenta morfologia de leveduras em forma de charuto. Este termodimorfismo pode contribuir para a patogenicidade de espécies de *Sporothrix* em mamíferos (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006 ; ROSSOW *et al.*, 2020). A capacidade de produzir melanina também contribui para a virulência, já que ela parece estar relacionada com escape fúngico das defesas do hospedeiro e resistência a antifúngicos (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

Em culturas, a temperatura ambiente a sua macromorfologia é de filamentos aparentes, colônias úmidas de superfície membranosa inicialmente de coloração branca e depois tornam-se marrom-escuras. Já na micromorfologia, é possível observar hifas septadas com conídios ovais, com forma que lembra a uma flor. Em temperaturas de 35 a 37 °C em Infusão cérebro coração (*Blood Heart Infusion, BHI*), ágar sangue ou ágar sangue-chocolate as colônias são lisas, brancas ou esbranquiçadas e microscopicamente as células de levedura estão alongadas e em forma de charuto de 2 a 6 µm de comprimento (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; ROSSOW *et al.*, 2020).

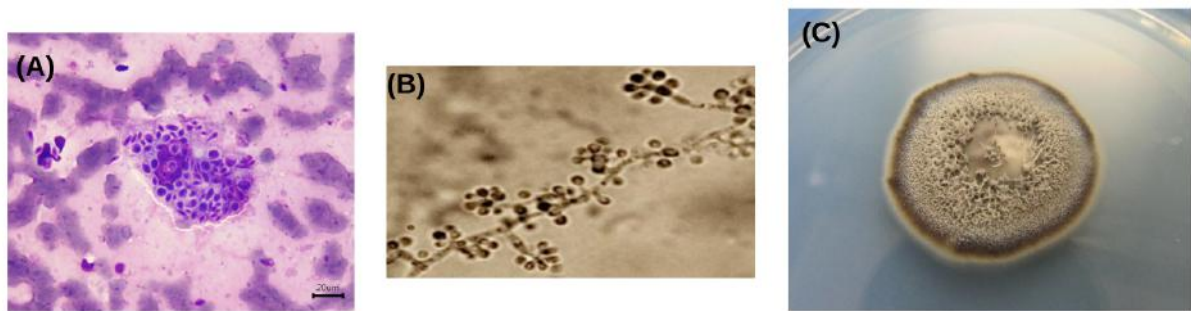


Figura 3. Características morfológicas de *S. schenckii*. (A) células em forma de charuto ou ovais parecidas com leveduras dentro de macrófagos (B) forma filamentosa (C) Macromorfologia das colônias de *S. brasiliensis*. Adaptada de: FERREIRA, 2018. e GREMIÃO *et al.*, 2021.

O clado de relevância clínica deste complexo é formado pelo *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei*, sendo o *S. brasiliensis* o mais virulento, possivelmente por ter menos antígenos de glicoproteína 70 kDa (gp70), uma parede celular mais espessa com maior quantidade de ramnose e quitina e microfibrilas de parede celular mais longas que podem conectar as células de leveduras para formar biofilmes (ROSSOW *et al.*, 2020).

Para o diagnóstico da esporotricose, exames comuns como cultura de fungos, exame direto, métodos imunodiagnósticos e técnicas de identificação molecular como o PCR e sequenciamento genéticos podem ser realizados. Porém, o padrão ouro para diagnóstico é a realização de cultura (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017 e ROSSOW *et al.*, 2020).

1.2 Mecanismo de ação dos antifúngicos disponíveis atualmente

Os fármacos antifúngicos de acordo com suas propriedades farmacodinâmicas são classificados como fungistáticos, aqueles que inibem o crescimento dos fungos, e/ou fungicidas responsáveis por causar danos aos fungos resultando em sua "morte". A farmacoterapia disponível atualmente para as infecções fúngicas conta com cinco classes: os azóis, equinocandinas, polienos, análogos de pirimidinas e alaninas. Estes podem ser administrados por via oral, tópica ou intravenosa (BELLMAN e SMUSZKIEWICZ, 2017; CAMPOY e ADRIO, 2017). Assim como seus hospedeiros humanos, os fungos são eucariontes o que dificulta o desenvolvimento de novos antifúngicos. Já que potenciais alvos destes microrganismos apresentam semelhanças com biomacromoléculas dos humanos (ROBBINS *et al.*, 2016). Os principais alvos dos fármacos antifúngicos são a parede

celular, síntese do RNA e DNA, formação de microtúbulos e biossíntese de esteróis (ODDS *et al.*, 2003).

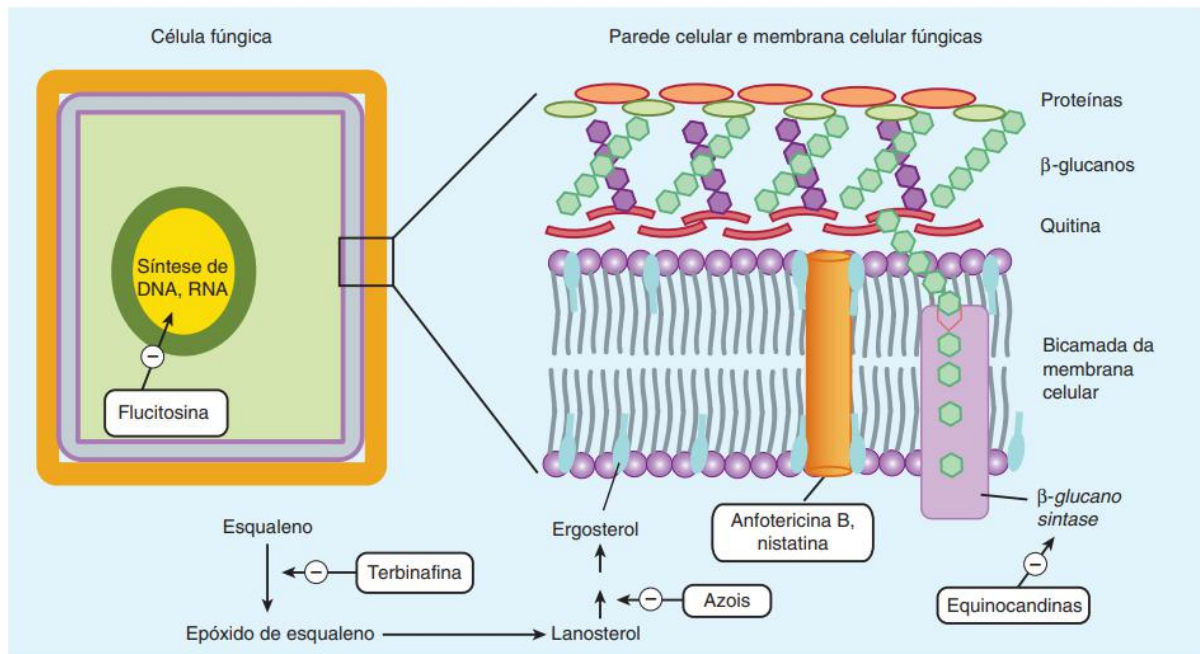


Figura 4. Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos e seus principais alvos. Obtida de: Katzung *et al.*, 2017.

1.2.1 Azóis

Os azóis são a maior classe de antifúngicos disponíveis e os mais empregados na prática clínica. Por causa do seu bom perfil de segurança, amplo espectro e disponibilidade em formulações orais e intravenosas têm grande uso clínico na prevenção e tratamento de infecções fúngicas. Possuem atividade fungistática com exceção do voriconazol, que é um fungicida, ao prejudicarem a síntese do ergosterol e assim afetarem a integridade da membrana citoplasmática fúngica (ODDS *et al.*, 2003; ROBBINS *et al.*, 2016; CAMPOY e ADRIO, 2017).

A enzima Lanosterol 14 α -desmetilase (CYP51) é uma monooxigenase do citocromo P450 e apresenta uma região protoporfirina em seu sítio ativo. Ela atua na via biossintética do ergosterol catalisando a remoção oxidativa do grupo 14 α -metil do lanosterol e/ou eburicol em fungos. Os azóis ligam-se ao átomo de ferro da região protoporfirina do sítio ativo da CYP51 através de um átomo de nitrogênio, bloqueando a desmetilação do lanosterol (ODDS *et al.*, 2003; ROBBINS *et al.*, 2016). Este esterol é o principal componente da membrana celular de fungos e

confere fluidez, assimetria e integridade a ela também e estimula o crescimento fúngico. A inibição de sua via induz estresse severo à membrana com consequência a enzimas ligadas à ela, como a envolvidas na síntese da parede celular, resultando na inibição do crescimento e replicação fúngica (ODDS *et al.*, 2003; KATHIRAVAN *et al.*, 2012) A conformação do sítio ativo da lanosterol 14 α -desmetilase é diferente entre as espécies de fungos e entre as monooxigenases P450 de mamíferos. Porém apesar disso, os azóis também inibem outras isoenzimas do citocromo P450, levando a inúmeras interações medicamentosas (BELLMAN e SMUSZKIEWICZ, 2017; CAMPOY e ADRIO, 2017).

Esses fármacos são moléculas orgânicas com anel heterocíclico de cinco membros contendo nitrogênio. Caso este anel tenha dois átomos de nitrogênio serão classificados como imidazóis. Já se o anel apresentar três átomos de nitrogênio, o grupo triazol, os antifúngicos são chamados de triazóis (ROBBINS *et al.*, 2016; BELLMAN e SMUSZKIEWICZ, 2017). Os primeiros azóis desenvolvidos foram os imidazóis como clotrimazol (Figura 5a), miconazol (Figura 5b) em 1969, o cetoconazol (Figura 5c) e diversos análogos foram sendo inseridos no mercado posteriormente (SHAFIEI *et al.*, 2020). Em geral este grupo é de uso tópico e apenas o cetoconazol é aplicado sistemicamente por causa da alta toxicidade e problemas de biodisponibilidade (ROBBINS *et al.*, 2016; BELLMAN e SMUSZKIEWICZ, 2017). Para o refinamento dos azóis, foram feitas mudanças em suas estruturas, sendo a mais importante, a substituição da porção imidazol pelo anel triazol. Como resultado ocorreu um aumento da especificidade para as enzimas CYPs de fungos, maior biodisponibilidade, maior solubilidade em água para ser usado como indicações intravenosas, alta penetração no SNC, ampliação do espectro de ação e redução dos efeitos adversos (SHAFIEI *et al.*, 2020). O fluconazol e o itraconazol, pertencem à primeira classe de triazóis e, apesar do amplo espectro, não apresentam atividade contra os patógenos emergentes *Scedosporium*, *Fusarium* e *Mucorales*. Além disso, são fungistáticos, o que pode contribuir para a resistência a esta classe. Os triazóis de segunda geração como posaconazol, voriconazol e isavuconazol são fungicidas e apresentam maior espectro de ação que inclui mais patógenos como o *Fusarium*, *Scedosporium*, *Zygomycetes* e *Cryptococcus neoformans* (CAMPOY e ADRIO, 2017; ROBBINS *et al.*, 2016).

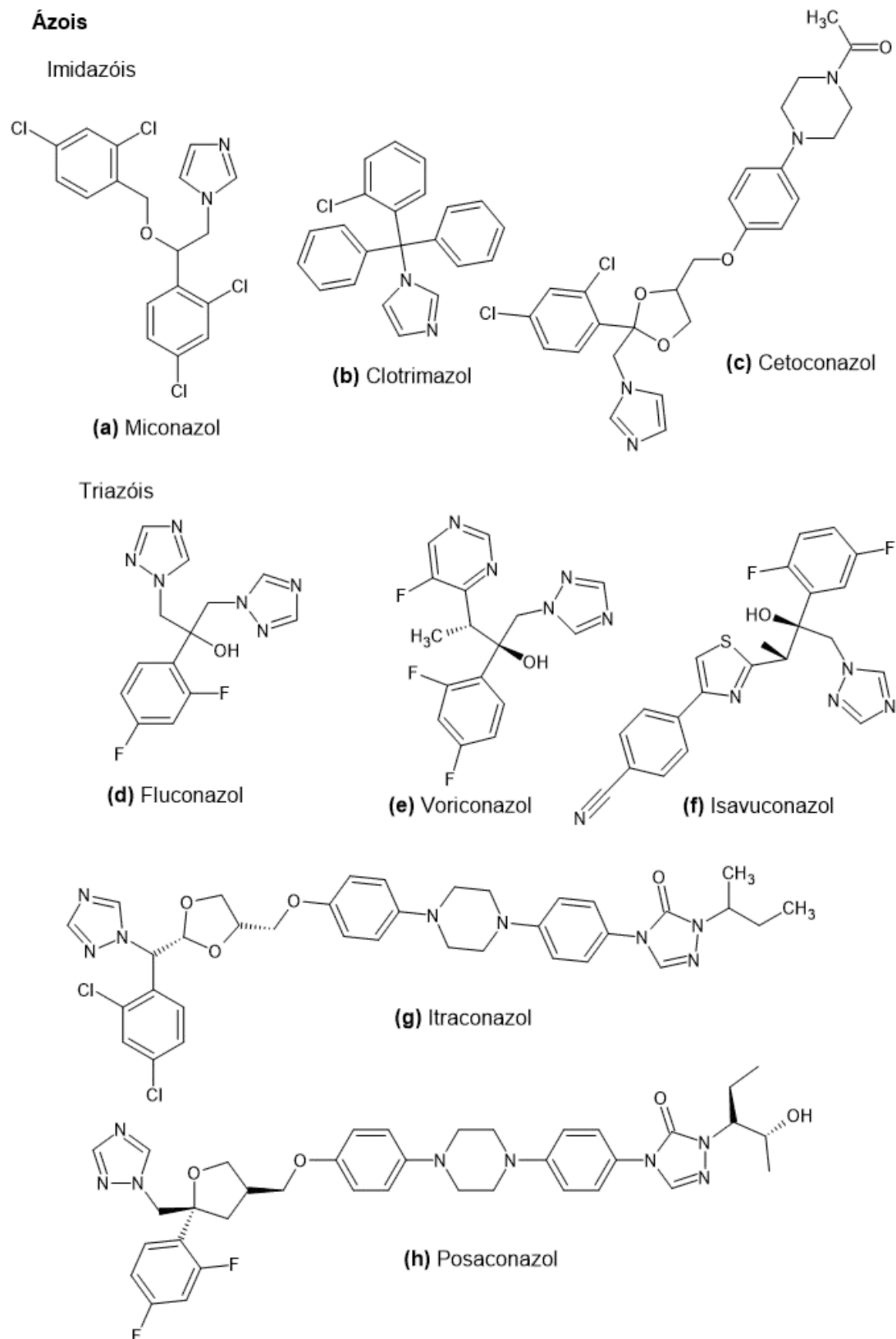


Figura 5. Estrutura Química dos antifúngicos azóis divididos em imidazóis: (a) Miconazol, (b) Clotrimazol, (c) Cetoconazol e em triazóis: (d) Fluconazol, (e) Voriconazol, (f) Isavuconazol, (g) Itraconazol, (h) Posaconazol

1.2.2 Polienos

Estes fármacos têm atividade fungicida, possuem o maior espectro de ação dos antifúngicos e são usados desde a década de 1950 para tratamento de infecções fúngicas invasivas. Atualmente apenas três polienos estão disponíveis para uso clínico a nistatina, natamicina e anfotericina B, produtos naturais isolados dos caldos de cultivo dos actinomicetos *Streptomyces noursei*, *S. natalensis* e *S. nodosum*, respectivamente (ROBBINS *et al.*, 2016 e CAMPOY e ADRIO, 2017).

Os polienos são macrolídeos, moléculas macrocíclicas com um anel lactona com mais de 12 átomos conjugado com um grupo d-micosimina e por apresentarem uma cadeia de hidrocarboneto hidrofóbica e uma cadeia de polihidroxila hidrofílica são anfipáticos. Devido a essa característica são capazes de interagir com o ergosterol, formando poros na membrana celular que alteram a permeabilidade da célula e levam ao extravasamento dos componentes celulares e, como consequência final, morte celular (ROBBINS *et al.*, 2016 e CAMPOY e ADRIO, 2017). Outro mecanismo de ação foi recentemente sugerido para a anfotericina B, como o de atuar como “esponjas de ergosterol” ligando-se ao ergosterol os retirando da membrana plasmática e formando agregados extra-membranosos, levando a desestabilização da membrana (ANDERSON *et al.*, 2014).

Os polienos têm uma afinidade menor pelo colesterol do que pelo ergosterol provavelmente devido a diferença estrutural dessas biomoléculas. Essa pequena afinidade pelo colesterol explica a alta toxicidade e efeitos adversos desses antifúngicos (ODDS *et al.*, 2003).

A nistatina (Figura 6a) têm atividade contra os fungos do gênero *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Fusarium* e são agentes apenas de uso tópico devido à sua baixa absorção no trato gastrointestinal e alta toxicidade. A nistatina empregada no tratamento de candidíase cutânea, vaginal e esofágica e a natamicina no tratamento de ceratose fúngica ou infecções da córnea (KATHIRAVAN *et al.*, 2012 e CAMPOY e ADRIO, 2017)

A anfotericina B (Figura 6a) foi o primeiro agente antifúngico desenvolvido e aprovado para o tratamento de um amplo espectro de infecções fúngicas invasivas, como a aspergilose e a candidíase, e é o antifúngico com o maior espectro de ação (LEE e GUN LEE, 2018). Possui baixa solubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos, devido sua hidrofobicidade, má absorção no trato

gastrointestinal e é administrada por via intravenosa (BELLMAN e SMUSZKIEWICZ, 2017 e CAMPOY e ADRIO, 2017).

A forma convencional de anfotericina B é uma formulação de desoxicolato formando micelas em solução aquosa, porém também apresenta formulações lipossomais que reduzem seus efeitos adversos e toxicidade no hospedeiro (BELLMAN e SMUSZKIEWICZ, 2017).

A anfotericina B tem ação sobre as células de mamíferos além das células fúngicas, resultando em inúmeros efeitos adversos e por isso tem seu uso limitado. Os eventos adversos relacionados à infusão (IRAE) são calafrios, febre, hipotensão ou hipertensão, hipóxia, náusea, vômito e hipocalcemia, podendo resultar em fibrilação ventricular e ocorrem em cerca de 50% dos pacientes em tratamento com anfotericina B desoxicolato convencional. A nefrotoxicidade é um efeito adverso comum observado em até 80% dos pacientes em uso de anfotericina B desoxicolato. Apesar dessas desvantagens, a anfotericina B ainda é utilizada para o tratamento das infecções fúngicas mais graves, em grande parte devido ao seu amplo espectro de atividade (ROBBINS *et al.*, 2016 e BELLMAN e SMUSZKIEWICZ, 2017).

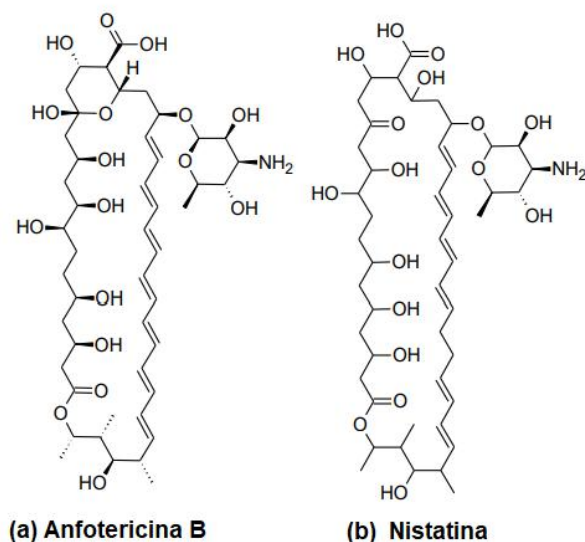


Figura 6. Estrutura química do antifúngicos (a) Anfotericina B e (b) Nistatina.

1.2.3 Equinocandinas

As equinocandinas são produtos semissintéticos anfífilos derivados metabólitos secundários de fungos como o *Zalerion arboricola* ou *Aspergillus nidulans var. echinulatus*, possuem um núcleo hexapeptídeo cíclico com uma longa

cadeia lateral lipídica responsável pela atividade antifúngica que determina o espectro de espécies suscetíveis (KATHIRAVAN *et al.*, 2012 e CAMPOY e ADRIO, 2017). Foram inseridos no mercado no início dos anos 2000, assim são a mais e única nova classe de antifúngicos a chegar à clínica em décadas. Atualmente três fármacos desta classe estão disponíveis para uso clínico: caspofungina (Figura 7a), micafungina (Figura 7b) e anidulafungina (ROBBINS *et al.*, 2016 e PERFECT, 2017). Estes fármacos são de baixa absorção enteral, estando disponíveis apenas para infusão intravenosa (BELLMAN e SMUSZKIEWICZ, 2017).

Contra *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* apresentam efeito fungicida, para *Aspergillus* fungistático, sendo ineficazes no combate a *Cryptococcus neoformans*, espécies de *Fusarium* e *Zygomycetes* (BELLMAN e SMUSZKIEWICZ, 2017).

Esta classe tem ação sobre a parede celular fúngica ao atuar como inibidor não competitivo da (1,3)- β -D-glucano sintase, enzima envolvida na síntese do (1,3)- β -D-Glucano, polissacarídeo que constitui mais de 50% da parede celular e fornece integridade estrutural, causando ruptura da estrutura da parede celular em crescimento, acarretando em instabilidade osmótica e morte celular (ONISHI *et al.*, 2000; ODDS *et al.*, 2003; CAMPOY e ADRIO, 2017).

A (1,3)- β -D-glucano sintase não é conservada em mamíferos o que provavelmente explica a pouca toxicidade, interações medicamentosas reduzidas e perfil de segurança impressionante desses compostos (KATHIRAVAN *et al.*, 2012 e PERFECT, 2017).

Cefaleia, náusea, diarreia, flebite e prurido são alguns dos efeitos adversos desta classe (BELLMAN e SMUSZKIEWICZ, 2017).

Nos últimos anos, com o uso generalizado de equinocandinas em hospitais para tratamento de candidemia nosocomial e a candidíase invasiva, tem se observado um aumento na identificação de leveduras que se tornaram resistentes às equinocandinas, através do desenvolvimento de mutações em FKS1, gene que codifica a (1,3)- β -D-glucano sintase. Isto foi mais observado para *Candida glabrata* (PERFECT, 2017).

