



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



TAYNARA GOMES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE INIBIDORES DA CRUZAÍNA E AVALIAÇÃO
DA SUA INFLUÊNCIA NO *DOCKING***

Ouro Preto – MG
2026

TAYNARA GOMES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE INIBIDORES DA CRUZAÍNA E AVALIAÇÃO
DA SUA INFLUÊNCIA NO *DOCKING***

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Saulo Fehelberg Pinto Braga.

**Ouro Preto – MG
2026**

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S237c Santos, Taynara Gomes dos.

Caracterização in silico de inibidores da cruzaina e avaliação da sua influência no docking. [manuscrito] / Taynara Gomes dos Santos. - 2026. 95 f.: il.: color., gráf., tab., mapa.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Química farmacêutica. 2. Desenho de Fármacos. 3. Simulação de Acoplamento Molecular. 4. Trypanosoma cruzi. 5. Cisteína Proteases. I. Braga, Saulo Fehelberg Pinto. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 615.45

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - CRB6/2322



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Taynara Gomes dos Santos

Caracterização *in silico* de inibidores da cruzaina e avaliação da sua influência no *docking*

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia

Aprovada em 11 de fevereiro de 2026

Membros da banca

Prof. Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Profa. Dra. Izinara Rosse da Cruz - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Ms. Augusto Vieira Pontes Silva - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Prof. Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 25/02/2026



Documento assinado eletronicamente por **Saulo Fehelberg Pinto Braga, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 25/02/2026, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1065090** e o código CRC **1840E0EF**.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Adilson e Adriana, e à minha irmã, por todo o incentivo ao longo da minha trajetória acadêmica, pela confiança depositada em mim desde antes de ingressar na graduação, e por toda a força, companheirismo, carinho e amor nessa caminhada árdua. Por não terem soltado minha mão, mesmo nos momentos em que eu já não acreditava.

Ao meu irmão de quatro patas, Pipoca, por ser meu suporte emocional e exemplo de amor incondicional. Estive ao meu lado nos momentos de choro e de alegria; nada parecia impossível de superar quando tive sua companhia.

Ao meu companheiro Lucas, pelo amor, apoio nos momentos difíceis e presença nos momentos felizes, por ter sido suporte nas dúvidas e desafios, e por me inspirar profissional e pessoalmente.

Aos meus amigos da UFOP e do curso de Farmácia, pela parceria, aprendizados, risadas e apoio. Sem vocês, essa jornada teria sido muito mais difícil.

Ao meu professor orientador, Saulo Fehelberg, por todo o apoio, paciência e ensinamentos.

À UFOP e à Escola de Farmácia, bem como aos seus professores, pela educação superior pública, gratuita e de qualidade.

“Não tenho certeza de nada, mas a visão das estrelas me faz sonhar”

- Vincent van Gogh

RESUMO

A cruzaina, principal cisteíno-protease do *Trypanosoma cruzi*, constitui um alvo molecular estratégico para o desenvolvimento de novos fármacos contra a doença de Chagas, uma doença tropical negligenciada com opções terapêuticas limitadas e associadas a efeitos adversos significativos. Este trabalho teve como objetivo caracterizar, por meio de abordagens *in silico*, inibidores da cruzaina descritos na literatura e avaliar a influência de suas propriedades físico-químicas no desempenho em *docking* molecular, buscando compreender como características estruturais podem impactar a triagem virtual e o planejamento racional de novos candidatos. Foram obtidos 33.189 compostos a partir do banco de dados ChEMBL, utilizando o termo “cruzipain”, sendo selecionados 29.413 inibidores com atividade experimental ($IC_{50} \leq 100 \mu M$) após etapas de curadoria estrutural. Os compostos foram classificados, por meio de filtros SMARTS, em inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis não covalentes. Foram calculados descritores como peso molecular, logP, número de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, área de superfície polar topológica (TPSA) e número de ligações rotacionáveis. Adicionalmente foi realizada uma análise de *scaffolds*. O *docking* molecular foi realizado no programa GOLD, utilizando a estrutura cristalográfica 3KKU e a função de pontuação ChemPLP. Observou-se predominância de inibidores reversíveis (~72%), seguidos por covalentes irreversíveis (~16%) e covalentes reversíveis (~12%). A maioria dos compostos apresentou perfil compatível com as regras de Lipinski e Veber, embora os covalentes irreversíveis tenham exibido maior frequência de violações associadas ao peso molecular e à TPSA. Os resultados indicaram diferenças estatísticas entre as classes quanto à pontuação de *docking*, com maiores valores médios para os covalentes irreversíveis. Verificou-se correlação positiva moderada entre o score e descritores estruturais como peso molecular e número de ligações rotacionáveis, evidenciando a influência do tamanho e da flexibilidade molecular no desempenho computacional. Esses achados fornecem subsídios relevantes para a seleção e otimização racional de inibidores da cruzaina, além de evidenciar possíveis vieses estruturais que podem influenciar resultados de triagem virtual. Dessa forma, o estudo contribui para o uso crítico de ferramentas de modelagem molecular no planejamento de novos candidatos a fármacos para a doença de Chagas.