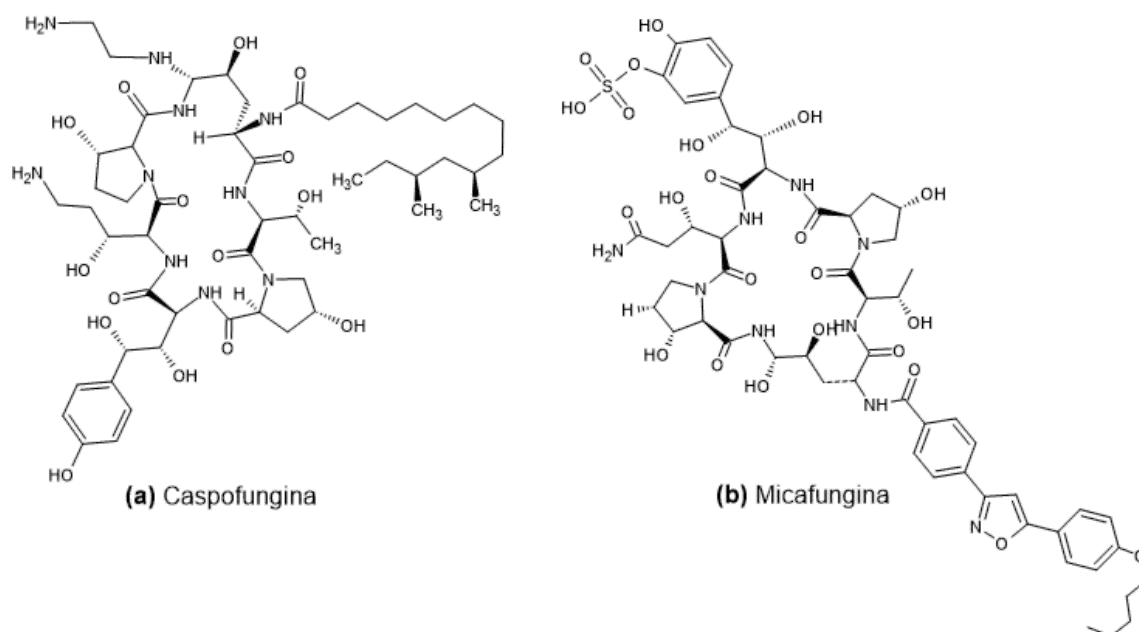


Figura 7. Estrutura Química dos antifúngicos (a) Caspofungina e (b) Micafungina da classe equinocandinas.

1.2.4 Análogos de Pirimidinas

A flucitosina (Figura 8) é um análogo fluorado sintético da citosina que foi desenvolvida para ser um agente antitumoral, mas desde a década de 1960 é empregada como um antifúngico. Porém, rapidamente observou-se a resistência contra esta molécula o que impede o uso de flucitosina como monoterapia (LEE e GUN LEE, 2018).

Este fármaco atua inibindo a síntese de ácidos nucleicos. Após alcançar o ambiente intracelular através da captação facilitada pela enzima citosina desaminase, a flucitosina sofre desaminação pela citosina desaminase, sendo convertida rapidamente no antimetabólito 5-fluorouracil (5-FU). O 5-FU em seguida é convertido em monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina (FdUMP), um potente inibidor da timidilato sintetase, e em trifosfato de fluorouridina (FUTP) que é incorporado no RNA fúngico no lugar do ácido uridílico. Assim, compromete e inibe a síntese de DNA, de RNA e de proteínas (BENNETT, 1977; LOYSE *et al.*, 2013 ; KATHIRAVAN *et al.*, 2012).

A flucitosina tem ação contra *C. neoformans*, algumas espécies de *Candida* e fungos dematiáceos causadores de cromoblastomicose (BENNETT, 1977; LOYSE *et al.*, 2013). A resistência secundária impede o uso de flucitosina como agente único, sendo usada na terapia combinada com anfotericina B contra o *C. neoformans*

(LOYSE *et al.*, 2013; KATHIRAVAN *et al.*, 2012). Alguns dos seus efeitos adversos mais comuns são anemia, leucopenia e trombocitopenia devido à toxicidade para a medula óssea. A alterações nas enzimas hepáticas e uma forma de enterocolite tóxica são menos frequentes (BENNETT, 1977).

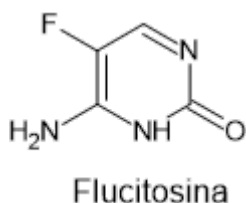


Figura 8. Estrutura Química do antifúngicos flucitosina.

1.2.5 Alilaminas

Os fármacos dessa classe são utilizados apenas para o tratamento de infecções dermatofíticas superficiais (LEE e GUN LEE, 2018). As alilaminas também interferem na síntese do ergosterol ao inibirem de forma reversível e não competitiva a esqualeno epoxidase, ocasionando o acúmulo de esqualeno que pode aumentar a permeabilidade e por consequência a interrupção da organização celular (CAMPOY e ADRIO, 2017). A terbinafina (Figura 9a) pode ser de uso sistêmico ou tópico no tratamento de infecções fúngicas da pele, unhas e cabelos. A naftifina (Figura 9b) também é usada no tratamento de micoses. Os efeitos adversos do tratamento com os medicamentos dessa classe são raros e incluem coceira, ardor e vermelhidão no local da aplicação (BONDARYK *et al.*, 2013).

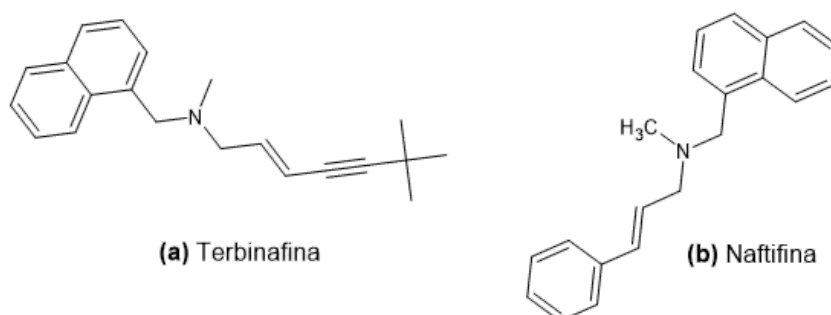


Figura 9. Estrutura química do antifúngicos (a) Terbinafina e (b) Naftifina.

Os casos de resistência com azóis e equinocandinas, os efeitos altamente tóxicos dos polienos e equinocandinas e a possibilidade do surgimento de resistência são algumas das desvantagens do tratamento farmacológico. O desenvolvimento de novos antifúngicos é necessário, mas apresenta dificuldade já

que os fungos apresentam muitas semelhanças com suas células hospedeiras (FERNANDES *et al.*, 2021).

1.3 Tratamento da esporotricose

O tratamento de escolha para esporotricose felina e para a humana em pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos com lesões limitadas ou na forma sistêmica é o itraconazol (Figura 5g). O tratamento farmacológico de gatos deve ser de acordo com a avaliação clínica do animal e gravidade do caso, recomenda-se o itraconazol em monoterapia nas doses de 25mg/kg a cada 24 h em animais que pesem até 1 kg, 50 mg/dias em animais com até 3 kg e 100 mg/dia para aqueles que tenham peso superior a 3 kg. Em casos que a resposta clínica ao tratamento é baixa pode-se associar cápsulas de iodeto de potássio (cápsula) nas doses de 2,5 a 5 mg/kg/dia. Em quadros clínicos graves ou em não resposta terapêutica insatisfatória casos a eutanásia pode ser indicada (GREMIÃO *et al.*, 2021).

Na esporotricose humana o tratamento tanto das manifestações cutâneas como da forma disseminada é com itraconazol, e se inicia com 100 mg/dia e dependendo da gravidade pode alcançar a dose de 400 mg/dia. Pode ser administrado de forma contínua ou intermitente (pulso). O iodeto de potássio pode ser usado em pacientes com a imunidade preservada nas manifestações cutânea ou linfocutânea da esporotricose em doses de até 4-6 g/dia. no regime terapêutico para humanos de 100 a 400 mg/dia e de 25 mg/kg/dia a 100 mg/dia em gatos de acordo com a gravidade (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2020). O mecanismo de ação do iodeto de potássio ainda não é completamente compreendido, porém sua eficácia na melhora da cicatrização e controle da carga fúngica é evidente (RODRIGUES *et al.*, 2020; GREMIÃO *et al.*, 2021).

O itraconazol é hepatotóxico, teratogênico e embriotóxico e assim não pode ser usado em pacientes com hepatopatias ou em gestantes. Além disso, é metabolizado pela CYP3A4, assim sendo passível de interações medicamentosas (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2020). Nos casos de disseminação, como na esporotricose pulmonar grave e no sistema nervoso central (SNC) recomenda-se anfotericina B preferencialmente a lipossomal até melhora e então deve ser substituída pelo itraconazol. Em casos que o itraconazol for contraindicado pode-se fazer uso da terbinafina para as formas cutâneas e

linfocutâneas e iodeto de potássio também é uma opção, como em situações que o acesso ao itraconazol e terbinafina não estão disponíveis (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; ROSSOW *et al.*, 2020).

Algumas das desvantagens do regime terapêutico disponível atualmente é que ele pode ser longo e caro, nas situações de esporotricose felina, há o alto risco de transmissão gato-cuidador, o que pode desestimular e resultar no abandono do tratamento do animal, comprometendo a prevenção e o controle da doença. Também observa-se falha terapêutica do tratamento humano e felino com medicamentos convencionais (RODRIGUES *et al.*, 2020; GREMIÃO *et al.*, 2021). Além disso, tem sido cada vez mais relatada na literatura resistência em isolados clínicos de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* ao tratamento com antifúngicos (RODRIGUES *et al.*, 2014; MARIO *et al.*, 2016; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2016).

Essas desvantagens evidenciam a necessidade de introduzir terapias alternativas para aumentar as possibilidades de tratamento.

1.4 Biossíntese do ergosterol

Os eucariotos possuem esteróis em suas membranas plasmáticas, que são essenciais para a integridade e função destas estruturas ao lhes conferir fluidez e permeabilidade. Além disso, os esteróis contribuem para a formação de microdomínios, funcionalidade da proteína e atividades de membrana (LEMETAIS *et al.*, 2012 e SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015). O colesterol (Figura 10a) é o esterol predominante em vertebrados, enquanto que fitoesteróis como sitosterol, estigmasterol, campesterol em plantas e o ergosterol (Figura 10b) em fungos. Cada um desses é obtido através de diferentes e longas vias biossintéticas que possuem em comum como etapa inicial a via de acetil-CoA para epóxido de esqualeno (LEMETAIS *et al.*, 2015). Como o ergosterol não está presente nas células dos mamíferos, tanto este esterol quanto sua via de biossíntese são alvos bem-sucedidos de fármacos antifúngicos.

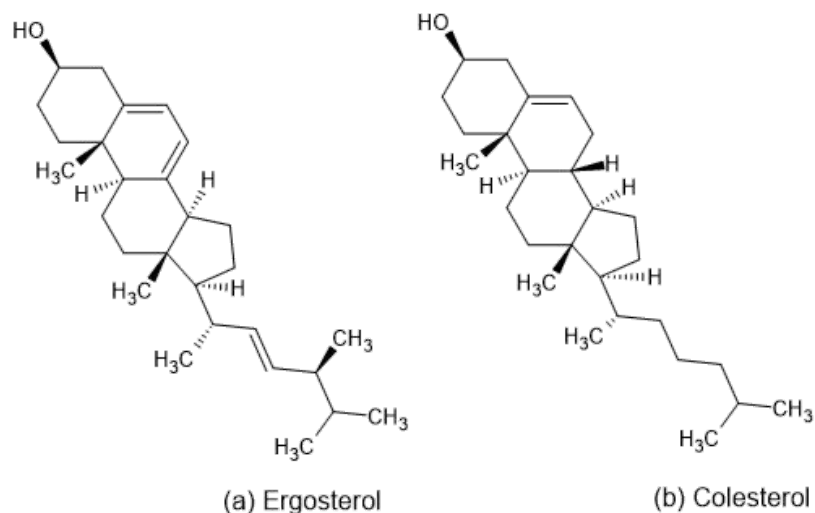


Figura 10. Estrutura Química do ergosterol e colesterol

A biossíntese de esteróis ocorre no retículo endoplasmático em uma cascata de reações enzimáticas acopladas, envolvendo 25 enzimas na síntese do ergosterol (BHATTACHARYA *et al.*, 2018).

A biossíntese do ergosterol (FIGURA 11) inicia pela via do mevalonato, onipresente em eucariotos, archaea e algumas bactérias, onde é sintetizado o farnesil pirofosfato (FPP) a partir do acetil-coenzima A (acetil-CoA) por meio de uma série de reações enzimáticas. As enzimas HMG-CoA redutases (HMGR) Hmg1 e Hmg2, limitantes da taxa de biossíntese, convertem o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) em ácido mevalônico. A partir do mevalonato e após uma sucessão de reações catalisadas por enzimas, o FPP é formado e em seguida é convertido pela esqualeno sintase (Erg9) em esqualeno, precursor de todos os esteróides. Após mais algumas reações há a formação do lanosterol pela ação da lanosterol sintase (Erg7) e finalmente ocorre a síntese do ergosterol pelas enzimas Erg3, Erg5 e Erg4 (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; BHATTACHARYA *et al.*, 2018 e LIU *et al.*, 2019).

O ergosterol é transportado através de organelas ou secretado no meio de maneira dependente de ATP, evitando seu excesso (JACQUIER E SCHNEITER, 2012).

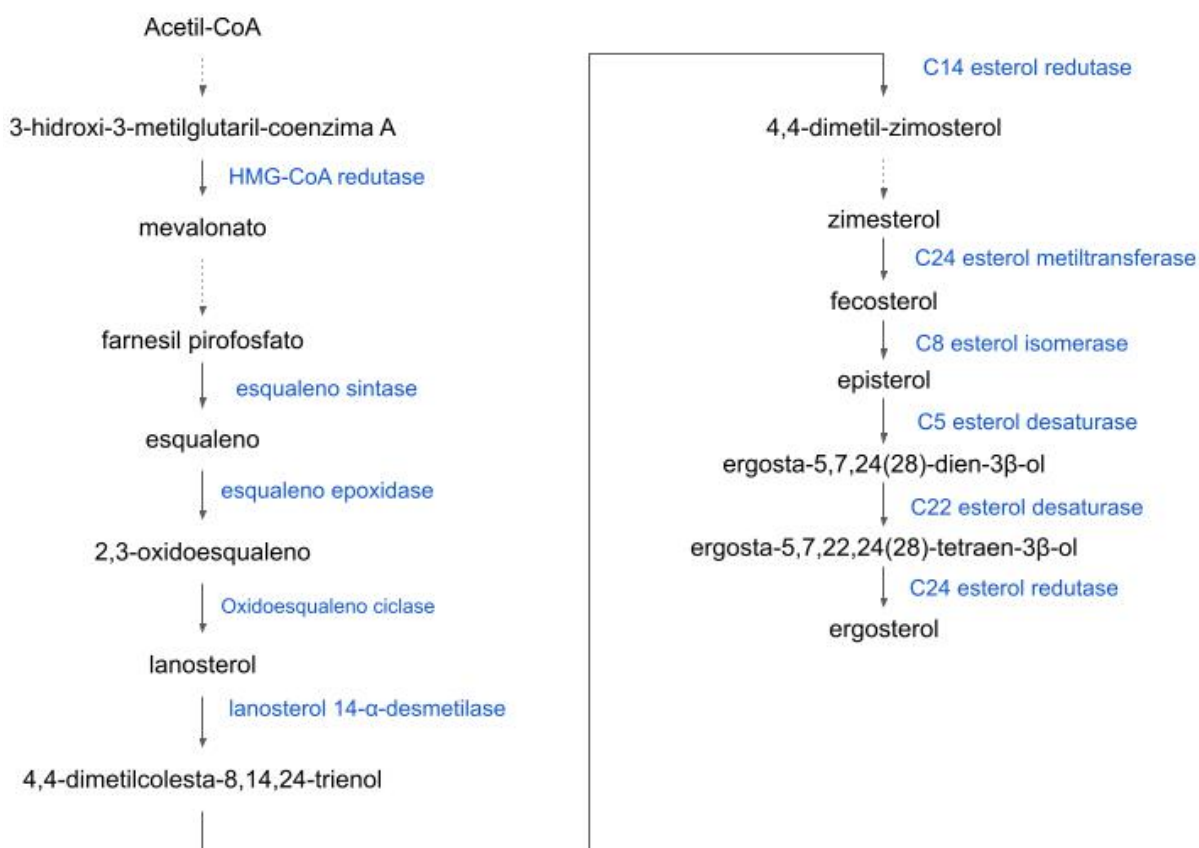


Figura 11. Via biossintética do ergosterol em fungos. As setas com linhas tracejadas indicam mais de uma etapa de reações enzimáticas e em azul são as enzimas que catalisam as respectivas reações. Adaptado de: BHATTACHARYA *et al.*, 2018.

1.4.1 Enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR) como alvo terapêutico antifúngico.

A enzima HMG-CoA redutase é responsável por catalisar a conversão de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) a mevalonato por reação de oxirredução em que ocorre transferência de hidreto fornecidos por duas moléculas de NADPH (Figura 12). Esta etapa é limitante da velocidade na síntese de colesterol em mamíferos, ergosterol em fungos e outros isoprenóides (ANDRADE-PAVÓN *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2019).

Pelo sequenciamento de genoma, genes *hmgr* foram observados em organismos de todos os três domínios da vida e análises filogenéticas revelaram dois tipos de HMGR: a classe I é referente a organismos eucarióticos e alguns archaea e a classe II são de procariontos e alguns archaea. Sabe-se que as HMGRs de diferentes organismos são multímeros de monômeros idênticos (FRIESEN e

RODWELL, 2004). A HMGR localiza-se no retículo endoplasmático em eucariotos, enquanto que nos procariotos encontram-se no citoplasma (HAINES *et al.*, 2013)

Nos humanos esta proteína possui três domínios principais catalítico, ligante e âncora, e está na forma um tetrâmero fortemente associado, em que a interação de dois monômeros formam o sítio catalítico. Neste local há uma região catalítica importante, denominada alça-cis (aminoácidos ligados de forma cis), envolvendo os resíduos característicos apenas nos eucariotes (FRIESEN e RODWELL, 2004; CAMPO e CARVALHO, 2007). Segundo ANDRADE-PAVÓN *et al.*, através da análise do quadro de leitura aberta (ORF) dos fungos estudados podem ser observados os mesmos três domínios (catalítico, ligante e âncora) nas HMGR fúngicas com algumas diferenças na topologia das proteínas (ANDRADE-PAVÓN *et al.*, 2014).

O domínio catalítico é altamente conservado em eucariotos, já o domínio âncora de membrana que consiste de duas a oito hélices transmembranas é mal conservado. Na archaea e algumas eubactérias os domínios também são bem conservados, porém carecem de um domínio âncora de membrana (FRIESEN e RODWELL, 2004; HAINES *et al.*, 2013).

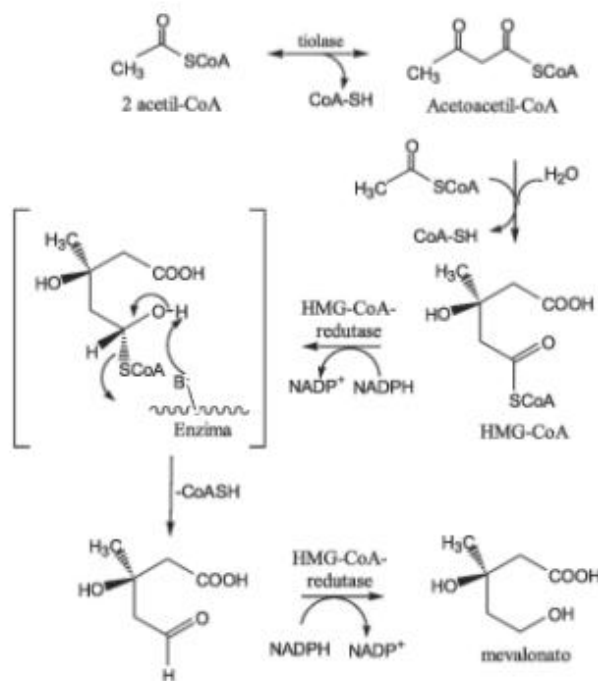


Figura 12. Representação e equação geral da reação catalisada pela HMGR. Adaptado de: FRIESEN e RODWELL, 2004 e ANDRADE-PAVÓN *et al.*, 2014

1.4.2 Estatinas como inibidores da HMGR

As estatinas são os principais fármacos usados no tratamento de hiperlipidemias, diminuindo os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol. Elas impedem a biossíntese do colesterol ao reduzirem a conversão do HMG-CoA em mevalonato através da inibição da HMGR. Assim, o uso destes fármacos resultam na redução da produção de colesterol pela inibição da via do mevalonato, o que afeta também outras vias como a dos isoprenóides (SIRTORI, 2014). Alguns benefícios esperados do tratamento de dislipidemias com as estatinas são prevenção de eventos cardiovasculares maiores, acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio, morte e revascularização (BRASIL, 2022). O uso dessa classe também já foi associado à diminuição da mortalidade por alguns tipos de câncer, diminuição da exacerbação de doença pulmonar obstrutiva crônica e artrite reumatoide (HE *et al.*, 2018).

Em 1973 a compactina, na época chamada ML-236B, foi isolada do caldo de cultura de *Penicillium citrinum* Pen-51 (ENDO, 2010). Posteriormente, a lovastatina (Figura 14) foi isolada de culturas de *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber* apresentando semelhança estrutural à mesvastina (Figura 14), porém com um grupo 6'-metílico adicional e potência superior, sendo aprovada para comercialização pelo FDA em 1987 (CAMPO e CARVALHO, 2007). A sinvastatina é um derivado semissintético e difere da lovastatina por um grupo metil adicional em 2' (Figura 14), resultando em um inibidor mais lipofílico e mais potente (SIRTORI, 1990).

Em 1996 a atorvastatina (Figura 14) e em 1997 cerivastatina (Figura 14) derivados sintéticos das estatinas entraram no mercado, porém no ano de 2001 a cerivastatina foi retirada do mercado devido à incidência de mais de 100 casos de rabdomiólise fatal, relacionados a dano severo da musculatura esquelética e em muitos casos junto de problemas renais. A maior parte destes casos ocorreram em tratamentos com doses excessivas de cerivastatina ou em doses normais com o uso concomitante de genfibrozila (CAMPO e CARVALHO, 2007).

A lovastatina (Figura 14) e sinvastatina (Figura 14) são pró-fármacos na forma de lactonas que após biotransformação correspondem aos hidroxiácidos (ácido 3,5-di-hidroxiálérico), região que mimetiza o grupo HMG do substrato, para inibição de HMG-CoA redutase. *In vivo*, a forma lactônica está em equilíbrio reversível com a forma hidroxiácida ativa. Pravastatina é de origem natural, o metabólito de

mevastatina, e assim como as estatinas sintéticas mostram anéis abertos na posição clássica da porção análoga do ácido mevalônico (CAMPO e CARVALHO, 2007; SIRTORI, 2014).

As estatinas compartilham grupos hidrofóbicos rígidos que estão ligados covalentemente à porção semelhante à HMG. A mevastatina, lovastatina, sinvastatina e pravastatina têm em suas estruturas o anel de decalina, com diferentes substituições para cada uma (ISTVAN, 2002). Já a Fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina e rosuvastatina apresentam grupos maiores ligados à porção semelhante à HMG com mudanças moleculares simples, como adição de um átomo de F na fluvastatina e complexas como as aberturas de anel mais complexas na atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina. Estas três mostram alterações moleculares, de hidroxila, grupos metil adicionais a padrões estereoquímicos complexos (ISTVAN, 2001; SIRTORI, 2014). Assim, tanto as moléculas naturais, quanto as sintéticas exibem grupos lipofílicos ligados a cadeia lateral comum com analogia estrutural ao substrato HMG-CoA e, também, com o produto ácido mevalônico. Essas cadeias laterais são representadas por unidade de ácido 3,5-di-hidroxisovalérico ou b,d-di-hidroxi-pentanóico (CAMPO e CARVALHO, 2007).