Palavras-chave: cruzaina; *docking* molecular; inibidores; modelagem molecular; *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Cruzain, the main cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*, represents a strategic molecular target for the development of new drugs against Chagas disease, a neglected tropical disease with limited therapeutic options and significant adverse effects associated with current treatments. This study aimed to characterize, through in silico approaches, cruzain inhibitors described in the literature and to evaluate the influence of their physicochemical properties on molecular docking performance, seeking to understand how structural features may impact virtual screening and rational drug design strategies. A total of 33,189 compounds were retrieved from the ChEMBL database using the term “cruzipain,” and 29,413 inhibitors with experimentally determined activity ($IC_{50} \leq 100 \mu M$) were selected after structural curation procedures. Compounds were classified using SMARTS filters into irreversible covalent, reversible covalent, and non-covalent reversible inhibitors. Relevant descriptors were calculated, including molecular weight, logP, number of hydrogen bond donors and acceptors, topological polar surface area (TPSA), and number of rotatable bonds. In addition, a scaffold analysis was performed. Molecular docking was performed using GOLD software with the 3KKU crystal structure and the ChemPLP scoring function. Reversible inhibitors predominated (~72%), followed by irreversible covalent (~16%) and reversible covalent inhibitors (~12%). Most compounds exhibited profiles consistent with Lipinski's and Veber's rules, although irreversible covalent inhibitors showed a higher frequency of violations related to molecular weight and TPSA. Statistically significant differences were observed among classes regarding docking scores, with higher mean values for irreversible covalent inhibitors. A moderate positive correlation was identified between docking scores and structural descriptors such as molecular weight and number of rotatable bonds, highlighting the influence of molecular size and flexibility on computational performance. These findings provide pharmacologically relevant insights for the rational selection and optimization of cruzain inhibitors and reveal potential structural biases that may influence virtual screening outcomes. Thus, this study supports the critical application of molecular modeling tools in the early stages of drug discovery for Chagas disease.

Keywords: cruzain; molecular *docking*; inhibitors; molecular modeling; *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos casos da doença de Chagas no mundo, 2018.....	18
Figura 2 - Transmissão vetorial da doença de Chagas.	19
Figura 3 - Sinal de Romaña e chagoma de inoculação cutâneo	21
Figura 4 - Estrutura química do Benznidazol (a) e do Nifurtimox (b)	22
Figura 5 - Estrutura cristalográfica da cruzaina complexada com um inibidor (3KKU).....	25
Figura 6 - Superfície da cruzaina destacando os subsítios do sítio catalítico (S1, S2, S3 e S1').....	26
Figura 7 - Mecanismo de hidrólise da cisteína protease proposto por Mehrtens (2007).	27
Figura 8 - Histórico dos inibidores covalentes. Os grupos químicos reativos ou “warheads”.....	28
Figura 9 - Distribuição total dos compostos de acordo com o tipo de inibição.	40
Figura 10 - Mecanismo de inibição covalente reversível de cisteína-proteases por inibidor nitrílico, evidenciando a formação de um aduto reversível entre o grupo nitrila e o resíduo catalítico Cys25, mediado pelo par catalítico Cys25–His162.	43
Figura 11 - Mecanismo de inibição covalente irreversível de cisteína-proteases por aceptores de Michael, destacando o ataque nucleofílico do tiol da Cys25 ao carbono β da dupla ligação α,β -insaturada e a formação de um aduto estável	43
Figura 12 - Percentual de violações por regra específica e por tipo de inibição.....	46
Figura 13 - Distribuição percentual de moléculas por número de violações às regras de Lipinski e Veber	47
Figura 14 - Distribuição dos valores de Peso Molecular (PM) dos inibidores, apresentada por histogramas normalizados sobrepostos por curvas de densidade kernel, estratificados por tipo de inibição. Inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis são representados em vermelho, verde e azul, respectivamente. Linhas verticais tracejadas indicam a média de cada grupo, enquanto linhas verticais pontilhadas indicam a mediana. A linha vertical pontilhada preta representa o valor limite adotado para o Peso Molecular de acordo com a regra de Lipinski considerada. Para fins de visualização, os gráficos foram limitados à faixa entre os quantis de 1% e 99% dos valores observados.....	48
Figura 15 - Distribuição do número de aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) dos inibidores, representada por histogramas normalizados e estratificados por tipo de inibição. Inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis são indicados em vermelho, verde e azul, respectivamente. Linhas verticais tracejadas correspondem às médias de cada grupo, enquanto linhas verticais pontilhadas indicam as medianas. A linha vertical tracejada preta indica o valor limite adotado	