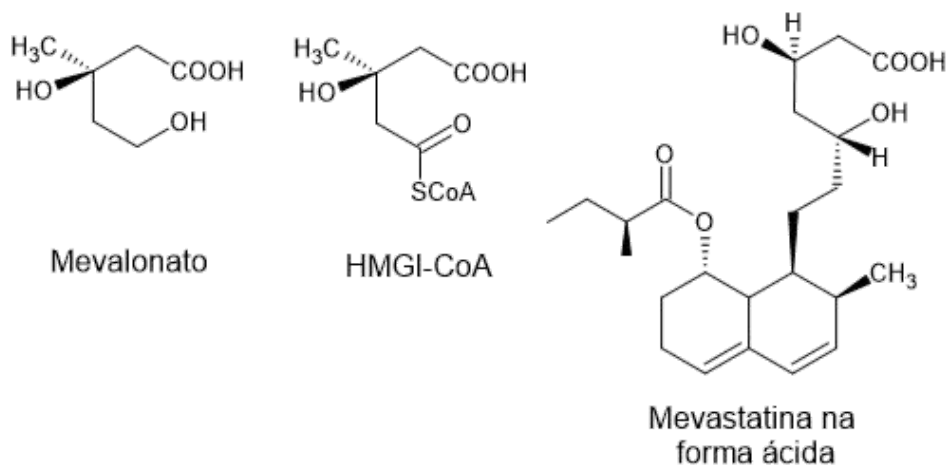
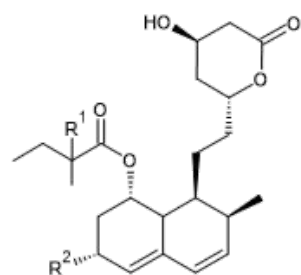


Figura 13. Estrutura Química do substrato HMG-CoA e produto mevalonato da HMGR e da estatina mevastatina na forma ácida aberta. **Adaptado de: SIRTORI, 2014.**

Além dos efeitos descritos acima, vários estudos *in vitro* demonstram atividade antifúngica desta classe contra diferentes leveduras e fungos filamentosos patogênicos, principalmente em *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (TAVAKKOLI *et al.*, 2020). Em estudo recente a sinvastatina e atorvastatina apresentaram atividade

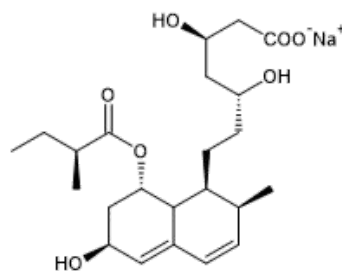
antifúngica contra células planctônicas do complexo *S. schenckii* nas formas filamentosa e leveduriforme, e contra biofilmes da forma filamentosa de espécies de *Sporothrix* (BRILHANTE *et al.*, 2020).



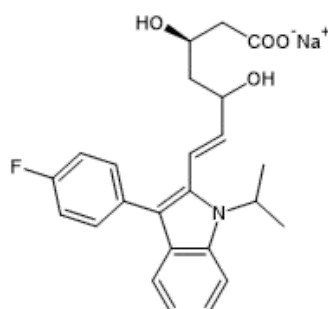
(1) Mevastatina $R^1=R^2=H$

(2) Lovastatina $R^1=H; R^2=CH_3$

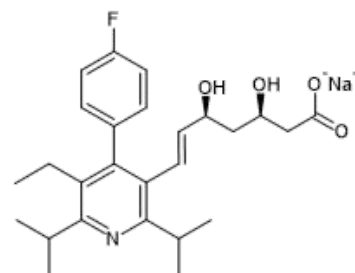
(3) Sinvastatina $R^1=R^2=CH_3$



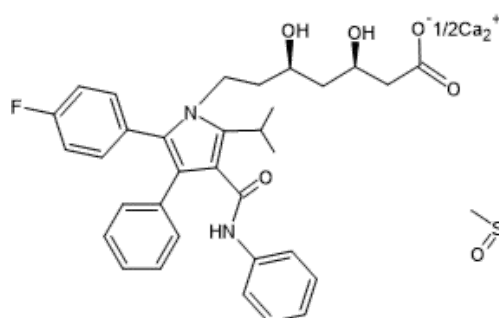
(4) Pravastatina



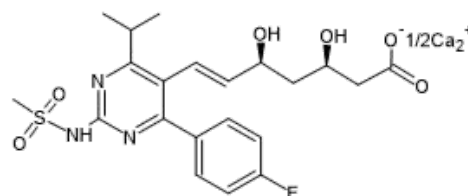
(5) Fluvastatina



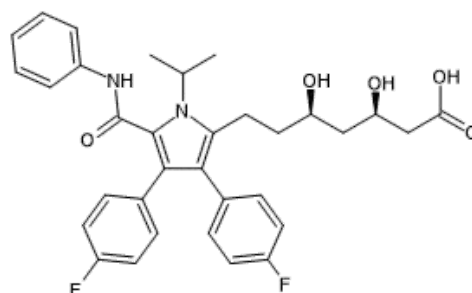
(6) Cerivastatina
(retirada do mercado em 2001)



(7) Atorvastatina



(8) Rosuvastatina



(9) ácido
(3r,5r)-7-[5-(Anilínicarbonil)-3,4-Bis(4-Fluorofenil)-1-Isopropil-1h-Pirrol-2-Yl]-3,5-Dihidroxiheptanóico

Figura 14. Estrutura Química das estatinas (1) Mevastatina, (2) Lovastatina, (3) Sinvastatina, (4) Pravastatina, (5) Fluvastatina, (6) Cerivastatina, (7) Atorvastatina e (8) Rosuvastatina (9) Inibidor sintético da HMGR baseado no pirrol presente no PDB: 2Q1L. Adaptado de: CAMPO e CARVALHO, 2007.

1.6 Produtos naturais como fonte para o desenvolvimento de novos fármacos.

Produtos naturais são fontes interessantes para desenvolvimento de fármacos. Atualmente muitos medicamentos disponíveis no mercado tem origem natural ou foram desenvolvidos com base nestes produtos, alguns exemplos são os anti-hipertensivos captopril e enalapril, os antitumorais paclitaxel, docetaxel e camptotecina, os antibióticos penicilina, eritromicina, claritromicina e o antifúngico anfotericina B (LI e VEREDAS, 2009).

Duas das três principais classes estruturais de agentes antifúngicos, os polienos e as equinocandinas, no mercado para infecções sistêmicas são produtos naturais ou seus derivados. Os polienos são macrolídeos bacterianos e equinocandinas são lipopeptídeos semi-sintéticos derivados de fungos (HEARD *et al.*, 2021).

Dentre os 1.562 medicamento aprovados pelo FDA no período de 1981 e 2014, 64 (4%) eram produtos naturais inalterados, 141 (9,1%) eram drogas vegetais, 320 (21%) eram derivados de produtos naturais (NEWMAN e CRAIGG, 2016).

Estas substâncias podem ser obtidas em plantas, organismos marinhos, insetos ou microrganismos como fungos e bactérias (BARRERO e BONSAI, 2009). A maioria das pequenas moléculas de origem natural pesquisadas como produtos bioativos são metabólitos secundários produzidos em situações particulares como stresse e desenvolvimento (CLARDY e WALSH, 2004).

Com abundante diversidade e complexidade estrutural, os produtos naturais possuem características especiais em relação às moléculas sintéticas convencionais. Quando comparados com estas moléculas, os produtos naturais costumam ter mais centros estereogênicos, massa molecular superior a 500 Da, maior quantidade átomos de carbono sp^3 e átomos de oxigênio, menos de átomos de nitrogênio, halogênios e maior rigidez molecular. Em suas estruturas observam-se mais de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio e coeficiente de partição octanol-água ($cLog P$), geralmente, mais baixos, indicando maior hidrofiliabilidade. Portanto, tendem a violar a "regra dos cinco" de *Lipinski* (CLARDY e WALSH, 2004; FEHER e SCHMIDT, 2003; ATANASOV *et al.*, 2021). Os produtos naturais contribuem significativamente para medicamentos orais que não atendem as regras do 5 de *Lipinsk* (DOAK *et al.*, 2014).

A indústria farmacêutica diminuiu a pesquisa sobre produtos naturais por motivos como a dificuldade em sintetizar suas complexas estruturas e o difícil reabastecimento ou acesso ao organismo de origem. Apesar disso, os produtos naturais são atraentes para a descoberta de fármacos por sua bioatividade, rica diversidade e complexidade estrutural e a não aplicação das regras dos cinco de Lipinski (BEUTLER, 2019).

O Banco de Dados dos Núcleos de Bioensaios, Ecofisiologia e Biossíntese de Produtos Naturais (NuBBE) é a primeira biblioteca de produtos naturais da biodiversidade brasileira e derivados semissintéticos e encontra-se gratuitamente na web. Estão disponíveis informações de moléculas, incluindo nome e classe química, código, fórmula molecular e massa e fonte. Informações biológicas, farmacológicas e toxicológicas também podem ser acessadas caso disponíveis. Nele é possível obter a estrutura química de moléculas por SMILES e as conformações 3D (VALLI *et al.*, 2013).

1.7 Modelagem Molecular no desenvolvimento de novos fármacos

As técnicas de modelagem molecular podem contribuir para descoberta e desenvolvimento de novos fármacos ao facilitar a identificação de *novos ligantes* e na otimização de *leads* para testes experimentais *in vitro* e *in vivo*, e reduzindo o tempo, custos e a possibilidade de falhas durante este processo (GLAAB, 2016 e KONTOYIANNI, 2017).

Algumas destas técnicas computacionais já auxiliaram o desenvolvimento de alguns fármacos disponíveis atualmente no mercado, como o raltegravir, alisquireno, tirofibana (SCHAMES *et al.*, 2004; TALELE *et al.*, 2010 e SLIWOSKI, 2013).

Dentre as várias ferramentas de modelagem molecular, as principais usadas na identificação de *leads* são o *docking* molecular, dinâmica molecular e análise das propriedades ADMET *in silico* (ADELUSI *et al.*, 2022).

1.7.1 *Docking* molecular e triagem virtual

O *docking* molecular é um método *in silico* que prevê a conformação e orientação, referidas como “pose”, preferencial de uma molécula no seu local de ligação na proteína, com a estrutura tridimensional conhecida para formar um

complexo estável. Para isto, as técnicas de *docking* avaliam os possíveis encaixes do ligante à proteína, combinando e otimizando variáveis hidrofóbicas, estéricas e complementaridade eletrostática e a energia livre de ligação de cada pose é estimada (KATSILA *et al.*, 2016; TORRES *et al.*, 2019; ADELUSI *et al.*, 2022). A orientação dos ligantes no sítio de ligação são geradas pelos algoritmos de busca e então ranqueadas pelas funções de pontuação, que prevêm a afinidade teórica do complexo ligante-proteína (GUEDES *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2019; ADELUSI *et al.*, 2022).

Para que essa técnica seja aplicada, é essencial que hajam as estruturas tridimensionais dos alvos moleculares que podem ser obtidas por cristalografia e difração de raios X, Ressonância magnética nuclear (RMN) ou criomicroscopia eletrônica ou ainda estruturas modeladas por métodos teóricos como modelagem corporativa. O *docking* molecular se aplica a três objetivos principais: predição de pose e estimativa de afinidade de ligação e triagem virtual (GUEDES *et al.*, 2013; DAR e MIR, ADELUSI *et al.*, 2022).

A triagem virtual pode ser usada na identificação e seleção candidatos promissores para a triagem experimental, estas estratégias podem ser divididas em dois grupos (SUAY-GARCÍA *et al.*, 2022): triagem virtual baseada na estrutura do alvo molecular e triagem virtual baseada em ligantes

A triagem virtual baseada na estrutura do alvo molecular (SBVS) abrange métodos que buscam ligantes considerando a estrutura tridimensional (3D) do alvo. A predição de moléculas com potencial farmacológico é feita a partir de uma base de dados de substâncias que sejam capazes de interagir com o sítio ativo do alvo molecular e classificá-los segundo sua afinidade. A técnica de SBVS mais utilizada é o *docking* molecular (RODRIGUES, *et al.*, 2012 e VÁZQUEZ *et al.*, 2020).

Na triagem virtual baseada em ligantes (LBVS), os dados estruturais e biológicos de um conjunto de compostos com atividade biológica são usados para que, a partir da semelhança estrutural e química com ligantes já conhecidos novas moléculas com potencial atividade biológica sejam identificadas (GLAAB, 2016). Através da sobreposição de moléculas ativas é possível mapear as principais interações que elas compartilham no espaço tridimensional. Essas informações podem ser obtidas nas representações 2D ou 3D das moléculas (RODRIGUES *et al.*, 2012; SUAY-GARCÍA *et al.*, 2022).

1.7.2 Modelagem comparativa para obtenção da estrutura 3D de alvos moleculares

A modelagem comparativa ou modelagem por homologia é um dos métodos computacionais usados para prever a estrutura terciária de uma proteína-alvo a partir de sua sequência de aminoácidos e com base em um molde com resíduos de aminoácidos semelhantes. Esse processo se baseia na observação de que a estrutura tridimensional da proteína é particularmente determinada por sua sequência de aminoácidos e que essa estrutura é mais conservada durante a evolução que a sequência, por isso sequências semelhantes podem se dobrar em estruturas semelhantes e até mesmo sequências com percentual de identidade abaixo de 50% ainda podem assumir estruturas semelhantes (MUHAMMED e AKI-TALCIN, 2018; ADELUSI *et al.*, 2022).

Esse método de previsão de estrutura consiste em 7 etapas clássicas: Identificação e Seleção de templates/molde; alinhamento das sequências e correção do alinhamento caso seja necessário; construção de modelos 3D; modelagem de alças; modelagem de cadeia lateral; otimização do modelo; e validação do modelo (MUHAMMED e AKI-TALCIN, 2018 e HAMEDUH *et al.*, 2020).

Essa ferramenta pode ser aplicada quando a estrutura tridimensional de uma proteína alvo não foi elucidada e não está disponível no banco de dados de proteínas (ADELUSI *et al.*, 2022), podendo contribuir no processo de descoberta de novos fármacos. Para isto, os modelos devem ter alta qualidade, sendo crucial similaridade de sequências, boa modelagem de cadeia lateral e modelagem de alças (MUHAMMED e AKI-TALCIN, 2018).

1.7.3 Propriedades ADMET *in silico*

Durante o processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos nas etapas de geração e otimização de *leads* é importante que as propriedades farmacocinéticas, como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), sejam avaliadas para rejeição de moléculas inapropriadas. Assim, as ferramentas de predição ADMET contribuem para a diminuição da taxa de insucesso das descobertas de fármacos, reduzindo falhas, custo e tempo despendidos nas

etapas posteriores ao facilitar a análise de várias características farmacocinéticas e toxicológicas (ADELUSI *et al.*, 2022).

O conceito de *druglikeness* considera propriedades físico-químicas, características estruturais, bioquímicas, farmacocinéticas e de toxicidade de moléculas, para através dessas informações filtrar e selecionar as que possuem propriedade ADMET suficientemente aceitáveis. Desse modo, a compreensão contribui para a identificação de possíveis candidatos com maior chance de sucesso farmacocinético e segurança geral para entrar e passar em ensaios clínicos (AGONI *et al.*, 2020).

Uma abordagem comum e simples para medir o *drug-likeness* são os filtros/regras que definem limites aceitáveis de certas propriedades físico-químicas moleculares para fármacos e/ou candidatos a fármacos. A primeira e mais famosa regra/filtro a ser proposta foi a Regra dos Cinco de Lipinski (Ro5) em 1997 (JIA *et al.*, 2020). Nela são definidos quatro parâmetros físico-químicos, no qual seus valores são múltiplos de cinco, são estes: peso molecular ≤ 500 Da, $cLog P \leq 5$, doadores de ligação de hidrogênio (DLH) ≤ 5 , aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) ≤ 10 . Estes descritores estão associados com a solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal aceitáveis, que são os primeiros passos para a biodisponibilidade oral (LIPINSKI *et al.*, 2012).

Há uma variedades de ferramentas disponíveis tanto de forma comercial, quanto de acesso aberto para uma previsão rápida e econômica de ADMET, como o *DEREK* (<https://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm>), *admetSAR* (YANG *et al.*, 2018) e *pkCSM* (PIRES *et al.*, 2015). O primeiro é de acesso comercial e os dois últimos estão disponíveis online e gratuitamente (KAR e LESZCZYNSKI, 2020).

2. JUSTIFICATIVA

A esporotricose é uma doença tropical negligenciada que acomete humanos e outros animais, sendo a micose subcutânea mais prevalente na América Latina (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; ROSSOW *et al.*, 2020). No Brasil apresenta caráter endêmico na região sul e sudeste e é o país com maior número de casos notificados de esporotricose felina no mundo (Gremião *et al.*, 2021). O tratamento farmacológico pode ser longo e caro e ainda há a possibilidade de gato-cuidador na esporotricose felina, também ocorrem recidivas ou não resposta ao tratamento antifúngico. Isso pode desestimular e resultar no abandono do tratamento do animal, comprometendo a prevenção e o controle da doença (RODRIGUES *et al.*, 2020; GREMIÃO *et al.*, 2021). Além disso, observa-se resistência a antifúngicos por fungos *Sporothrix* (RODRIGUES *et al.*, 2014; WALLER *et al.*, 2021).

Somente no estado do Rio de Janeiro entre os anos de 2019 e 2020 foram confirmados 2.616 casos em humanos (SES/RJ, 2021), já os casos de esporotricose felina não são conhecidos. A ausência de estratégias de controle e prevenção associada às dificuldades no tratamento de animais infectados agravam mais ainda esta situação. Assim, a busca por novos fármacos através de técnicas de modelagem molecular e testes *in vitro* podem contribuir significativamente para descoberta de novos candidatos para o tratamento da doença, podendo auxiliar no manejo e prevenção da esporotricose.

A HMG-CoA redutase tem papel fundamental na via do mevalonato ao catalizar a reação de redução do HMG-CoA em mevalonato, em humanos, a via do mevalonato é responsável pela etapa limitante da biossíntese de colesterol e nos microrganismos pela biossíntese do ergosterol e de isoprenóides (CAMPO E CARVALHO, 2007; PIVÓN *et al.*, 2017). Na literatura já foi descrito o potencial antifúngico da sinvastatina e atorvastatina, inibidores da HMGR, em fungos do gênero *Sporothrix* (BRILHANTE *et al.*, 2020).

Desta forma a enzima SsHMGR. pode ser um alvo terapêutico interessante de novos antifúngicos para o tratamento esporotricose e os estudos de estrutura-atividade das estatinas usando modelagem molecular pode contribuir a descoberta e desenvolvimentos desses inibidores.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Identificar produtos naturais brasileiros e derivados semissintéticos como potenciais inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA Redutase) de *S. schenckii* usando estratégias de modelagem molecular.

3.2 Objetivos Específicos

Identificar os grupos farmacofóricos e características essenciais para ligação dos inibidores de HMGR na enzima de *S. schenckii* e interações envolvidas.

Identificar potenciais produtos naturais e derivados semissintéticos candidatos a inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR) de *S. schenckii* usando a triagem virtual baseada em farmacóforo.

Identificar por meio da triagem baseada no receptor, os ligantes mais promissores que conservam as interações e modo de ligação em relação a inibidores conhecidos e ao modelo farmacofórico.

Selecionar as substâncias com perfil mais promissor para serem direcionados aos testes biológicos em cepas de *Sporothrix* spp para avaliação da atividade antifúngica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Construção dos modelos tridimensionais da HMGR de *S. schenckii* (SsHMGR) por modelagem comparativa

A HMGR de *S. schenckii* não teve sua estrutura tridimensional elucidada até o momento, desta forma foi construída através da modelagem comparativa. Para isto, buscou-se no Centro Nacional de Informação Biotecnológica (National Center of Biotechnology Information, NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pela sequência FASTA de aminoácidos da HMGR *S. schenckii* (GenBank: ERS96480.1). Em seguida, a sequência foi submetida ao BLAST no NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a fim de se buscar por moldes com maior percentual de identidade e cobertura, para fazer a construção do modelo por homologia. Em seguida, as sequências de aminoácidos da HMGR de *S. schenckii* (GenBank:), *S. brasiliensis* (GenBank:), *C. albicans* (AOW26055.1), *S. cerevisiae* (GHM88949.1) e *H. sapiens* (NP_001351116.1) foram alinhadas utilizando o programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (LI et al., 2015; MCWILLIAM et al., 2013; SIEVERS et al., 2011). Foi avaliado se os resíduos de aminoácidos se mantiveram conservados e alinhados entre as proteínas de diferentes organismos. A matriz do percentual de identidade também foi avaliada.

Em seguida no servidor Swiss-Model (ARNOLD *et al.*, 2006; GUEX *et al.*, 2009) foi realizada a construção do modelo o qual teve como molde a estrutura cristalográfica da HMGR de *Homo sapiens* (HsHMGR) em complexo com o inibidor ácido

(3r,5r)-7-[5-(Anilina-carbonil)-3,4-Bis(4-Fluorofenil)-1-Isopropil-1h-Pirrol-2-Yl]-3,5-Dihidroxiheptanóico, disponível no PDB sob o código 2Q1L, com resolução de 2,05 Å (PAVLOVSKY *et al.*, 2007).

Para refinamento do modelo, este foi submetido a ciclos de minimização de energia para otimização geométrica da proteína no programa *Swiss PDB Viewer* (SPDBV) (GUEX e PEITSCH, 1997; GUEX *et al.*, 2009). Também calculou-se o desvio médio quadrático (RMSD) através da sobreposição entre o molde e o modelo.

A fim de validar o modelo da SsHMGR avaliou-se a qualidade estereoquímica pela análise gráfico de Ramachandran obtido no *Procheck*

(LASKOWSKI *et al.*, 1993), e a compatibilidade entre a estrutura 1D e 3D pelo perfil do score 3D-1D no *Verify3D* (BOWIE *et al.*, 1991; LUTHY *et al.*, 1992), disponíveis no servidor *The Structure Analysis and Verification Server* (SAVES) (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>). Além disso, analisou-se a energia global pelo *score-Z* e energia local usando o servidor ProSA-web (SIPPL, 1993; WIEDERSTEIN e SIPPL, 2007) (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>). Essas análises foram feitas para o modelo de HMGR de *S. schenckii* construído em comparação com o molde.

Na caracterização estrutural da proteína, foi avaliada a composição química dos resíduos num raio de 5 Å no sítio de ligação do inibidor para o molde em comparação com o modelo.

4.2 Docking molecular de inibidores conhecidos na HMGR de *S. schenckii* (SsHMGR)

Para propor potenciais inibidores para a enzima de SsHMGR, obteve-se as estruturas da HMGR de *H. sapiens* obtidas experimentalmente e complexadas com inibidores da classe das estatinas disponíveis no banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*). Os cristais foram obtidos no PDB através dos códigos: 1HW8, 1HW9, 1HWI, 1HWJ, 1HWK, 1HWL e 2Q1L

A validação do *docking* foi feita pela técnica de *redocking* das estatinas na enzima de *H. sapiens* (THOMA *et al.*, 2004), que consistiu em remover o ligante co-cristalizado do complexo e, em seguida, recolocá-lo no sítio ativo da enzima através do *docking*. Então, comparando a conformação cristalográfica desse ligante com a obtida por *docking* é possível avaliar a capacidade preditiva da metodologia utilizada (MORRIS e LIM-WILBY, 2008).

A proteína foi preparada com a adição de hidrogênios polares e cargas *Gasteiger*. Já os ligantes retirados do cristal foram preparados com a adição dos hidrogênios e as ligações torcionáveis foram definidas automaticamente utilizando o programa *AutoDock Tools 1.5.7* (MORRIS *et al.*, 2009). A caixa para o cálculo do *docking* foi definida com dimensões 34 x 22 x 38 Å³, centralizada no resíduo Glu559 para os cristais de código PDB:1HW8, 1HW9, 1HWI, 1HWJ, 1HWK, 1HWL, complexados com mevastatina, sinvastatina, fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina, rosuvastatina, e GLU125 como resíduo em região central ao sítio ativo

da HsHMGR no caso do cristal 2Q1L (com posição equivalente em relação aos outros cristais, apenas a numeração diferente). Conforme o descrito na literatura, tanto as estatinas quanto o HMG-CoA interagem com este resíduo por meio de ligação de hidrogênio (CAMPO e CARVALHO, 2007; ISTVAN e DEISENHOFER, 2001). Os parâmetros do algoritmo de busca foram mantidos com os valores padrão. Foram observados o modo de ligação que estes inibidores assumiram no sítio ativo, e as interações que foram conservadas com os resíduos de aminoácidos para as diferentes estatinas nos programas *Discovery Studio Visualizer* (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>) *Pymol* v. 0.99 (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC).

Em seguida, foi feito o *docking* dessas estatinas no modelo SsHMGR construído, o qual foi centralizado no resíduo de Glu893 (posição equivalente em relação ao cristais). O cálculo do *docking* foi realizado com os mesmos parâmetros definidos no *redocking*. Foi feita a análise do modo de ligação que as estatinas assumiram no sítio ativo da SsHMGR para a pose de menor energia em comparação com a pose encontrada nas estruturas cristalográficas. Para isto, utilizou-se os programas *Discovery Studio Visualizer* (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>) *Pymol* v. 0.99 (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC), neste último também obteve-se as imagens usadas neste trabalho. O ligante que apresentou um modo de ligação no modelo de SsHMGR similar ao observado para os inibidores foi escolhido para a construção do farmacóforo.

4.3 Triagem virtual baseada em farmacóforo para busca de potenciais inibidores da SsHMGR

Com base no modo de ligação da atorvastatina na HMGR de *S. schenckii* obtido no *docking molecular*, um modelo farmacofórico foi definido no servidor *Pharmit* (<https://pharmit.csb.pitt.edu/>), tendo como base a orientação que ela apresentou no sítio ativo da SsHMGR e a análise das interações importantes que são conservadas entre as diferentes estatinas complexadas com HMGR de *H. sapiens*.

Com o modelo farmacofórico definido foi realizada a triagem virtual baseada em farmacóforos para obtenção de novos candidatos a inibidores através do

servidor *Pharmit* (SUNSERI e KOES, 2016) no banco de produtos naturais (PNs) brasileiros do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (VALLI *et al.*, 2013). Foram definidos três pontos farmacofóricos, sendo um aromático (raio de 1,5 Å) e dois aceptores de ligação de hidrogênio, com raio de 1 Å cada (Figura 24).

Em seguida, os PNs obtidos na triagem baseada em farmacóforo foram submetidas ao filtro de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas no servidor FAF-Drugs4 (<https://fafdrugs4.rpbs.univ-parisdiderot.fr/index.html>). Foram excluídas substâncias duplicadas, *PAINS* (Pan Assay Interference Compounds) (BAELL e HOLLOWAY, 2010), grupo tóxicos, com características estruturais de inibidores covalentes e aqueles ligantes que violavam mais de dois parâmetros da regra dos cinco de Lipinski (LIPINSKI, 2004). O servidor classifica as substâncias como “moléculas aceitas”, “moléculas intermediárias”, e “moléculas rejeitadas”. Neste momento, apenas as aceitas foram escolhidas, por conta do seu melhor perfil de segurança. Todas foram protonadas em pH 7,4 no servidor *FAF-Drugs 4* como preparo para a triagem baseada no alvo.

A “regra dos cinco” de Lipinski sugere boa biodisponibilidade oral para substâncias que cumprem pelo menos três dos quatro requisitos: $PM \leq 500$ Da; coeficiente de partição octanol/água (LogP) ≤ 5 ; número de aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) ≤ 10 ; e número de doadores de ligação de hidrogênio (DLH) ≤ 5 (LIPINSKI *et al.*, 2001).

PAINS são moléculas bioativas promíscuas que podem exibir atividade aparente ao interagirem com macromoléculas não relacionadas aos ensaios biológicos realizados e interferirem na interpretação dos testes ocasionando resultados falso-positivos (DAHLIN *et al.*, 2015).

Adicionalmente, substâncias com características estruturais de inibidores covalentes foram igualmente excluídas, uma vez que há possibilidade de inibição covalente deste ou de outros alvos humanos podendo os inibidores covalentes estar relacionados a diferentes efeitos tóxicos (ENOCH *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-BELLO, 2016).

4.4 Docking molecular dos produtos naturais (PNs) brasileiros na SsHMGR

Para a seleção de ligantes considerando a afinidade de ligação prevista e interações no sítio de ligação às moléculas resultantes dos processos de triagem virtual por farmacóforo e filtragem ADMET, foram então submetidas a estudos triagem virtual baseada na estrutura do alvo (SBVS) através do *docking* molecular dos produtos naturais na SsHMGR. O cálculo foi realizado no programa *AutoDock Vina 1.1.2* e o preparo dos arquivos no *Autodock Tools 1.5.7*. Os parâmetros empregados no protocolo da triagem virtual baseada no receptor foram os mesmos descritos anteriormente no *docking* e *redocking* das estatinas na enzima de HMGR de *Sporothrix schenckii* e humana, respectivamente (Tópico 4.2).

Na triagem virtual no banco de dados do NuBBE foram selecionadas para inspeção visual as moléculas classificadas como aceitas e como afinidade teórica maior ou igual a -8,0 Kcal/mol.

4.5 Análise das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas teóricas *in silico* dos ligantes resultantes na triagem virtual

As substâncias vindas dos estudos de *docking* molecular, tiveram outras propriedades farmacocinéticas e toxicológicas avaliadas diferentes em relação ao filtro ADMET aplicado na primeira etapa.

Para avaliação da absorção intestinal humana (AIH), risco de genotoxicidade (Ames) e cardiotoxicidade por potenciais bloqueadores dos canais de potássio hERG, foi utilizado o programa pkCSM (PIRES *et al.*, 2015).

O gene hERG codifica canais iônicos de potássio que controlam os batimentos cardíacos rítmicos. A inibição desses canais (*hERG 1* e *hERG 2*) está associada ao prolongamento do intervalo QT (ou seja, QT longo síndrome do QT longo, LQTS), causando arritmias cardíacas e morte súbita (RECANATINI *et al.*, 2004). O bloqueio destes canais induzido por fármaco pode causar cardiotoxicidade e por isso tornaram-se marcadores sugestivos de cardiotoxicidade. Vários farmacóforos de canais hERG foram desenvolvidos e fragmentos moleculares que causam ligação de hERG foram definidos para identificar e evitar características estruturais parecidas entre novos fármacos e inibidores de *hERG 1* e *hERG 2* (RECANATINI *et al.*, 2004; SHAMONSKY *et al.*, 2008).

Além disso, o potencial mutagênico com base em ensaios *in vitro* e *in vivo* (dentre eles, o teste de Ames) foi avaliado usando o servidor *Osiris Property*

Explorer (Thomas Sander, Actelion Pharmaceuticals Ltd, Suíça, 2016, <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) e outros riscos toxicológicos, tais como, tumorigenicidade, efeitos irritantes e efeitos sobre a reprodução. Essas propriedades também foram calculadas para o itraconazol, fármaco utilizado no tratamento da esporotricose para estatina utilizada na construção do farmacóforo, para comparação com os ligantes obtidos por triagem virtual.

Segundo a Conferência Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH), os testes de genotoxicidade são ensaios *in vitro* ou *in vivo* para detectar compostos que induzir danos genéticos por vários mecanismos. Para registro de produtos farmacêuticos, estes devem passar por testes padrões para avaliação do potencial genotóxico. O ensaio de mutação reversa bacteriana, AMES, é um desses testes e mostrou-se capaz de detectar alterações genéticas genotóxicas em roedores e carcinogênicas em humanos (ICH, 2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção e Avaliação do modelo tridimensional da SsHMGR

A estrutura tridimensional da SsHMGR foi obtida através da modelagem comparativa, uma vez que a estrutura cristalográfica destas enzimas ainda não foi elucidada. O modelo foi construído no servidor *Swiss-Model* usando o modo automático que requer apenas a sequência de aminoácidos ou o código de acesso UniProtKB da proteína alvo. As sequências FASTA das enzimas de *S. schenkii* (Código NCBI: ERS96480.1) foi obtida no site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

A proteína-molde usada foi a HsHMGR (Código PDB:2Q1L) com percentual de identidade de 54,42% com SsHMGR, sendo considerada um bom molde por apresentar identidade de sequência superior a 30%, pertencer mesma família das proteínas-alvo e apresenta boa resolução (KHAN *et al.*, 2016). O cristal tem complexado um inibidor (**9**) da HMG-CoA Redutase sintético baseado no pirrol, o ácido

(3R,5R)-7-[5-(Anilina-carbonil)-3,4-Bis(4-Fluorofenil)-1-Isopropil-1h-Pirrol-2-Yl]-3,5-Dihidroheptanoico (PFEFFERKORN *et al.*, 2007).

O percentual de identidade entre as sequências FASTA da HMGR de *H. sapiens* (Código NCBI:NP_001351116.1), *S. schenckii* (Código NCBI:ERS96480.1), *S. brasiliensis* (Código NCBI:XP_040622855.1), *C. albicans* (Código NCBI:AOW26055.1), e *S. cerevisiae* (Código NCBI:GHM88949.1) (Tabela 1), variou de 38,19% a 51,32%. Por meio do alinhamento das sequências, verificou-se que são conservados 224 resíduos de aminoácidos entre esses organismos (Figura 15). Também foi observado que 24 dos 27 resíduos de aminoácidos que compõem os sítios de ligação das estatinas em um raio de até 5 Å de distância do inibidor sintético presente no cristal 2Q1L que se conservaram. Isto pode indicar que os domínios catalíticos são altamente conservados nas diferentes espécies de eucariotos enquanto que o domínio transmembrana não, este dado corrobora com o descrito na literatura (FRIESEN e RODWELL, 2004; ANDRADE-PAVÓN *et al.*, 2014).

<i>H. sapiens</i>	-----	0
<i>S. schenckii</i>	MISSASAF LP S R FRGEQ PAAQAA PSWLN KKLTPLLQLL SSLTSSHP IHTVVIVAVL ASS	60
<i>S. brasiliensis</i>	MISSASAF LP S R FRGEQ PAAQAA PSWLN KKLTPLLQLL SSLTSSHP IHTVVIVAVL ASS	60
<i>C. albicans</i>	-----M LS F L T E V T G A I A Q T S A R R P I Q F M V V P A L L A S I	33
<i>S. cerevisiae</i>	-----M S L P L K T I V H L V K P F A C T A R F S A R Y P I H V I V V A V L L S A A	39
<i>H. sapiens</i>	-----	0
<i>S. schenckii</i>	TYMGLLEESIFDAS RSVRRADW SSLSEGS RSLR -VS-----ADTAWK WQ PWD	106
<i>S. brasiliensis</i>	TYMGLLEESIFDAS RSVRRADW SSLSEGS RSLR -VS-----ADTAWK WQ PWD	106
<i>C. albicans</i>	AYLSIIDDYIPEHI-----KSSSGSSGISYYHP-----YTSSHYK SQ P DL D K W T A I D	80
<i>S. cerevisiae</i>	AYLSVTQSYLNEWK-----LDSNQYSAYLSIK P DEL F E K CTHY R S P V S D T W K L L S	90
<i>H. sapiens</i>	-----	0
<i>S. schenckii</i>	VDAARVP-KT--ADHLALLTFVFPES SSDSAPK TAPLVDSVPI PANISVSALP STANPLG	163
<i>S. brasiliensis</i>	VDAARVP-KT--ADHLALLTFVFPES SSDSAPK TAPLVDSVPI PANISVSALP STANPLG	163
<i>C. albicans</i>	KEHINDDIYTQA-NQISV IPLRFR -----RFQ D V V P N V E N A I-	116
<i>S. cerevisiae</i>	SKEAAD-IYTPFHYLSTISFQSK-----DNST L PL S LDD V I-	126
<i>H. sapiens</i>	-----M S R L F R M H G L F	12
<i>S. schenckii</i>	AYSQD T SLAFAAA YDDAAQ FTSAAREI PL HEAADSIA--DQQQHTDDASAT R VTEEHG--	219
<i>S. brasiliensis</i>	AYSQD T SLAFAAA YDDAAQ FTSAAREI PL HEAADNSAD ADR QQHADDASAT R VTEEHG--	221
<i>C. albicans</i>	-HISD-----NEQILIVPT-DQI-----ENSL--DQLQEIT--	143
<i>S. cerevisiae</i>	-YSVD-----HTRYLLSEE-PKI-----PTELVS--	148
<i>H. sapiens</i>	VASHPWEVIVGTVTLTICMMSMN MFTGNNK ICGW-NYEC PK FEED--VLSSDIIIL TIT	68
<i>S. schenckii</i>	REKKMWIMKAAG-----AAQTGSSIL RWLQNGW EFVDLLKNAD TL DIIMV LG	268
<i>S. brasiliensis</i>	REKKMWIMKAAG-----AAQPGSSIL RWLQNGW EFVDLLKNAD TL DIIMV LG	270
<i>C. albicans</i>	NNGITW KARN ND-----KL--AKYYDY-IRYGLN KVQ DAIQHAENFDILLIFVA	189
<i>S. cerevisiae</i>	ENGT KWRL RNNS-----NF--ILD L H N I R N M V K Q F S N K T S E F D Q F D L F I L A A	195
	* * * *	
<i>H. sapiens</i>	RCIAILYIYFQ NLRQLG SKYILGIAGLFTIFSSFV FSTVVIHF -L--DKEL TGL NEAL	125
<i>S. schenckii</i>	YLSMHLTFVSLFLSM RRLG SNFWLGT SVLFS STFAFLFGLIV TK -LGV PV SMVLL SEGL	327
<i>S. brasiliensis</i>	YLSMHLTFVSLFLSM RRLG SNFWLGT SVLFS STFAFLFGLIV TK -LGV PV SMVLL SEGL	329
<i>C. albicans</i>	YLG MW YALIKV FVDM RKIGSK FWLAF STLTSSTFAFL LALLV SNK FL TKV SLL SL SEGI	249
<i>S. cerevisiae</i>	YLT L F Y T L C L F N D M R K I G S K F W L S F S A L S N S A C A L Y L S L T T H S L L K K P A S L L S L V I G L	255
	: * . . * : * : * *	

Figura 15. Alinhamento entre as sequências de resíduos de aminoácidos das enzimas HMGR de *H. sapiens*, *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Os resíduos idênticos em todas as enzimas estão marcados com asterisco (*). Os resíduos que se conservam em um raio de até 5 Å do sítio de ligação estão destacados por marcação de texto na cor amarelo claro. Parte 1.

<i>H. sapiens</i>	PFFLLIDLSRASTLAKFALSSNSQDEV	154
<i>S. schenckii</i>	PFLVVTIGFEKNIALTKAVLSHALERRRNLERPAAAA--AASGSSKKSSARAAAAAKK	384
<i>S. brasiliensis</i>	PFLVVTIGFEKNIALTKAVLSHALERRRNLERPVAAAVAAAADSSKKSSSRAAAAAAKK	389
<i>C. albicans</i>	PFLVSVIGFKHKVSIATIVANSSTASP	276
<i>S. cerevisiae</i>	PFIVVIIGFKHKVRLAASFSLQKFRHSID-----KK	286
	**:: *.: : : :	
<i>H. sapiens</i>	-----ENIARGMAILGPTFTLDA-----LVECLVIGVGTMSGVRQLEIMCCFG	197
<i>S. schenckii</i>	VTTTSSPSVIQYAIQMAIKEKGYDIVRDYAIIEILILVI-G-AASGVQGGQ--QFCFLA	439
<i>S. brasiliensis</i>	VTTTSSPSVIQYAIQMAIKEKGYDIVRDYAIIEILILVI-G-AASGVQGGQ--QFCFLA	444
<i>C. albicans</i>	-----EDVPHVVGKAVSSHCLSMRLDHLVIGGLLSCA-IYAHHLTGLR--NFCILS	325
<i>S. cerevisiae</i>	-----ITVSNIIYEAMFQEGAYLIRDYLFYISSFIGCA-IYARHLPLGV--NFCILS	335
	: : : : * : : : * : : *	
<i>H. sapiens</i>	CMSVLANYFVFMTPFPACVSLVLELSRESREGRPIWQLSH--FAR----VLEE-----E	245
<i>S. schenckii</i>	AWILVDFCVLLFTFYSAILCIKLEINRIKRHVELRRALEDDGVSRRVAENVAQSNDFRT	499
<i>S. brasiliensis</i>	AWILVDFCVLLFTFYSAILCIKLEINRIKRHVELRRALEDDGVSRRVAENVAQSNDFRT	504
<i>C. albicans</i>	SLILSFDLILVYTFYSAILGLKVEINRARTEDLQNALEEEGSSSLVAARVAEQSATIEH	385
<i>S. cerevisiae</i>	TFMLVFDLLSATFYSAILSMLKLEINRIHRSTVIRQTLEEDGVVPTADIYKD----ET	391
	: : : : ** : * : : : * : : * : : *	
<i>H. sapiens</i>	EN-----KPNPVTQRVKMIMSLGLVLVHAHS--RWIADPSQNSTADTSKVS	290
<i>S. schenckii</i>	DGRGEPASIFGRQIKSTSVPKFKVLMVTGFVIINVLNCTL-PFRSVD--SLASISSMT	556
<i>S. brasiliensis</i>	DGRGEPAAASIFGRQIKSTSVPKFKVLMVTGFVIINVLNCTL-PFRSAD--SLASISSMT	561
<i>C. albicans</i>	PNE----HNFFK-SNNSIAYFKVIMSLGFFAFHAFWLGSSWLYSTTD-----	428
<i>S. cerevisiae</i>	ASE----PHFLR-SNVAIILGKAS--VIGLLLLINLY----VFTDKL-----	427
	: : : : * : : : * : : *	
<i>H. sapiens</i>	LGLDENVSKRIE-----PSVSLWQFYLSK-----	314
<i>S. schenckii</i>	GGLGGVVASPPVDFPKVAASGLDITL--ASAKAQNDRDVTVTILTPIKYELEFPVSHYALP	614
<i>S. brasiliensis</i>	GGLGGVVASPPVDFPKVAASGLDITL--ASAKAQNDRDVTVTILTPIKYELEFPVSHYALP	619
<i>C. albicans</i>	---GGESFSRF--SFLSNIPTLSQDIS-QQIPIGRKGTVVITLPTIFF-----MP	472
<i>S. cerevisiae</i>	---NATILNTV--YFDSTIYSLPNFINYKIDIGNLSNQVVIISVLPKQYY-----TP	472
	: : : : : :	
<i>H. sapiens</i>	-----M-----ISMD-----IEQVITLSLALLAVKY	336
<i>S. schenckii</i>	TGSRSGSHGASSATGYAASDLTYGGVGRMVDSILKSLEDPVLSKWIIVALALS VVLNG	674
<i>S. brasiliensis</i>	TGSRSGSHGASSAAGSTASDLTYGGVGRMVDSILKSLEDPVLSKWIIVALALS VVLNG	679
<i>C. albicans</i>	SGFMVQ-----LEDFIYLVLSKFSASAIRDSIISKFLVFGFALSIVTNV	515
<i>S. cerevisiae</i>	LKKYHQ-----IEDSILLIIDSVSNAIRDQFISKLLFFAFAVISINV	515
	: : : : : : * : : : : :	
<i>H. sapiens</i>	IFFEQTETESTLSLKNPITSPVVTQKVPDNCRRPMLVRNNQ----KC--DSVEEE	388
<i>S. schenckii</i>	YLFNVARWG---IK-----DPNVPDHP-----IDPRELAQAQKFNDTASATLP	714
<i>S. brasiliensis</i>	YLFNVARWG---IK-----DPNVPDHP-----IDPRELAQAQKFNDTASATLP	719
<i>C. albicans</i>	YFLNAARYQ---VS-----ATHKL-----IEKEISRPQDSSVTATTTTTATGTTS	557
<i>S. cerevisiae</i>	YLLNAAKIH---TG-----YMNFPQSNKIDDLVVQKRSATIE--FSETRSMSPAS	560
	: : : : : : : : : : :	
<i>H. sapiens</i>	TGIN-----RERKVEIKPLVAETDTPNRATFVVGNSLLDTSSVLVT	762
<i>S. schenckii</i>	MGEYMPPTPIGNKPMTPALTDDEGELLAMRPLKQREGAPKPS-----SQADL	767
<i>S. brasiliensis</i>	MGEYMPPTPIGNKPMTPALTDDEGELLAMRPLKQREGAPKPS-----SQADL	767
<i>C. albicans</i>	SGAATSK-TIGNN-----KGLKSVQIIPDNE-----ESSDE	588
<i>S. cerevisiae</i>	SGLETPV-T--A-----KDIIISEEIQNEC-----VYA--	586
	* : : : : : : : : : :	
<i>H. sapiens</i>	QEPEIELPREPRNNEECLQILGNAEKAKFLSDAEIIQLVNAKHIPAYKLETLMETHERG	491
<i>S. schenckii</i>	QAAKAKAALIQRTPAEMEQLKD--QRAQELTDGELVYLSLRGKIPGYALEKTLKDYTRA	820
<i>S. brasiliensis</i>	QAAKQAALIQRTPAEMEQLKD--HRAQELTDGELVYLSLRGKIPGYALEKTLNDYTRA	825
<i>C. albicans</i>	E-LEIKAPVKVLPLEECVKVLKE--GKVKTLNDEVSLLVVGKLPYALEKQLADNKRA	645
<i>S. cerevisiae</i>	---LSSQDEPIRPLSNLVELMEK--EQLKMNNTFVSNLVVNGKLPYLSLEKLEDTRA	641
	: : : : : : : : : : * : : * : : * : : *	
<i>H. sapiens</i>	VSIRRQLLSKLS-----EPSSLQYLPYRDYNSLVMGACCENVIYMPIPVGVAGPLCL	546
<i>S. schenckii</i>	VKIRRHTIARTKATEELTGLLDESELPFENYNWDQVFGQCCENVGYMPIPVGVAGPIVI	880
<i>S. brasiliensis</i>	VKIRRATIARTKATEELTGLLDESELPFENYNWAQVFGQCCENVGYMPIPVGVAGPIVI	885
<i>C. albicans</i>	VIVRRKAIKLAN---APVLDTNRLPYAHYDYDRVFGACCENVIYMPIPVGVAGPLII	701
<i>S. cerevisiae</i>	VIVRRKALSTLAE---SPILVSEKLPFRNYDYDRVFGACCENVIYMPIPVGVIGPLII	697
	* : * * : : : : * : : * : : * : * * * * : : * : : *	

Figura 15. Alinhamento entre as seqüências de resíduos de aminoácidos das enzimas HMGR de *H. sapiens*, *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Os resíduos idênticos em todas as enzimas estão marcados com asterisco (*). Os resíduos que se conservam em um raio de até 5 Å do

sítio de ligação estão destacados por marcação de texto na cor amarelo claro. Parte 2.

<i>H. sapiens</i>	DEKEFQVPMATTEGCLVASTNRGCR AIGLGGGASSRVLADGMT RGPVVR LPRACDSAEVK	606
<i>S. schenckii</i>	DGKSYFIPMATTEGVLVASTSRGCKAINAGGGAVTVLTADGMT RGPCLSFETVERAGAAK	940
<i>S. brasiliensis</i>	DGKSYFIPMATTEGVLVASTSRGCKAINAGGGAVTVLTADGMT RGPCLSFETVERAGAAK	945
<i>C. albicans</i>	DEKPYHIPMATTEGCLVASTMRGCKAINAGGGVETVLT RDGMT RGPVVRFP LTKRAGAAK	761
<i>S. cerevisiae</i>	DGTSYHIPMATTEGCLVASAMRGCKAINAGGGATTVLT KDGMT RGPVVRFP LTVRSGACK	757
<i>S. cerevisiae</i>	* . : :***** ***: **:* . ** . : : ***** : : : . *	
<i>H. sapiens</i>	AWLETSEGFAVIKEAFDSTSRFARLQKLHSTIAGRNL YIRFQSRSGDAMGMNMISKGTEK	666
<i>S. schenckii</i>	IWLDSEAGQNTMRKAFNSTSRFARLSHMTALAGTNLYVRFKTTTGDAMGMNMISKGVEH	1000
<i>S. brasiliensis</i>	IWLDSEAGQNTMRKAFNSTSRFARLSHMTALAGTNLYVRFKTTTGDAMGMNMISKGVEH	1005
<i>C. albicans</i>	LWIDSEQQATIKKAFNSTSRFARLQHIQTALAGTSLFIRFRTTTGDAMGMNMISKGVEY	821
<i>S. cerevisiae</i>	IWLDSEEGQNSIKKAFNSTSRFARLQHIQTCLAGDLLFMRFRTTTGDAMGMNMISKGVEY	817
<i>S. cerevisiae</i>	* : : . * : : ** : ***** : : : * : ** * : * : : ***** : *	
<i>H. sapiens</i>	ALSKLHE--YFPEMQILAVSGNYCTDKKPAAINWIEGRGKSVVCEAVIPAKVVRVLEKTT	724
<i>S. schenckii</i>	ALNVMNEAGFEDMNIVSLSGNYCIDKKAALNWIDGRGKSVVAEAIIPGDVVRNVLKTE	1060
<i>S. brasiliensis</i>	ALNVMNEAGFEDMNIVSLSGNYCIDKKAALNWIDGRGKSVVAEAIIPGDVVRNVLKTE	1065
<i>C. albicans</i>	SLKYMVEECGWDDMEIVSVSGNYCTDKKPAAINWIEGRGKSIVAAARIPADVTKVLKSD	881
<i>S. cerevisiae</i>	SLKQMVVEEYGEDMEVSVSGNYCTDKKPAAINWIEGRGKSVVAEAIIPGDVVKSVLKSD	877
<i>S. cerevisiae</i>	:* . : : : : : : : : ***** ** * ** : ** : ***** : * . * ** . ** * : *	
<i>H. sapiens</i>	TEAMIEVNIKNLVGSAMAGSIGGYNAAHANIVTAIYIACQDAAQNVGSSNCITLMEAS	784
<i>S. schenckii</i>	VDTLVLDLNI SKNLIGSAMAGATGGFNAHAANIVAAIYIATGQDPAQVVESANCITIMKN-	1119
<i>S. brasiliensis</i>	VDTLVLDLNI SKNLIGSAMAGATGGFNAHAANIVAAIYIATGQDPAQVVESANCITIMKN-	1124
<i>C. albicans</i>	VDALVELNISKNLVGSAMAGSVGGFNAHAANLVAVYLACQDPAQNVESNCITLMEKD	941
<i>S. cerevisiae</i>	VVALVELNISKNLVGSAMAGSVGGFNAHAANLVAVYLAQDPAQNVESNCITLMEK-	936
<i>S. cerevisiae</i>	. . . : : : ** : ** : ***** : : ** : ***** : * : : : * ** * * * * : ***** : *	
<i>H. sapiens</i>	GPNTEDLYISCTMPSIEIGTVGGTNLLPQQACLQMLGVQGACKDNPGENARQLARIVCG	844
<i>S. schenckii</i>	--LRGNLQISVSMPSIEVGTIGGGTILEPQGAMDLLGVRGPHPTSPGENARRLARI IAA	1177
<i>S. brasiliensis</i>	--LRGNLQISVSMPSIEVGTIGGGTILEPQGAMDLLGVRGPHPTSPGENARRLARI IAA	1182
<i>C. albicans</i>	K-ETGDLNVSVMPSIEVGTIGGGTILEPQGAMDLLGVRGPHPTNPANAAQLAKIVAS	1000
<i>S. cerevisiae</i>	--VDGDLRISVSMPSIEVGTIGGGTILEPQGAMDLLGVRGPHPTEPGANARQLARI IAC	994
<i>S. cerevisiae</i>	:* : * : ***** : ** : ***** * ** * * : : ***** : . ** * : ***** : *	
<i>H. sapiens</i>	TVMAGELSLMAALAAGHLVKSHMIHNRSKINLQDLQGACTKKA-----	888
<i>S. schenckii</i>	ATLAGELSLCSALAAGHLVRAHMAHNRSA PPTRTTTPAPPTPSGALTPVTGLTPVVPGGA	1237
<i>S. brasiliensis</i>	ATLAGELSLCSALAAGHLVKAHMAHNRSA PPTRTTTPAPLTPSGALTPVTGLTPVVPGGA	1242
<i>C. albicans</i>	AVLAAELSLCSALAAGHLVQSHMQHNRSKAPAAGATT-TTTPAITD-SKASNGSIASNGK	1058
<i>S. cerevisiae</i>	AVLAGELSLCSALAAGHLVQSHMTHNRKTNKANELPQ-PSNK---G-PPCKTSALL----	1045
<i>S. cerevisiae</i>	: . : * : ***** : ***** : ** * * * .	
<i>H. sapiens</i>	-----	888
<i>S. schenckii</i>	AAAGVERSASTAALSPAVERSRR	1261
<i>S. brasiliensis</i>	AAAGVERSASTAALSPAVERSRR	1266
<i>C. albicans</i>	DLKRLEEGSVTCIKS-----	1073
<i>S. cerevisiae</i>	-----	1045

Figura 15. Alinhamento entre as sequências de resíduos de aminoácidos das enzimas HMGR de *H. sapiens*, *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Os resíduos idênticos em todas as enzimas estão marcados com asterisco (*). Os resíduos que se conservam em um raio de até 5 Å do sítio de ligação estão destacados por marcação de texto na cor amarelo claro. Parte 3.

Tabela 1. Percentual de identidade entre as sequências de diferentes espécies de fungos e *H. sapiens*.

	<i>H. sapiens</i>	<i>S. schenckii</i>	<i>S. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>H. sapiens</i>	-				
<i>S. schenckii</i>	38,55	-			
<i>S. brasiliensis</i>	38,67	98,41	-		
<i>C. albicans</i>	40,02	43,57	43,28	-	
<i>S. cerevisiae</i>	38,19	42,38	42,18	51,32	-

O próximo passo a ser realizado foi a otimização da geometria, onde os modelos passaram por ciclos de minimização de energia no SPDBV e então se iniciou as análises de validação destes. Primeiramente, avaliou-se a qualidade estereoquímica do modelo pelo gráfico de Ramachandran. No qual se observou que 90,3% dos resíduos de aminoácidos do molde encontram-se em regiões favoráveis, enquanto que a SsHMGR apresenta 91,3% dos resíduos. O molde e o modelo (Figura 16) apresentam 9,7% e 8,7%, respectivamente, dos resíduos de aminoácidos nas regiões permitidas e 0% nas regiões desfavoráveis, deste modo, é possível observar boa qualidade estereoquímica dos modelos construídos.

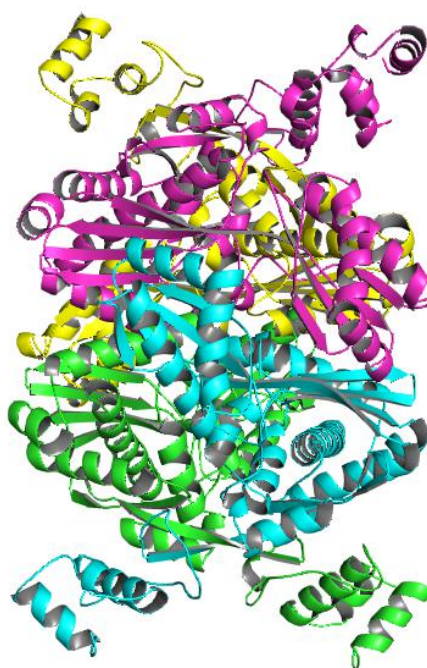


Figura 16. Modelo tridimensional da enzima SsHMGR obtido colorido por cadeia. Obtido no Pymol

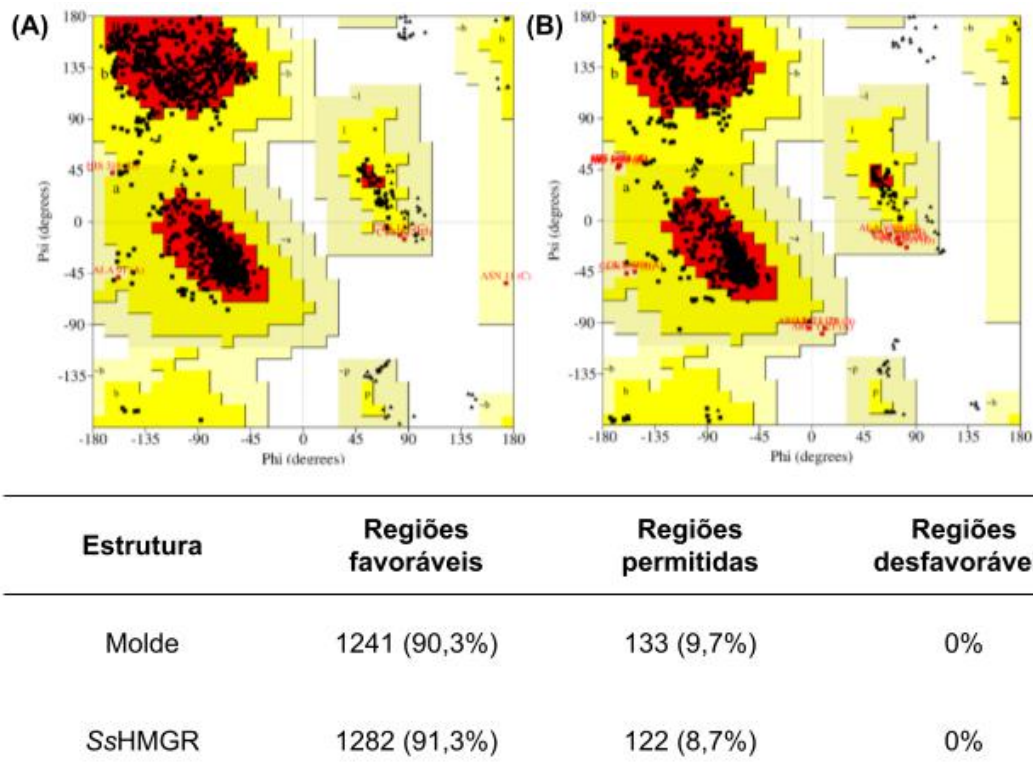


Figura 17. Gráficos de Ramachandran do (A) molde de HMGR de *H. sapiens*, (B) modelo de HMGR *S. schenckii*. Obtidos no *Procheck*.

A próxima análise para validação do modelo construído (Figura 19) foi determinar a compatibilidade do modelo tridimensional (3D) das HMGRs de *H. sapiens* e *S. schenckii* com suas próprias sequências de aminoácidos (1D) usando o servidor *Verify 3D*. As estruturas submetidas nesse programa devem apresentar pelo menos 80% dos aminoácidos com score 3D-1D maior ou igual a 0,2. O molde apresenta 90,08% dos seus resíduos de aminoácidos dentro deste critério, o modelo de SsHMGR tem 88,53% dos resíduos com pontuação a partir de 0,2 no perfil 3D/1D (Figura 17). Observa-se que o modelo construído teve pontuação próxima com a do molde e acima de 80%, indicando que a estrutura tridimensional proposta para SsHMGR é compatível com a sua estrutura primária.

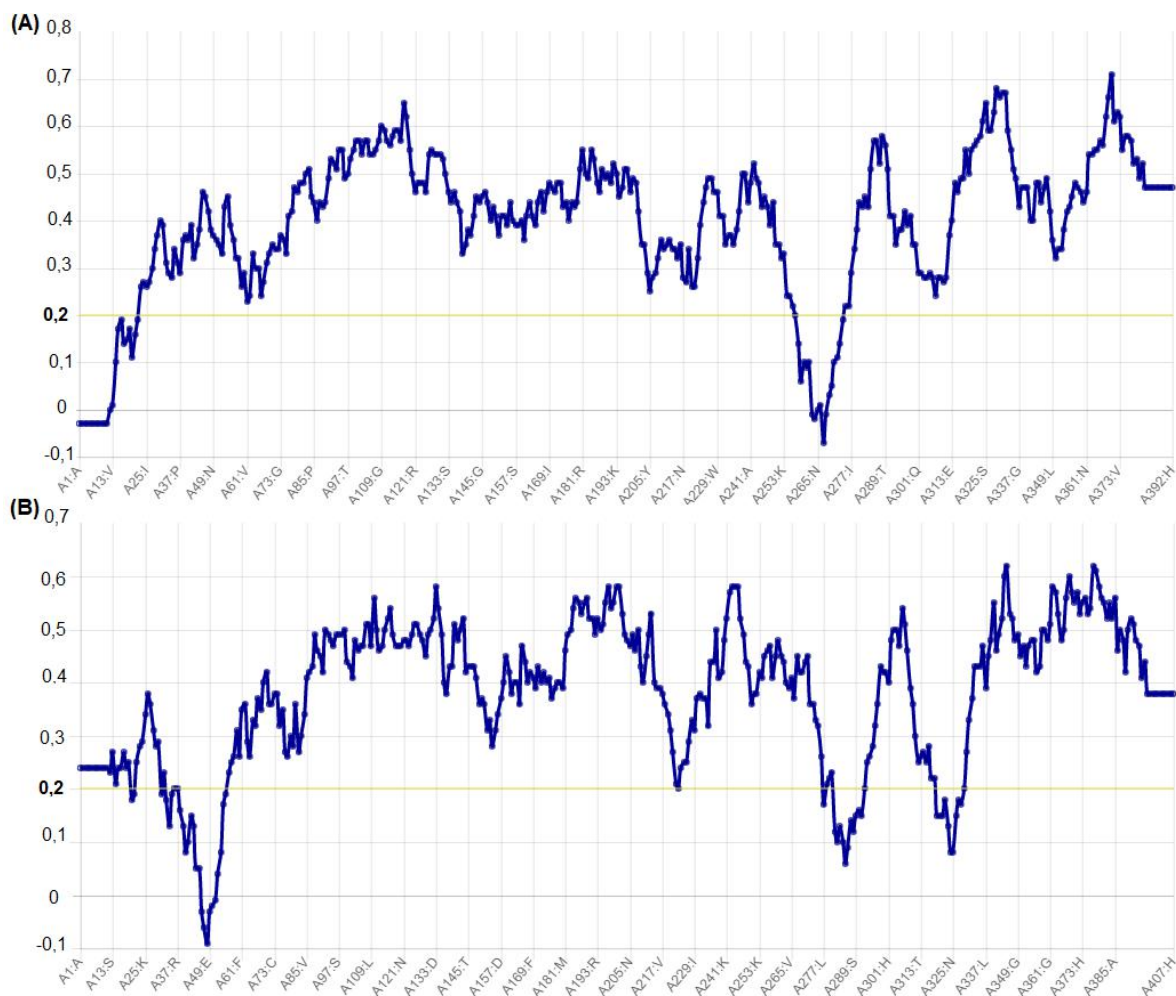


Figura 18. Perfil 3D-1D do (A) molde de HMGR de *H. sapiens*, (B) modelo de HMGR *S. schenkii*. Obtidos no SAVES

Para compreensão da qualidade geral e energia global obteve-se o *z-score* no servidor *ProSA-web*, nesta plataforma também é possível analisar a energia local. O *z-score* pode indicar estruturas falhas caso seja diferente de uma faixa característica para proteínas nativas (WIEDERSTEIN e SIPPL, 2007). O modelo SsHMGR teve *z-score* de -9,13 que foi bem próximo do *z-score* molde de -8.54. O resultado do modelo também foi contundente com a faixa de *z-scores* encontrados para proteínas de tamanhos parecidos e determinadas experimentalmente por raio-x depositadas no PDB (Figura 18 A e B). O gráfico de energia para cada resíduo de aminoácido (Figura 18 A e B mostrou energias locais satisfatórias, valores negativos, para a maioria dos resíduos tanto no molde, quanto no modelo. As regiões dessas estruturas 3D que tiveram valores acima de zero não compunham o sítio catalítico.

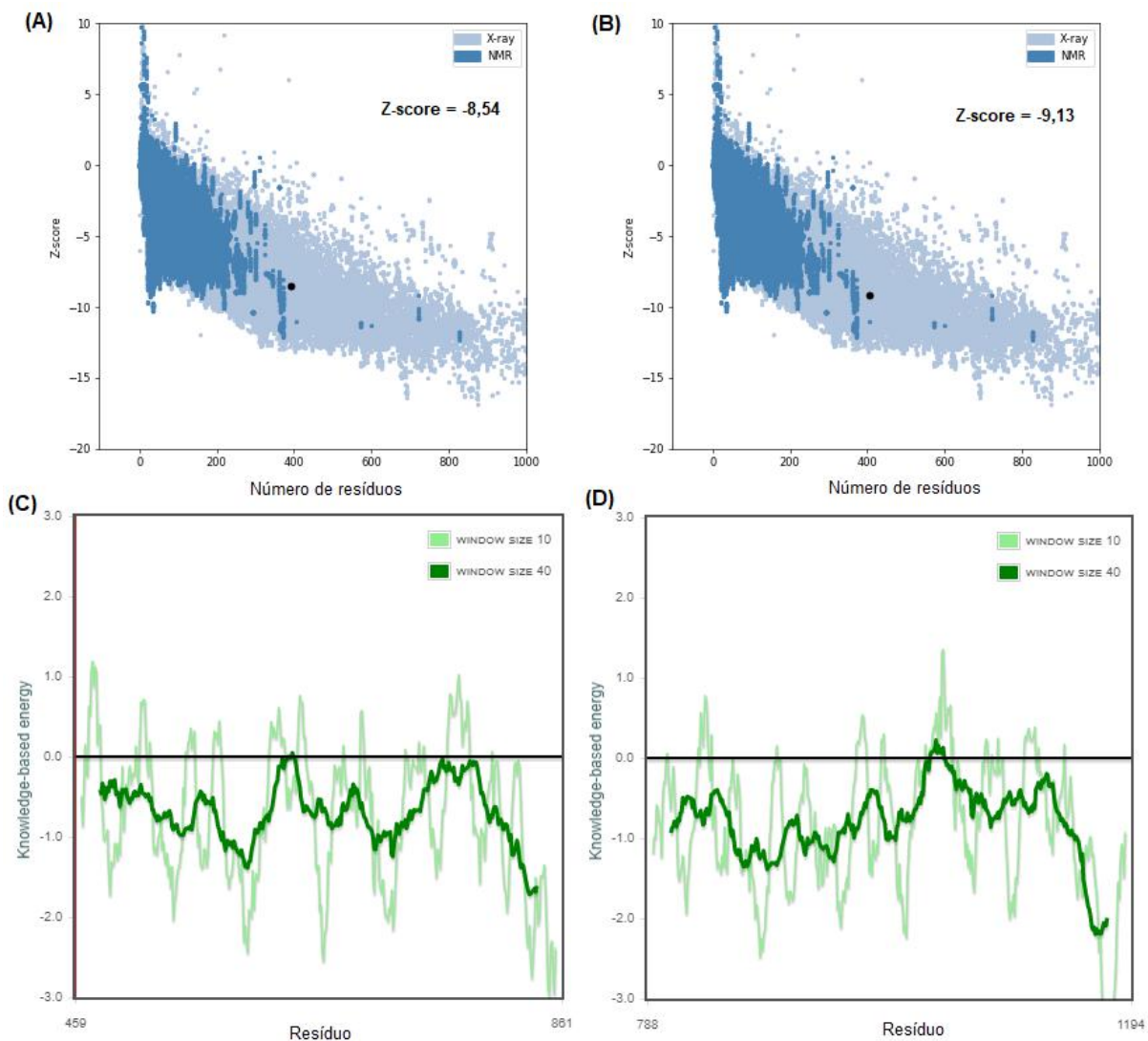
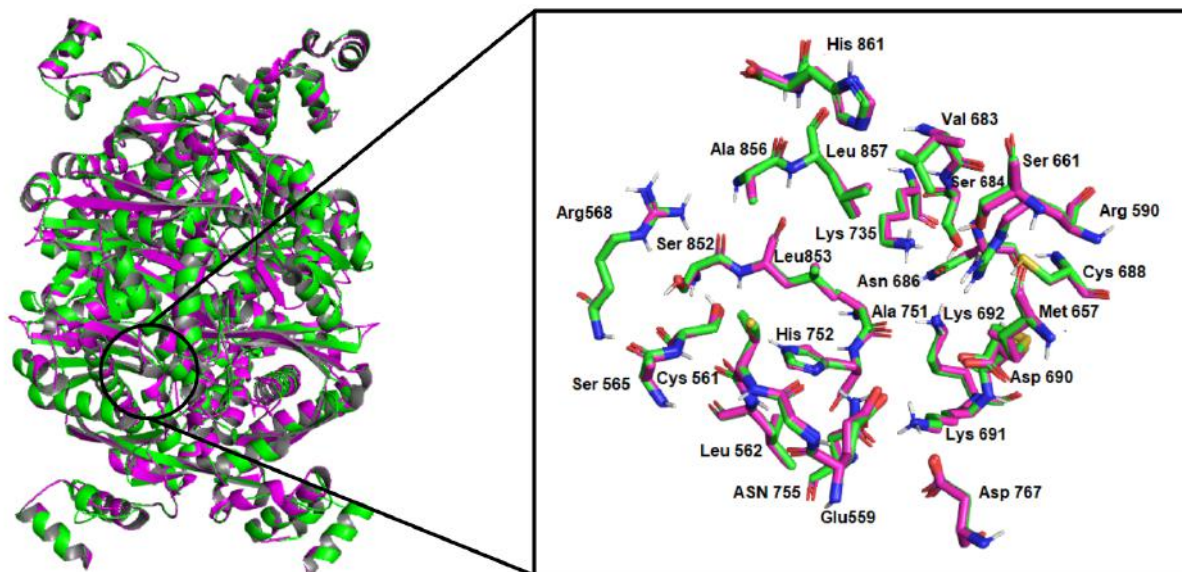


Figura 19. Gráfico de Z-score calculado para (A) molde *HsHMGR* e (B) modelo *SsHMGR* para qualidade geral. Gráfico de energia em função de cada resíduo para (C) molde *HsHMGR* e (D) modelo para qualidade local. Em verde escuro energia média suavizada sobre cada fragmento de 40 resíduos e o verde claro é a de energia média com uma janela menor em 10 resíduos. Obtidos no *ProSA-Web*

Notou-se que os resíduos do sítio ativo se conservaram nas enzimas de ambos organismos com exceção de dois resíduos, a Cys561 e valina 683 no molde que no modelo da HMGR de *S. schenckii* sofreram alteração para Val895 e Leu1019, respectivamente (Figura 15). O valor de desvio médio quadrático (RMSD) da sobreposição do molde e modelo construído foi de 0,26 Å.



HsHMGR	Glu559	Gly560	Cys561	Leu562	Ala564	Ser565	Arg568	Lys735	Ala751	His752	Asn755
SsHMGR	Glu893	Gly894	Val897	Leu 896	Ala 898	Ser899	Arg902	Lys1071	Ala1087	His1088	Asn1091
HsHMGR	Ser852	Leu853	Ala856	Leu857	His861	Arg590	Met 657	Ser661	Val683	Asn686	Cys688
SsHMGR	Ser1185	Leu1186	Ala1189	Leu1190	His1194	Arg954	Met 991	Ser995	Leu1019	Asn1022	Cys1024
HsHMGR	Asp690	Lys691	Lys692								
SsHMGR	Asp1026	Lys1027	Lys1028								

Figura 20. (A) Proteína molde *HsHMGR* (rosa) e o modelo de *SsHMGR* (verde) sobrepostos, com ampliação dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das enzimas num raio de 5 Å de distância do inibidor (9) complexa a estrutura da *HsHMGR* (código PDB: 2Q1L) (B) Descrição dos resíduos de aminoácidos das enzimas *HsHMGR* e *SsHMGR* (verde: ácido; cinza: apolar; azul: polar; vermelho: básico). Destacados em laranja claro são os resíduos que não se conservaram entre os dois organismos. Imagem gerada a partir do *Pymol*.

5.2 Docking molecular e avaliação do modo de ligação de inibidores conhecidos com a enzimas *SsHMGR*

Para validação do método do *docking* foi feito o *redocking* dos ligantes das em suas estruturas cristalográficas das enzimas *HsHMGR*, mevastatina (PDB:1HW8), sinvastatina (PDB:1HW9), fluvastatina (PDB:1HWI), cerivastatina (PDB:1HWJ), atorvastatina (PDB:1HWK), rosuvastatina (PDB:1HWL) e inibidor (9) (PDB:2Q1L), usando o *Autodock Vina* 1.1.2. As poses obtidas por docking (Figura 21) foram parecidas com as observadas pelo método experimental de difração de raio X, com valores de RMSD variando de 0,969 a 1,688 Å e afinidade teórica (energia de ligação) de -9,4 a -7,0 kcal/mol. As análises visuais somadas ao resultados de RMSD indicam que o método foi validado, já que os RMSDs foram

abaixo de 2,0 Å (GANI, 2007; KONTOYIANNI; MCCLELLAN, *et al.*, 2004; LEACH *et al.*, 2006).

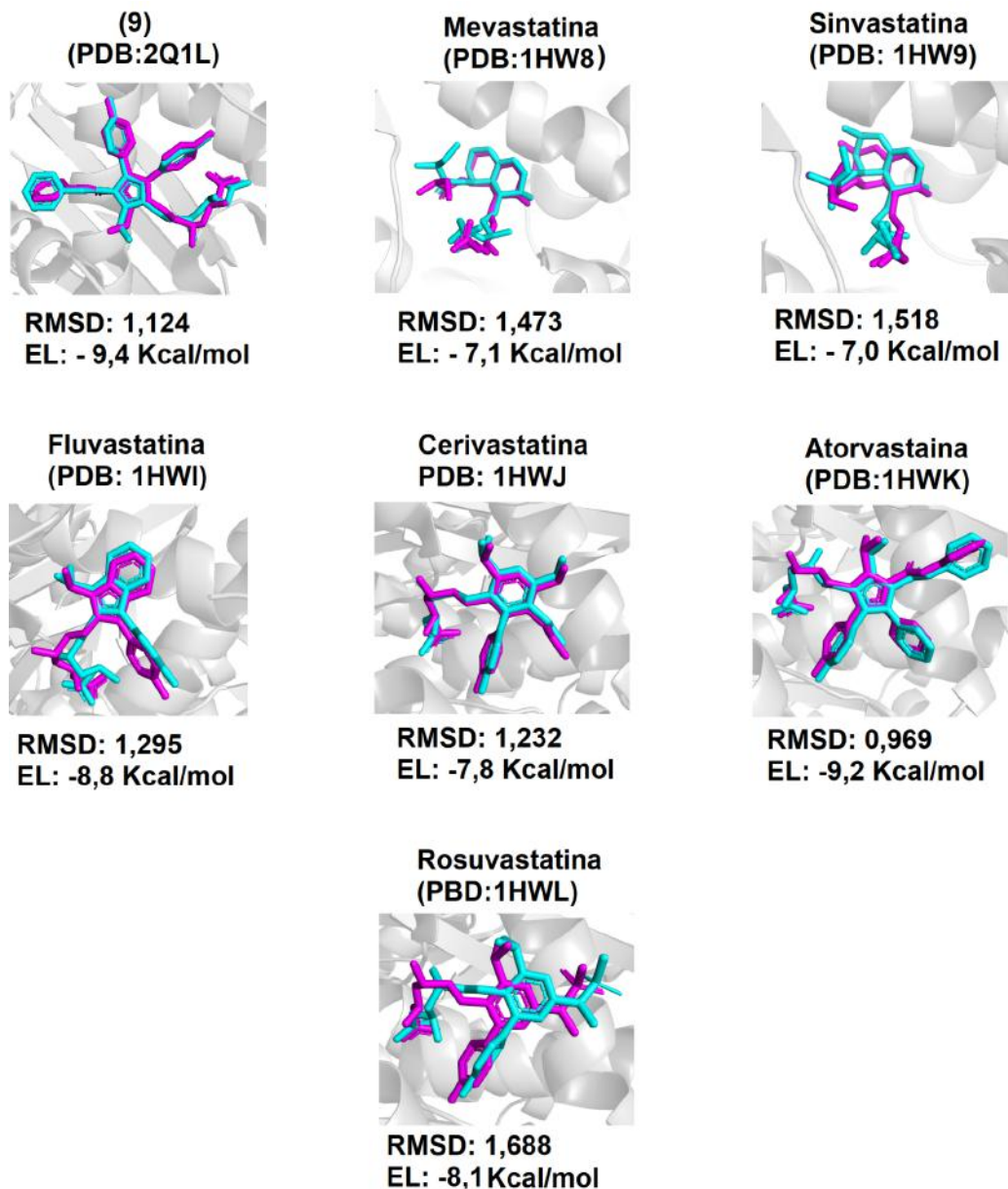


Figura 21. *Redocking* dos inibidores nas estruturas cristalográficas de HMGR de *H. sapiens*, com seus valores de códigos PDB, RMSD em ângstrons (Å) e energia de ligação (EL). A conformação cristalográfica dos inibidores está na cor magenta e a conformação obtida por docking em ciano. Imagem gerada no *Pymol*.

Em seguida os modos de ligação desses inibidores a *HsHMGR* foi avaliada através dos programas *Pymol* e do *Discovery Studio*. Assim como o observado na literatura, muitas interações foram mantidas para as diferentes estatinas (PDB:1HW8-1HWL) e o mesmo ocorreu para o ligante (9) (Quadro 1) apesar das diferenças estruturais, como ligações de hidrogênio entre os inibidores e os resíduos

de aminoácido Lys691, Glu559 e Lys735 que também são observadas para o substrato HMG-CoA (ISTVAN e DEISENHOFER, 2001; CAMPO e CARVALHO, 2007). Também foram percebidos contatos de van der Waals para todos os ligantes e Ala751, interações do tipo hidrofóbicas com os resíduos Leu853, Cys561, Leu562 e π -alquil com a His752. A sobreposição dos inibidores presentes nos cristais mostrou que esses apresentam orientações parecidas para as unidades de ácido 3,5-di-hidroxicinâmico e β,δ -di-hidroxiheptanóico. O mesmo ocorre entre os grupos decalina e os anéis heterocíclicos.

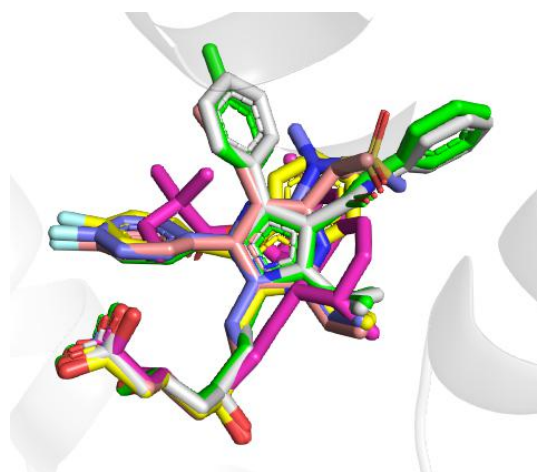


Figura 22. Sobreposição dos inibidores complexados nas estruturas cristalográficas de HMGR de *H. sapiens*. Imagem gerada no *Pymol*.

Quadro 1. Principais interações conservadas entre os inibidores complexados com as estruturas cristalográficas de *HsHMGR* e o modelo *SsHMGR*. Verde: Ligação de hidrogênio; Laranja: Interação alquil; Azul: Interação de van der Waals; Rosa: Interação π -alquil; Roxo: Ligação de halogênio; Mostarda: π - σ

		Resíduos														
		LYS735	ARG590	SER684	ASP690	GLU559	CYS561	LEU853	SER565	VAL683	LEU857	ALA751	LYS691	LEU562	HIS752	ASN755
HMGR <i>H. sapiens</i>	Inibidor	PDB														
	Mevastatina	1HW8	Verde													
	Sinvastina	1HW9	Verde													
	Fluvastatina	1HWI	Verde													
	Cerivastatina	1HWJ	Verde													
	Atorvastatina	1HWK	Verde													
	Rosuvastatina	1HWL 2Q1L	Verde													
HMGR <i>S. schenckii</i>	Inibidor	PDB														
	Mevastatina	1HW8	Verde													
	Sinvastina	1HW9	Verde													
	Fluvastatina	1HWI	Verde													
	Cerivastatina	1HWJ	Verde													
	Atorvastatina	1HWK	Verde													
	Rosuvastatina	1HWL 2Q1L	Verde													

O *docking* molecular dos inibidores no modelo de *SsHMGR* foi realizado a fim de identificar os ligantes que conservaram o modo de ligação parecido aos observados nos cristais e considerando esses dados construir o modelo

farmacofórico para triagem. A atorvastatina (PDB:1HWK) teve energia de ligação teórica de -8,5 kcal/mol e foi escolhida por ser o inibidor que mais conserva interações com o modelo (Figura 23A), além de apresentar uma orientação semelhantes em comparação ao observado nos cristais (Figura 23B). Soma-se a isso seu potente efeito inibidor da HGMR e sua atividade em cepas *C. albicans* (MIC de 16–64 µg/mL), *C. glabrata* (MIC=32 µg/mL), para *Sporothrix* na forma filamentosa (MIC de 8 a 32 µg/mL) e na forma de levedura (MIC de 8 a 64 µg/mL) (LIMA *et al.*, 2019; BRILHANTE *et al.*, 2020).

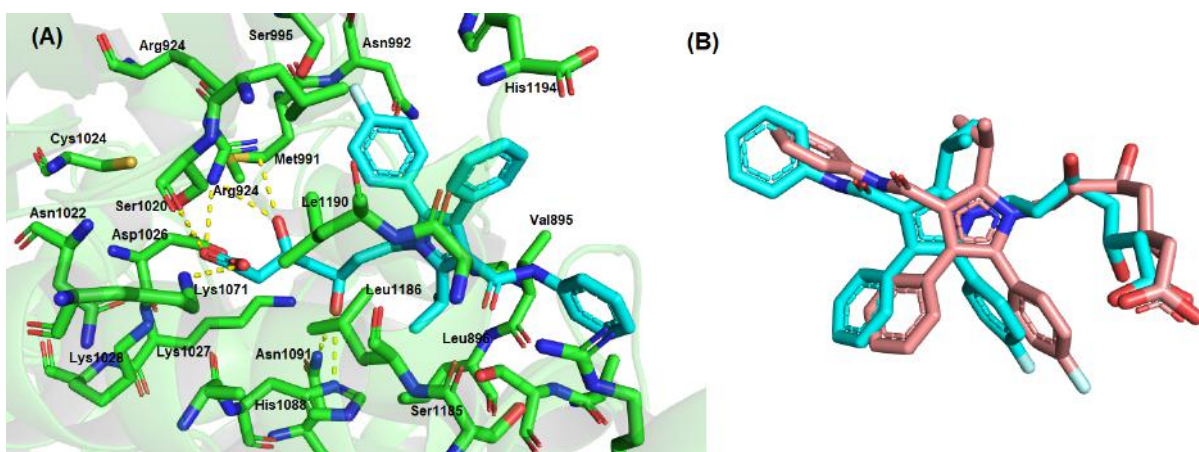


Figura 23. (A) Interações e modo de ligação da atorvastatina no sítio ativo da SsHMGR obtido por *docking* molecular, EL = -8,5 kcal/mol (B) Conformação da atorvastatina obtida por *docking* (ciano) sobreposta a conformação observada para a estatina complexada (vermelho) à estrutura cristalográfica de HMGR de *H. sapiens*. Imagens geradas no *Pymol*.

5.3 Triagem virtual baseada em farmacóforo de produtos naturais brasileiros com potencial para inibidores da SsHMGR

Diante dos resultados do *docking*, análise das interações dos inibidores e considerações acima sobre a atorvastatina, dois modelos farmacofóricos foram definidos baseados nesta estatina. Os modelos compreenderam 3 farmacóforos: um ponto aromático (raio de 1,5 Å) e dois pontos acceptor de ligação de hidrogênio (raio de 1 Å). A diferença entre os modelos consiste na posição de um ponto acceptor de ligação de hidrogênio (Figura 24).

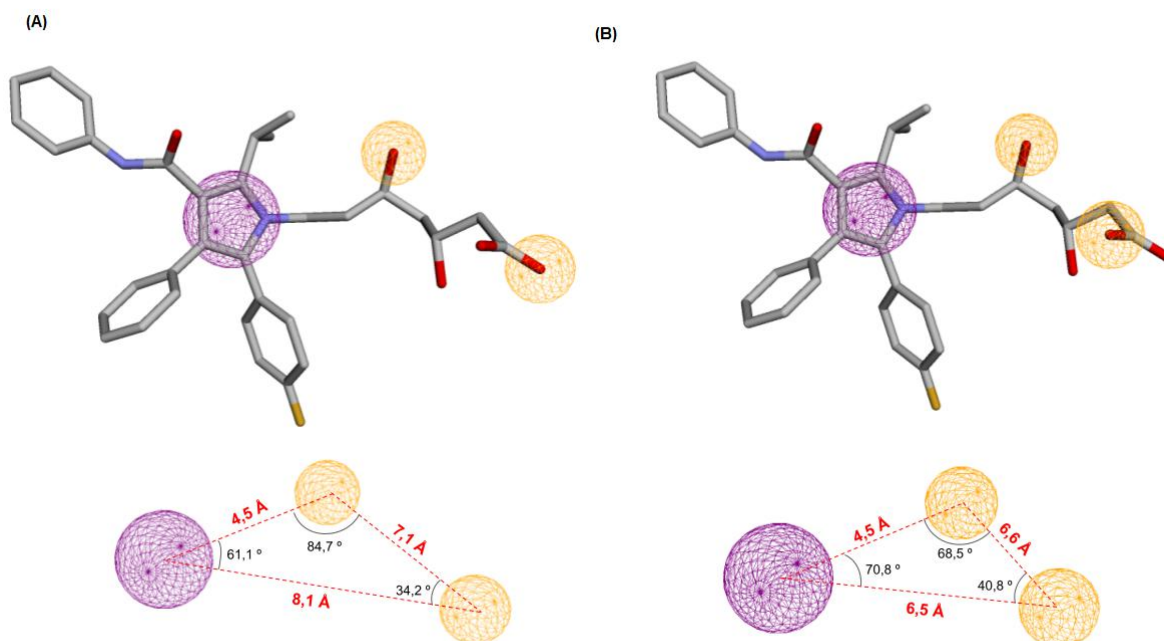


Figura 24. Modelos farmacofóricos construídos a partir da atorvastatina com as distâncias e ângulos entres os pontos farmacofóricos. Em laranja pontos aceptores de ligação de hidrogênio e em roxo ponto aromático.

Os pontos acceptor de ligação de hidrogênio foram definidos no grupo di-hidroxi-heptanoico da atorvastatina, os modelos de farmacóforo são iguais com diferença apenas na localização do ponto acceptor, diferenciando entre o átomo de oxigênio no grupo carboxila. Nesta região da molécula o oxigênio da hidroxila escolhida como farmacóforo realiza ligação de hidrogênio com Asn1091 e His1088, no grupo carboxílico os oxigênios fazem o mesmo tipo de interação com os resíduos Lys1071, Se1020 e Arg924. No pirrol foi colocado o ponto aromático, este anel interage por meio de contatos hidrofóbicos com os resíduos de aminoácido Ala1189, Leu1186 e Val895.

A triagem baseada em farmacóforo pelo *Pharmit* obteve 10.047 PN brasileiros, que então foram submetidos no servidor *FAF-Drugs 4* para filtragem por propriedades farmacocinéticas e remoção de moléculas duplicadas. Identificou-se 9.074 duplicatas que foram removidas. Das 973 moléculas filtradas, 386 foram classificadas como aceitas, 172 intermediárias e 415 rejeitadas. Entre as moléculas rejeitadas 138 eram PAINS e 265 tinham características de inibidores covalentes.

As substâncias classificadas como aceitas foram submetidas ao *docking* molecular na SsHMGR no programa *Autodock Vina* 1.1.2. Para as análises

posteriores definiu-se que seriam avaliadas as moléculas aceitas e que tivessem energia de ligação igual ou superior a -8,0 kcal/mol, como resultado, 110 moléculas foram submetidas a uma inspeção visual. Aquelas que respeitaram os modelos farmacofóricos e mantiveram as interações com os resíduos de aminoácidos importantes foram selecionadas. Seis moléculas atenderam a esses critérios e tiveram suas propriedades ADMET analisadas *in silico*.

Foi possível verificar que os PN resultantes tiveram orientações parecidas e conformação estendida no sítio de ligação, semelhante à atorvastatina (Figura 25). Percebeu-se que o anel furano do **(10)** ficou espacialmente próximo ao anel pirrol da atorvastatina, enquanto que **(13-15)** o anel pirrol dos demais e furano se sobrepuseram a unidade grupo hidroximetilglutaril (HMG) da ATO. O ligante **(12)** não apresenta esse anel, porém seu anel tetraidropirano também se encontra nessa região. Interações como ligação de hidrogênio com os resíduos Ser1020, Lys1071, Asn 1091 e interações π -alquil com Leu 1186 e/ou Val 895, que ocorrem com frequência entre as estatinas e o inibidor **(9)** com *HsHMGR* e *SsHMGR*. As interações Ser 1020 e Lys 1071 também ocorrem entre o substrato (HMG-CoA) e a enzima humana e seu substrato (CAMPO e CARVALHO, 2007) se repetiram para essas 6 moléculas e a enzima fúngica (Quadro 2). Pelo *docking* molecular os valores de afinidade teórica foram entre -9,1 e -8,0 Kcal/mol (Quadro 2), valores superiores do que o observado para a ATO (-9,2 Kcal/mol).

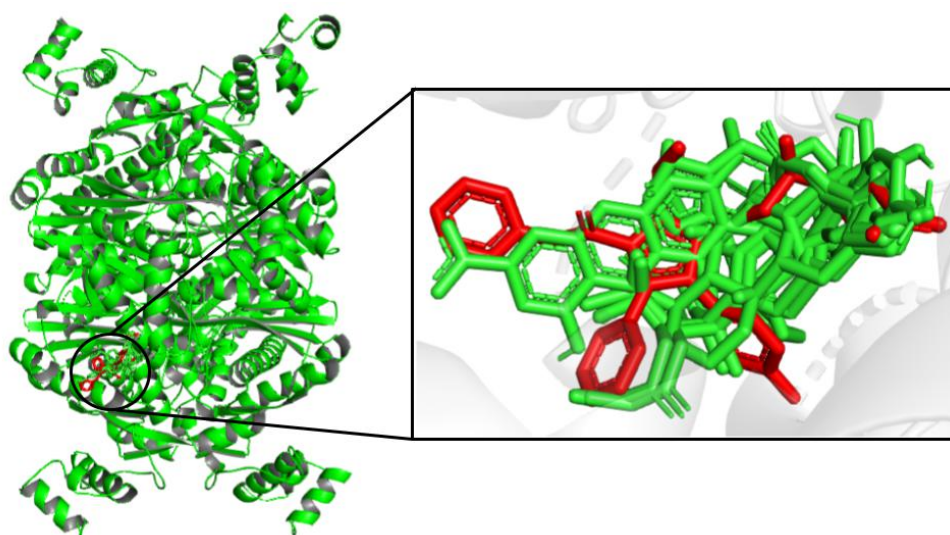


Figura 25. Sobreposição das poses dos produtos naturais obtidos na triagem virtual (verde) com a atorvastatina (vermelho). Imagem gerada no *Pymol*.

O PN **(10)**, Maackiaina, vinda da triagem, é um isoflavonoide derivado pterocarpano isolado da planta *Diplotropis purpurea* que possui um grupo furano (FILHO *et al.*, 1973). Esta planta é encontrada na região norte e centro-oeste do Brasil conhecida popularmente como supupira (LIMA e CARDOSO). Os pterocarpanos são o segundo maior grupo de isoflavonóides e têm como característica um sistema tetracíclico constituído de uma porção benzofurano-benzopirano com dois centros quirais nas posições 6a e 11a derivados do esqueleto flavonoide (GOEL *et al.*, 2013; SELVAM *et al.*, 2017). Diversas propriedades farmacológicas foram atribuídas a estes metabólitos, como efeito antitumoral, antileishmania, antimicrobiana e antifúngica (BUARQUE *et al.*, 2011; SELVAM *et al.*, 2017). A Maackiaina inibiu a germinação de esporos de *Fusarium oxysporum* em grão-de-bico (STERVENSON *et al.*, 1997). Também foi relatado seu efeito antitumoral (PENG *et al.*, 2022) e amplificação do ativação do inflamassoma (HUH, *et al.*, 2020). Esse ligante manteve as principais ligações de hidrogênio com os resíduos Ser 1020, Lys 1071, Asn 1091. Interações hidrofóbicas π -alquil se conservaram com Val 895 e Leu186, que aconteceram dos orbitais pi do anel benzênico do benzopirano e do anel heterocíclico aromático com dois átomos de O com o alquil presente nos aminoácidos (Quadro 2). Houve ainda interação ânion- π interação entre o um benzeno do ligante e a Asp 1026, esse tipo de interação ocorre entre ânions e sistemas aromáticos com deficiência de elétrons carregados positivamente ou serem neutros e relativamente relativamente pobres em elétrons (BRANDI *et al.*, 2008; FOKOUE *et al.*, 2020; RATHER *et al.*, 2020).

O mexicanolide **(11)** é um triterpenóide limonóide que foi obtido de espécie *Cipadessa fruticosa* e exibe atividade anti-trypanosoma (LEITE *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2010). Os limonóides são compostos químicos bicíclicos altamente oxigenados e os principais metabólitos secundários da família Meliaceae, ação antimalarica, antimicrobiana e citotóxica são algumas das atividades desses constituintes (FANG *et al.*, 2011). Essa molécula apresenta 4 anéis na cadeia principal, sendo um lactona, e na cadeia lateral apresenta um anel furano. A carbonila do anel lactona atua como acceptor de ligação de hidrogênio na interação com os resíduos Asn 1091 e His 1088 da SsHMGR, já o átomo de oxigênio do anel furano aceita este tipo de interação com a Lis 1071. Há interação cátion- π do orbital π do furano interage com um grupo amino forma catiônica, a interação pode ter acontecido devido à atração eletrostática entre a região de potencial eletrostático negativo na face sistema π e o

cátion (DOUGHERTY, 2013; FOKOUE *et al.*, 2020) Segundo BISSANTZ *et al.* em 2010 e DOUGHERTY em 2013 a interação cátion- π ocorre comumente em uma distância de 2-4 Å quando o cátion está sobre o plano do sistema π . Os orbitais π do furano interagem também com o grupo alquil do resíduo Leu1186, interação hidrofóbica. Ocorrem ainda interações de hidrogênio do tipo carbono-hidrogênio (Quadro 2).

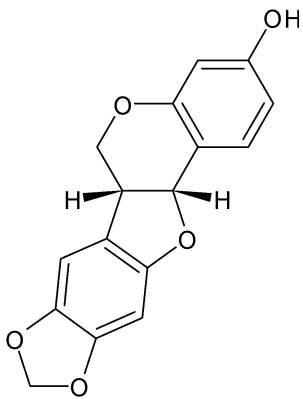
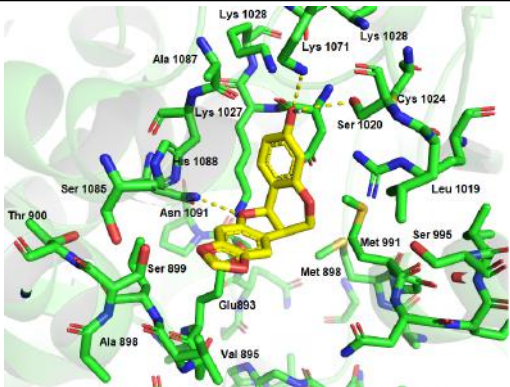
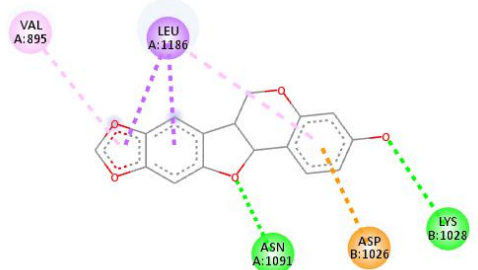
O siphoneugena (**12**) é um ácido aromático e aglicona, a estrutura depositada no *NuBBE* foi isolado da planta *Siphoneugena Berg* e é no centro-oeste e sudeste do Brasil (GALLO *et al.*, 2006). As hidroxilas ligadas ao tetraidropirano desse PN realizam várias ligações de ligação de H com a enzima nos resíduos Ala1087, Ser1020 e Glu893, Lys1027, Lys1071, Asn1091, Lys1028. Houveram interações hidrofóbicas entre os resíduos Ala1189, Leu1186 e os anéis da porção dibenzo-p-dioxina da molécula. Nesta o região o anel benzênico ligado ao grupo carboxila interagiu eletrostaticamente com o grupo amino catiônico da Arg902 em uma interação cátion- π .

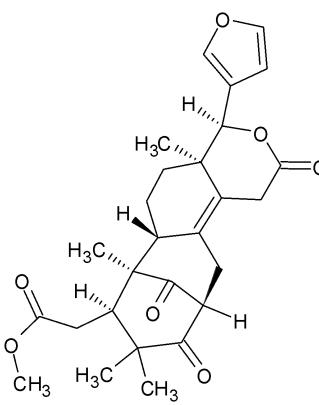
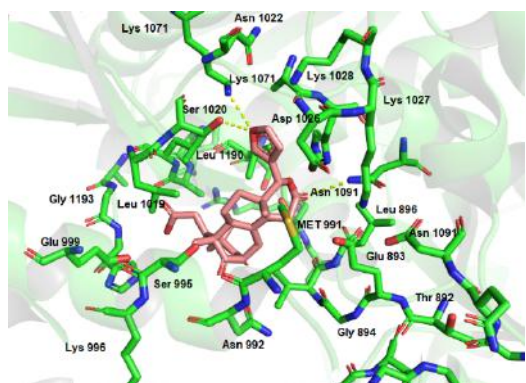
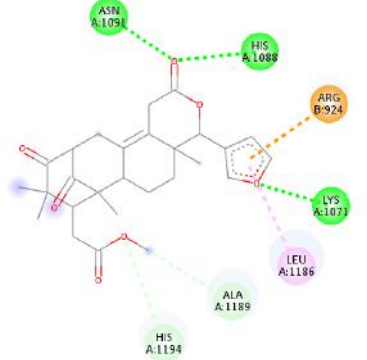
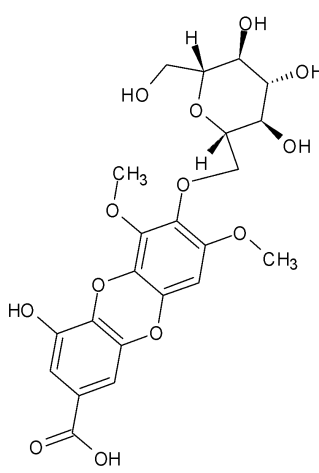
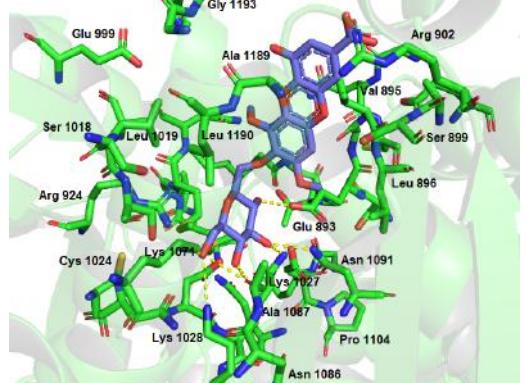
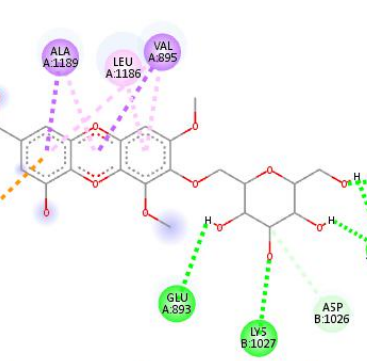
O PN (**13**) é um diterpeno com esqueleto vouacapano isolado da *Pterodon polygalaeflorus* (FASCIO *et al.*, 1976). Estudos sugerem que este PN tenha efeitos analgésicos periféricos e anti-inflamatórios via inibição da COX-2 (GALCERAN *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2018). Na análise do *docking* dessa molécula com a SsHMGR observou-se ligações de hidrogênio como acceptor com os resíduos Asn1091, Lys1027, Asp1026, Ser1020 e como doador com Glu 893. O resíduo Leu1186 e o anel furano do diterpeno interagiram hidrofobicamente. Entre esse anel e Asp1026 aconteceu interação ânion- π .

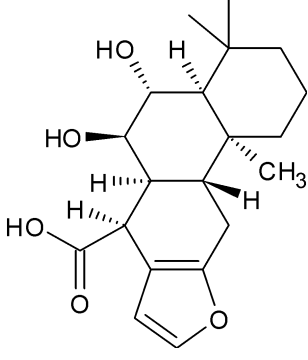
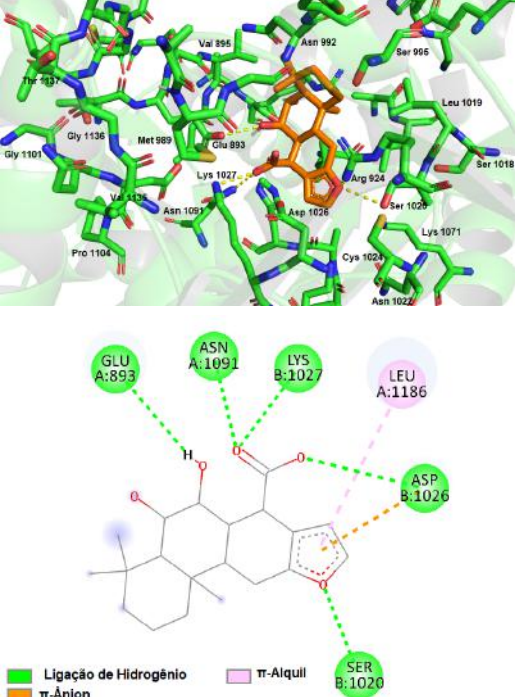
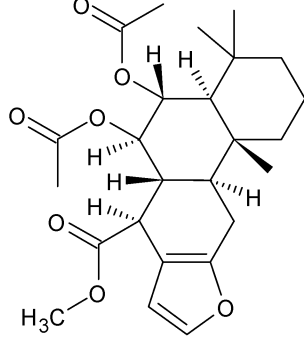
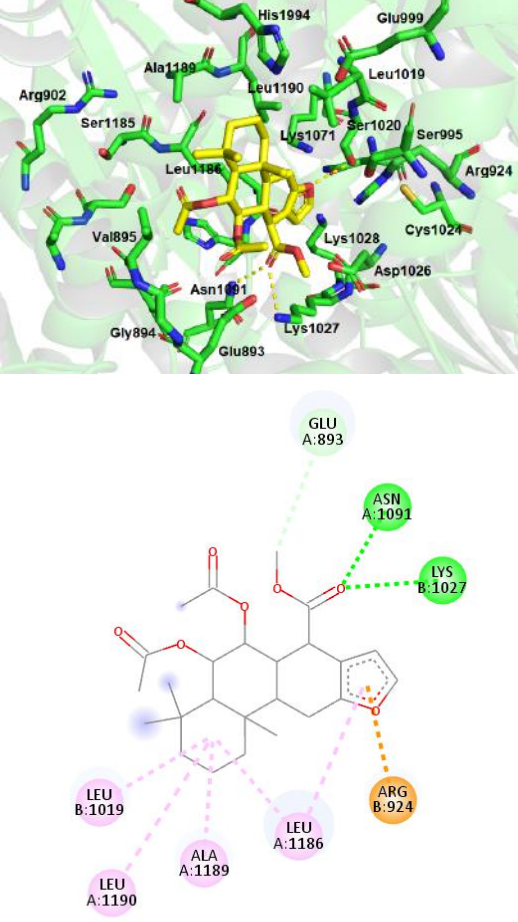
O ligante (**14**) também é um diterpeno com esqueleto vouacapano dos diterpenos, sendo obtido da *Pterodon pubescens* (FASCIO *et al.*, 1976). As árvores do gênero *Pterodon* são nativas da região central do Brasil e conhecidas popularmente como “sucupira-branca” ou “faveira” (HOSCHEID e CARDOSO, 2015). Estudos têm associado atividades anti-inflamatórias, larvicidas, leishmanicidas, cardiovasculares e antitumorais aos fitoquímicos desta espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2017). As ligações de hidrogênio com os resíduos Lys1027, Asn1091, Ser1020 se repetiram na interação dessa molécula com a HMGR de *S. schenckii*. Interações hidrofóbicas com Leu1186, Leu10199, Leu1190 e Ala1189. O anel furano participou de uma interação eletrostática do tipo cátion- π com a Arg 924.

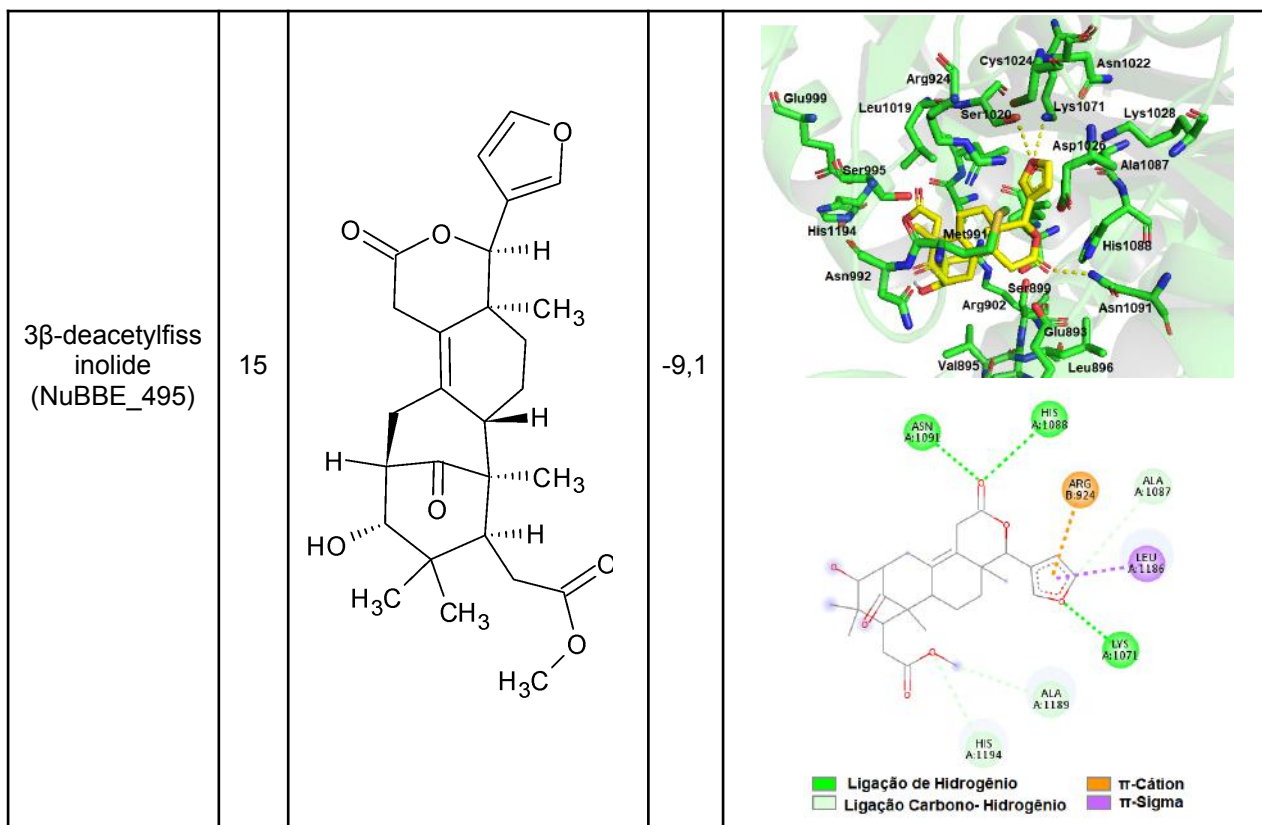
O triterpeno (**15**) foi isolado de *Cabralea canjerana*, a “canjarana”, e também é um limonóide (PAULA *et al.*, 1997; SARRIA *et al.*, 2011). Moreno *et al.*, 2004 identificou atividade antimicrobiana do extrato das folhas dessa planta em *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*. O 3- β -deacetylfiassinolida apresentou ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácido com Asn1091, His1088 e Lys1071, estas mesmas interações mas do tipo carbono-hidrogênio aconteceram com His 1194, Ala1189 e Ala1087. Entre o anel furano do fitoquímico aconteceu interação cátion- π com Arg924 e uma interação hidrofóbica do tipo π -sigma com Leu1186.

Quadro 2. Produtos naturais selecionados por triagem virtual a partir do banco de dados do Nubbe. Energia de ligação (EL) estimada pelo programa *Autodock Vina 1.1.2* (em Kcal/mol). Modo de ligação e diagrama 2D obtidos no *Pymol* e *Discovery Studio*, respectivamente. Linhas amarelas tracejadas indicam interações de hidrogênio.

PN	ID	Estrutura química	EL	Modo de ligação e diagrama 2D das interações
Maackiaina (NuBBE_2510)	10		-8,0	  <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> ■ Ligação de hidrogênio ■ π-Anion </div> <div style="text-align: center;"> ■ π-Sigma ■ π-Alquil </div> </div>

<p>Mexicanolide (NuBBE_1054)</p>	<p>11</p>		<p>-8,5</p>	  <p> ■ Ligação de hidrogênio ■ π-Cátion ■ Ligação Carbono-Hidrogênio ■ π-Alquil </p>
<p>Siphoneugenin a (NuBBE_1186)</p>	<p>12</p>		<p>-8,2</p>	  <p> ■ Ligação de Hidrogênios ■ π-Sigma ■ Ligação Carbono-Hidrogênio ■ π-Alquil ■ π-Cátion </p>

<p>Ácido 6α,7β-dihidroxi- vouacapano-1 7β-óico (NuBBE_1576)</p>	<p>13</p>		<p>-8,3</p>  <p> ■ Ligação de Hidrogênio ■ π-Alquil ■ π-Ânion </p>
<p>6α,7β-diacetoxi vouacapano-14 β-ato de metila (NuBBE_1718)</p>	<p>14</p>		<p>-8,5</p>  <p> ■ Ligação de Hidrogênio ■ Alquil ■ Ligação Carbono-Hidrogênio ■ π-Alquil ■ π-Cátion </p>



Flavonoides são compostos polifenólicos com uma estrutura benzo- γ -pirona e estão presentes de forma ubíqua nas plantas. Este grupo tem como característica um esqueleto de quinze carbonos que consiste em dois anéis de benzeno ligados por meio de um anel pirano. Podem ser divididos em várias classes, como flavonas e flavanonas, que se diferenciam no nível de oxidação e no padrão de substituição do anel pirano (KUMAR e PANDEY, 2013). São fitoalexinas sintetizadas pela via fenilpropanóide e possuem variedade de atividades farmacológicas (ULLAH *et al.*, 2020; FERDOUS e YUSOF, 2021; Badshah *et al.*, 2021). Atividade antifúngica em *S. schenckii* e *S. brasiliensis* . foi mostrada em estudos *in vitro* (OLIVEIRA *et al.*, 2016; WALLER *et al.*, 2018).

Terpenos são a maior classe de produtos naturais, produzidos principalmente por plantas são altamente bioativos com diferentes funções fisiológicas (GERSHENZON e DUDAREVA, 2007; LIMA *et al.*, 2021). São hidrocarbonetos insaturados estruturados em unidades isoprenoides, blocos de 5 carbonos, ligadas (ligação 1-4), se houver oxigênio em sua estrutura química são chamados de terpenóides e podem apresentar diferentes funções químicas, como ácidos, álcoois e aldeídos (FELIPE e BICAS, 2017). São classificados com base no número de átomos de carbono (C) que possuem: hemiterpenos apresentam 5C, monoterpenos

10 C, homoterpeons 11 e 16 C, sesquiterpenos 15 C, diterpenos 20 C, sesterpenos 25 C, triterpenos 30 C, tetraterpenos 40 C e politerpenos são aqueles com mais de 40 C (BONCAN *et al.*, 2020). Mais de 40.000 variedades estruturais dessa classe são conhecidas e diversas propriedades medicinais lhes são atribuídas, como ação anti-inflamatória (YOUSEFF *et al.*, 2019, KIM *et al.*, 2020; GALLILY *et al.*, 2018), antioxidante (CUTALLIS *et al.*, 2018) atividade antimicrobiana (Bound *et al.*, 2015, Mahizan MAHIZAN *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2021). O potencial antifúngico de derivados terpênicos foi observado em cepas de *S. schenkii* (BRILHANTE *et al.*, 2015; BRILHANTE *et al.*, 2019) e em *S. brasiliensis* resistente a itraconazol (WALLER *et al.*, 2021).

5.4 Análise das propriedades ADMET *in silico* dos produtos naturais com potencial inibidor da SsHMGR.

As análises propriedades farmacocinéticas e toxicológicas *in silico* (Tabela 2) foram feitas por duas ferramentas diferentes. O *pkCSM* prevê as propriedades ADMET das moléculas a partir das propriedades gerais, como moleculares, toxicóforos, farmacóforos, e dos padrões de assinatura de gráficos baseada em distância. Nele são fornecidos 30 preditores divididos entre sete preditores relacionados com absorção, quatro com distribuição, sete de metabolismo, dois de excreção e 10 para toxicidade (PIRES *et al.*, 2015). O programa *Osiris Property Explorer* que permite avaliar o potencial de toxicidade da molécula através da comparação dos fragmentos da molécula com de fármacos e de substâncias tóxicas que tiveram suas propriedades ADMET analisadas (PATRICK, 2009).

Tabela 2. Propriedades farmacocinéticas e toxicológicas teórica de produtos naturais potenciais inibidores da SsHMGR por triagem virtual, atorvastatina e itraconazol. AIH: absorção intestinal humana. Genotoxicidade: AMES. Cardiotoxicidade: Inibidores de hERG. HT: Hepatotoxicidade. EM: Efeito mutagênico. ET: Efeito tumorigênico. EI: Efeito irritante. DL: *Druglikeness*. DS: *Drugscore*. ER: Efeito reprodutivo. ATO: Atorvastatina. ITZ: itraconazol.

Molécula	<i>pkCSM</i>					<i>Osiris Property Explorer</i>					
	AIH(%)	AMES	Inibidor hERG 1	Inibidor hERG 2	HT	EM	ET	EI	ER	DL	DS
10	96	Sim	Não	Não	Não	Baixo	Baixo	Baixo	Alto	-1,99	0,27
11	100	Não	Não	Não	Não	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	-8,15	0,31
12	7	Não	Não	Não	Não	Médio	Baixo	Baixo	Baixo	-2,03	0,27
13	100	Não	Não	Não	Sim	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	-3,73	0,4
14	95,23	Não	Não	Não	Não	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	-5,42	0,28
15	100	Não	Não	Não	Não	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	-6,07	0,31
ATO	64,35	Não	Não	Não	Sim	Baixo	Baixo	Baixo	Alto	4,04	0,15
ITZ	100	Não	Não	Sim	Sim	Alto	Alto	Baixo	Baixo	8,09	0,08

As análises pelo no *pkCSM* sugerem bom perfil toxicológico desses produtos naturais com exceção de **(10)** que foi positivo para o teste de AMES o que significa um potencial mutagênico para este composto. O PN **(13)** foi o único que mostrou hepatotoxicidade, assim como os já aprovados fármacos atorvastatina e itraconazol. Em relação às propriedades farmacocinética apenas (12) foi prevista com pouca absorção intestinal humana por ter absorbância menor que 30% (PIRES *et al.*, 2015) e tendo violado duas das regras dos cinco de Lipinski. Este sugeriu que caso uma molécula não cumpra dois ou mais parâmetros possivelmente será pouco permeável (LIPINSKI *et al.*, 2012). Dessa forma, no geral, os produtos naturais apresentaram um perfil farmacocinético e toxicológico teórico promissor.

Por sua vez, a análise de toxicidade no *Osiris Property Explorer* indicou que a molécula **(10)** tem baixo risco de efeito mutagênico e um alto risco de efeito irritante. A atorvastatina também apresentou alto risco de efeito irritante e o itraconazol alto risco de efeito mutagênico e tumorigênico. Os demais produtos naturais tiveram baixo risco para as propriedades toxicológicas.

Dessa forma, no geral, os produtos naturais **(11)**, **(13)**, **(14)** e **(15)** apresentaram um perfil farmacocinético e toxicológico teórico promissor.

6 CONCLUSÃO

O modelo tridimensional proposto para a enzima HMGR de *S. schenkii* foi validado, portanto é adequado para ser usado na triagem virtual baseada na estrutura.

Foi possível determinar resíduos que se conservaram nas interações entre estatinas, inibidor **(9)** e dos produtos naturais com SsHMGR e com HsHMGR. Ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácido Lys691, Glu559 e Lys735, também descritas na literatura para HMG-CoA, contatos de van der Waals para Ala751 e hidrofóbicas com Leu853, Cys561, Leu562 e His752.

Pelas técnicas de triagens baseadas em farmacóforo e na estrutura do alvo molecular e predição de propriedades ADMET *in silico* foram identificados quatro produtos naturais isolados da biodiversidade brasileira com perfil farmacocinético e toxicológico teórico seguro e com potencial de inibir a SsHMGR.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. **Boletim Epidemiológico Esporotricose nº 001/2021. Rio de Janeiro: Secretaria de Saúde do Rio de Janeiro, GERDTVZ. 2021.**

ADELUSI, T. I. *et al.* Molecular modeling in drug discovery. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 29, p. 100880, 2022.

AGONI, C. *et al.* Druggability and drug-likeness concepts in drug design: are biomodelling and predictive tools having their say? **Journal of molecular modeling**, v. 26, n. 6, P. 120, 2020.

AGRIPINO, D. G. *et al.* Screening of Brazilian plants for antimicrobial and dnadamaging activities: I. Atlantic rain forest . Ecological station juréia-itatins. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 1–15, 2004.

ALMEIDA-PAES, R. *et al.* Melanins Protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the Antifungal Effects of Terbinafine. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0152796, 2016.

ANDERSON, T. M. *et al.* Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 5, p. 400–406, 2014.

ANDRADE-PAVÓN, D. *et al.* The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductases from fungi: a proposal as a therapeutic target and as a study model. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 31, n. 1, p. 81–85, 2014.

ARINELLI, A. *et al.* Ocular Sporotrichosis: 26 Cases with Bulbar Involvement in a Hyperendemic Area of Zoonotic Transmission. **Ocular immunology and inflammation**, v. 28, n. 5, p. 764–771, 2020.

ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195-201, 2006.

ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.

BADSHAH, S. L. *et al.* Antiviral activities of flavonoids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 140, p. 111596, 2021.

BAELL, J. B.; HOLLOWAY, G. A. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. **J Med Chem**, v. 53, n. 7, p. 2719-2740, 2010

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.

BELLMANN, R.; SMUSZKIEWICZ, P. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. **Infection**, v. 45, n. 6, p. 737–779, 2017

BENNETT, J. E. Flucytosine. **Annals of Internal Medicine**, v. 86, n. 3, p. 319–322, 1977.

BHATTACHARYA, S.; ESQUIVEL, B. D.; WHITE, T. C. Overexpression or deletion of ergosterol biosynthesis genes alters doubling time, response to stress agents, and drug susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. **mBio**, v. 9, n. 4, 2018.

BONCAN, D. A. T. *et al.* Terpenes and Terpenoids in Plants: Interactions with Environment and Insects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 1–19, 2020.

BONDARYK, M.; KURZĄTKOWSKI, W.; STANISZEWSKA, M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. **Postepy dermatologii i alergologii**, v. 30, n. 5, p. 293–301, 2013.

BOUND, D. J.; MURTHY, P. S.; SRINIVAS, P. Synthesis and antibacterial properties of 2,3-dideoxyglucosides of terpene alcohols and phenols. **Food chemistry**, v. 185, p. 192–199, 2015.

BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, v. 253, n. 5016, p. 164–170, 1991.

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Dislipidemia : prevenção de eventos cardiovasculares e Pancreatite. Ministério da Saúde, Brasília, 2020.

BRILHANTE, R. S. N. *et al.* In vitro inhibitory activity of terpenic derivatives against clinical and environmental strains of the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 93–98, 2015.

BRILHANTE, R. S. N. *et al.* Terpinen-4-ol inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. **Future microbiology**, v. 14, n. 14, p. 1221–1233, 2019.

BUARQUE, C. D. *et al.* Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: Synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 6885–6891, 2011.

CABAÑES, F. J. Sporotrichosis in Brazil: Animals+humans=one health. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 37, n. 3–4, p. 73–74, 2020.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 425–430, 2007.

CAMPOY, S.; ADRIO, J.L. Antifungals. **Biochem Pharmacol.** v. 133, p. 86-96, 2017.

CHAKRABARTI, A. *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical mycology**, v. 53, n. 1, p. 3–14, 2015.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829–837, 2004.

Centers for Disease Control and Prevention. **Sporothrix brasiliensis. Fungal Diseases.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/port/sporotrichosis/brasiliensis.html>>. Acesso em: 6 dez. 2022.

DA ROSA, A. C. M. *et al.* Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 3 Pt 1, p. 451–459, 2005.

DAHLIN, J.L, NISSINK, J.W., STRASSER, J.M., FRANCIS, S., HIGGINS, L., ZHOU, H., ZHANG, Z., WALTERS, M.A. PAINS in the assay: chemical mechanisms of assay interference and promiscuous enzymatic inhibition observed during a sulfhydryl-scavenging HTS. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2091–2113, 2015.

DE LIMA BARROS, M. B.; DE ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A. O. Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633, 2011.

DE PAULA, J. R. *et al.* Sesquiterpenes, triterpenoids, limonoids and flavonoids of Cedrela odorata graft and speculations on the induced resistance against Hypsipyla grandella. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1449–1454, 1997.

DOAK, B. C. *et al.* Oral druggable space beyond the rule of 5: insights from drugs and clinical candidates. **Chemistry & biology**, v. 21, n. 9, p. 1115–1142, 2014.

DOS SANTOS, C. B. R. *et al.* Oil from the fruits of Pterodon emarginatus Vog.: A traditional anti-inflammatory. Study combining in vivo and in silico. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 107–120, 2018.

DOUGHERTY, D. A. The cation- π interaction. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 4, p. 885–893, 2013.

DUPONT, S. *et al.* Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? **Evolution; international journal of organic evolution**, v. 66, n. 9, p. 2961–2968, 2012.

ENOCH, S. J.; ELLISON, C. M.; SCHULTZ, T. W.; CRONIN, M. T. A review of the electrophilic reaction chemistry involved in covalent protein binding relevant to toxicity. **Crit Rev Toxicol**, v. 41, n. 9, p. 783-802, 2011.

FASCIO, M. *et al.* Diterpenoid furans from *Pterodon* species. **Phytochemistry**, v. 15, n. 1, p. 201–203, 1976.

FEHER, M.; SCHMIDT, J. M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 43, n. 1, p. 218–227, 2003.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Quím. nova esc.** v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FERDOUS, U. T.; BALIA YUSOF, Z. N. Insight into Potential Anticancer Activity of Algal Flavonoids: Current Status and Challenges. **Molecules**, v. 26, n. 22, 2021.

FILHO, R. B. *et al.* Flavonoids from Amazonian leguminosae. **Phytochemistry**, v. 12, n. 5, p. 1184–1186, 1973.

Flora e Funga do Brasil - *Diplotropis purpurea* (Rich.) Amshoff. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=&idsFilhosAlgas=&idsFilhosFungos=&lingua=&grupo=&familia=null&genero=&especie=&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=Diplotropis+purpurea&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&endemismo=TODOS&origem=TODOS®iao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao=TODOS&mostrarAte=SUBESP_VAR&opcoesBusca=TODOS_OS_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica>. Acesso em: 9 dez. 2022.

FRIESEN, J. A.; RODWELL, V. W. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. **Genome biology**, v. 5, n. 11, 2004.

GALCERAN, C. B. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic effects of 6 α ,7 β -dihydroxy-vouacapan-17 β -oic acid isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. *fruits*. **Inflammopharmacology 2011 19:3**, v. 19, n. 3, p. 139–143, 2011.

GALLILY, R.; YEKHTIN, Z.; HANUŠ, L. O. The Anti-Inflammatory Properties of Terpenoids from *Cannabis*. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 3, n. 1, p. 282, 2018.

GALLO, M. B. C. *et al.* New natural products from *Siphoneugena densiflora* Berg (Myrtaceae) and their chemotaxonomic significance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 279–288, 2006.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology** 2007 3:7, v. 3, n. 7, p. 408–414, 2007.

GLAAB, E. Building a virtual ligand screening pipeline using free software: a survey. **Briefings in bioinformatics**, v. 17, n. 2, p. 352–366, 2016.

GONZÁLEZ-BELLO, C. Designing Irreversible Inhibitors--Worth the Effort? **ChemMedChem**, v. 11, n. 1, p. 22-30, 2016.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 52, n. 1, p. 107–124, 2021.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006077, 2017.

GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor-ligand molecular docking. **Biophysical reviews**, v. 6, n. 1, p. 75–87, 2014.

GUEx, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, n. 15, p. 2714-2723, 1997

GUEx, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. **Electrophoresis**, v. 30, suppl. 1, p. S162-S173, 2009.

HAINES, B. E.; WIEST, O.; STAUFFACHER, C. V. The increasingly complex mechanism of HMG-CoA reductase. **Accounts of chemical research**, v. 46, n. 11, p. 2416–2426, 2013.

HAMEDUH, T. *et al.* Homology modeling in the time of collective and artificial intelligence. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 18, p. 3494–3506, 2020.

HE, Y. *et al.* Statins and Multiple Noncardiovascular Outcomes: Umbrella Review of Meta-analyses of Observational Studies and Randomized Controlled Trials. **Annals of internal medicine**, v. 169, n. 8, p. 543–553, 2018.

HEARD, S. C.; WU, G.; WINTER, J. M. Antifungal natural products. **Current opinion in biotechnology**, v. 69, p. 232–241, 2021.

HUH, J. W. *et al.* Maackiain, a compound derived from *Sophora flavescens*, increases IL-1 β production by amplifying nigericin-mediated inflammasome activation. **FEBS Open Bio**, v. 10, n. 8, p. 1482, 2020.

ISTVAN, E. S. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. **American Heart Journal**, v. 144, n. 6, p. S27–S32, 2002.

ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 292, n. 5519, p. 1160–1164, 2001.

JIA, C. Y. *et al.* A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 25, n. 1, p. 248–258, 2020.

KAR, S.; LESZCZYNSKI, J. Open access *in silico* tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. **Expert opinion on drug discovery**, v. 15, n. 12, p. 1473–1487, 1 dez. 2020.

KATSILA, T. *et al.* Computational approaches in target identification and drug discovery. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 14, p. 177, 2016.

KHAN, F. I. *et al.* Current updates on computer aided protein modeling and designing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 48–62, 2016.

KIM, T. *et al.* Therapeutic Potential of Volatile Terpenes and Terpenoids from Forests for Inflammatory Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, 2020.

KÖHLER, J. R. *et al.* Fungi that Infect Humans. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 3, 2017.

KONTOYIANNI, M. Docking and Virtual *Screening* in Drug Discovery. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1647, p. 255–266, 2017.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J Appl Cryst**, v. 26, p. 283-291, 1993.

LEE, H.; LEE, D. G. Novel Approaches for Efficient Antifungal Drug Action. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 1771–1781, 2018.

LEITE, A. C. *et al.* Limonoids from *Cipadessa fruticosa*. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences**, v. 60, n. 3, p. 351–355, 2005.

LEITE, A. C. *et al.* Trypanocidal activity of flavonoids and limonoids isolated from *Myrsinaceae* and *Meliaceae* active plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 01–06, 2010

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5937, p. 161–165, 2009.

LI, J.; FU, A.; ZHANG, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein-Ligand Interactions in Molecular *Docking*. **Interdisciplinary sciences, computational life sciences**, v. 11, n. 2, p. 320–328, 2019.

LIMA, Á. A. N.; KOESTER, L. S.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Formulating Bioactive Terpenes. **Biomolecules**, v. 11, n. 12, 2021.

LIMA, W. G. *et al.* Are the Statins promising antifungal agents against invasive candidiasis? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 270–281, 2019.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 4–17, 2012.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

LIU, J. F. *et al.* Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 2019 35:7, v. 35, n. 7, p. 1–8, 2019.

LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 2, p. 293–308, 2006.

LÓPEZ-ROMERO, E. *et al.* *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. **Future microbiology**, v. 6, n. 1, p. 85–102, 2011.

LOYSE, A. *et al.* Flucytosine and cryptococcosis: time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 11, p. 2435–2444, 2013.

LUTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, n. 6364, p. 83-85, 1992.

MAHIZAN, N. A. *et al.* Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. **Molecules**, v. 24, n. 14, 2019.

MARIO, D. A. N. *et al.* Interference of melanin in the susceptibility profile of *Sporothrix* species to amphotericin B. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 33, n. 1, p. 21–25, 2016.

MCWILLIAM, H.; LI, W.; ULUDAG, M.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; COWLEY, A. P.; LOPEZ, R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucl Acids Res**, v. 41, p. W597-W600, 2013.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **J Comput Chem**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular *docking*. **Methods Mol Biol**, v. 443, p. 365-382, 2008

MOTA FERNANDES, C. *et al.* The Future of Antifungal Drug Therapy: Novel Compounds and Targets. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 2, 2021.

MUHAMMED, M. T.; AKI-YALCIN, E. Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 93, n. 1, p. 12–20, 2019.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

ODDS, F. C. *et al.* Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, 2003.

OLIVEIRA, A. H. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 195, p. 266, 2017.

ONISHI, J. *et al.* Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 368–377, 2000.

OROFINO-COSTA, R. *et al.* Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 606–620, 2017.

PATRICK, G. L. An introduction to medicinal chemistry. **Oxford University Press**, 4^a Ed., 2009.

PFEFFERKON, J.A *et al.* Design and synthesis of hepatoselective, pyrrole-based HMG-CoA reductase inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 16, p. 4538–4544, 2007.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015.

QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e367–e377, 2017.

RABELLO, V. B. S. *et al.* The Historical Burden of Sporotrichosis in Brazil: a Systematic Review of Cases Reported from 1907 to 2020. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 53, n. 1, p. 231–244, 2022.

RATHER, I. A.; WAGAY, S. A.; ALI, R. Emergence of anion- π interactions: The land of opportunity in supramolecular chemistry and beyond. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 415, p. 213327, 2020.

RECANATINI, M. *et al.* QT prolongation through hERG K⁺ channel blockade: Current knowledge and strategies for the early prediction during drug development. **Medicinal Research Reviews**, v. 25, n. 2, p. 133–166, 2005.

RIOS, M. E. *et al.* Zoonotic Sporotrichosis Related to Cat Contact: First Case Report from Panama in Central America. *Cureus*, v. 10, n. 7, 2018

ROBBINS, N. *et al.* Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiol Spectr.** v. 4, n. 5, p. , 2016

RODRIGUES, A. M. *et al.* Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 219, 2014.

RODRIGUES, A. M. *et al.* The threat of emerging and re-emerging pathogenic Sporothrix species. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, p. 813–842, 2020.

RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 2, p. e0007964, 2020.

RODRIGUES, R. P. *et al.* Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739–776, 2012.

ROSSOW, J. A. *et al.* A One Health Approach to Combatting Sporothrix brasiliensis: Narrative Review of an Emerging Zoonotic Fungal Pathogen in South America. **Journal of Fungi 2020, Vol. 6, Page 247**, v. 6, n. 4, p. 247, 2020.

SANTOS, U. S. T.; FUNDAÇÃO ESTATAL SAÚDE DA FAMÍLIA. SALVADOR, B. B. / F. O. CRUZ. I. G. MONIZ. S. BA. BRASIL. Perfil Epidemiológico da Esporotricose no Município de Camaçari, Estado da Bahia, Brasil. 2017.

SARRIA, A. L. F. *et al.* Effect of triterpenoids and limonoids isolated from *Cabralea canjerana* and *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 66 C, n. 5–6, p. 245–250, 2011.

SCHAMES, J. R. *et al.* Discovery of a novel binding trench in HIV integrase. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 8, p. 1879–1881, 2004.

SCHOTTEL, B. L.; CHIFOTIDES, H. T.; DUNBAR, K. R. Anion- π interactions. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 1, p. 68–83, 2007.

SELVAM, C. *et al.* Pterocarpan scaffold: A natural lead molecule with diverse pharmacological properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 128, p. 219–236, 2017.

SEYEDMOUSAVI, S. *et al.* Neglected fungal zoonoses: Hidden threats to man and animals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 5, p. 416–425, 2015.

SHAMOVSKY, I. *et al.* Overcoming undesirable hERG potency of chemokine receptor antagonists using baseline lipophilicity relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1162–1178, 2008.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol Syst Biol**, v. 7, p. 1–6, 2011.

SIPPL, M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins**, v. 17, n. 4, p. 355–362, 1993.

SIRTORI, C. R. Pharmacology and mechanism of action of the new HMG-CoA reductase inhibitors. **Pharmacological research**, v. 22, n. 5, p. 555–563, 1990.

SIRTORI, C. R. The pharmacology of statins. **Pharmacological research**, v. 88, p. 3–11, 2014.

SLIWOSKI, G. *et al.* Computational methods in drug discovery. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 1, p. 334–395, 2013.

STEVENSON, P. C.; TURNER, H. C.; HAWARE, M. P. Phytoalexin accumulation in the roots of chickpea (*Cicer arietinum*L.) seedlings associated with resistance to fusarium wilt (*Fusarium oxysporum*f.sp.ciceri). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 50, n. 3, p. 167–178, 1997.

SUAY-GARCÍA, B. *et al.* Virtual Combinatorial Chemistry and Pharmacological Screening: A Short Guide to Drug Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, 2022.

SUETH-SANTIAGO, V. *et al.* CYP51: Uma Boa Ideia? **Rev. Virtual Quim.** v.7, n.2, p. 539-575, 2015.

SUNSERI, J.; KOES, D. R. Pharmit: interactive exploration of chemical space. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. W1, p. W442-W448, 2016.

TALELE, T.; KHEDKAR, S.; RIGBY, A. Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 10, n. 1, p. 127–141, 2010.

TAMEZ-CASTRELLÓN, A. K. *et al.* Virulence Factors in *Sporothrix schenckii*, One of the Causative Agents of Sporotrichosis. **Current Protein & Peptide Science**, v. 21, n. 3, p. 295–312, 2019.

TAVAKKOLI, A.; JOHNSTON, T. P.; SAHEBKAR, A. Antifungal effects of statins. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 208, p. 107483, 2020.

THOMA, R.; SCHULZ-GASCH, T.; D'ARCY, B.; BENZ, J.; AEBI, J.; DEHMLow, H.; HENNIG, M.; STIHLE, M.; RUF, A. Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase. **Nature**, v. 432, n. 7013, p. 118-122, 2004.

Thomas Sander, Actelion Pharmaceuticals Ltd, Suíça, 2016. Disponível em: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>

TIAN, S. *et al.* The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research. **Advanced drug delivery reviews**, v. 86, p.2–10, 2015.

TORRES, P. H. M. *et al.* Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p.4574, 2019.

ULLAH, A. *et al.* Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. **Molecules**, v. 25, n. 22, p.5243, 2020.

UNITED KINGDOM. International Council for Harmonisation. ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. 2013. disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-s2-r1-genotoxicity-testing-data-interpretation-pharmaceuticals-intended-human-use-step_en.pdf

VALLABHANENI, S. *et al.* The Global Burden of Fungal Diseases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 1–11, 2016.

VALLI, M. *et al.* Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 439–444, 2013.

VÁZQUEZ, J. *et al.* Merging Ligand-Based and Structure-Based Methods in Drug Discovery: An Overview of Combined Virtual Screening Approaches. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 20, P. 4723, 2020.

Vista da Esporotricose brasileira: desdobramentos de uma epidemia negligenciada. Disponível em: <<https://periodicos.ufjf.br/index.php/aps/article/view/16496/20794>>. Acesso em: 6 dez. 2022.

WALLER, S. B. *et al.* Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 73, 2021.

WALLER, S. B. *et al.* *Polar vulgare* (Lamiaceae) extracts with antifungal potential against *Origanum* *Sporothrix brasiliensis*. **Medical mycology**, v. 56, n. 2, p. 225–233, 2018.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucl Acids Res**, v. 35, p. W407-410, 2007.

X., F.; Y. T., D.; X. J., H. The Advances in the Limonoid Chemistry of the Meliaceae Family. **Current Organic Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 1363–1391, 2011.

YANG, H. *et al.* ADMETopt: A Web Server for ADMET Optimization in Drug Design via Scaffold Hopping. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 58, n. 10, p.2051–2056, 2018.

YANG, H. *et al.* admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 35, n. 6, p. 1067–1069, 2019.

YANG, S. K. *et al.* Antimicrobial activity and mode of action of terpene linalyl anthranilate against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 11, n. 2, p. 210–219, 2021.