para HBD conforme a regra de Lipinski considerada. Por questões de clareza visual, os gráficos foram limitados a valores de até 15 aceptores de ligação de hidrogênio.....	51
Figura 16 - Distribuição do número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD) dos inibidores, representada por histogramas normalizados e estratificados por tipo de inibição. Inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis são indicados em vermelho, verde e azul, respectivamente. Linhas verticais tracejadas correspondem às médias de cada grupo, enquanto linhas verticais pontilhadas indicam as medianas. A linha vertical tracejada preta indica o valor limite adotado para HBD conforme a regra de Lipinski considerada.	54
Figura 17 - Distribuição dos valores de Área de Superfície Polar (TPSA) dos inibidores, apresentada por histogramas normalizados sobrepostos por curvas de densidade kernel, estratificados por tipo de inibição. Inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis são representados em vermelho, verde e azul, respectivamente. Linhas verticais tracejadas indicam a média de cada grupo, enquanto linhas verticais pontilhadas indicam a mediana. A linha vertical pontilhada preta representa o valor limite adotado para a TPSA de acordo com a regra de Lipinski considerada. Para fins de visualização, os gráficos foram limitados à faixa entre os quantis de 1% e 99% dos valores observados.....	57
Figura 18 - Distribuição do número de ligações rotacionáveis dos inibidores, representada por histogramas normalizados e estratificados por tipo de inibição. Inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis são indicados em vermelho, verde e azul, respectivamente. Linhas verticais tracejadas correspondem às médias de cada grupo, enquanto linhas verticais pontilhadas indicam as medianas. A linha vertical tracejada preta indica o valor limite adotado conforme a regra de Veber. Por questões de clareza visual, os gráficos foram limitados a valores de até 18 ligações rotacionáveis.	60
Figura 19 - Distribuição dos valores de LogP dos inibidores, apresentada por histogramas normalizados sobrepostos por curvas de densidade kernel, estratificados por tipo de inibição. Inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis são representados em vermelho, verde e azul, respectivamente. Linhas verticais tracejadas indicam a média de cada grupo, enquanto linhas verticais pontilhadas indicam a mediana. A linha vertical pontilhada preta representa o valor limite adotado para LogP de acordo com a regra de Lipinski considerada. Para fins de visualização, os gráficos foram limitados à faixa entre os quantis de 1% e 99% dos valores observados.....	62
Figura 20 - Gráfico de densidade representando a distribuição de ChemPLP score para os três tipos de inibição	65
Figura 21 - Médias dos valores de pontuação de <i>docking</i> dos inibidores, estratificadas por tipo de inibição, acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança de 95% calculados segundo o critério de Welch.	

Inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis são indicados em vermelho, verde e azul, respectivamente.	67
Figura 22 - Mapa de calor das correlações de Pearson entre a pontuação de <i>docking</i> (Gold.PLP.Fitness) e descritores moleculares selecionados. Correlações positivas aparecem em azul; negativas, em vermelho; intensidade proporcional ao coeficiente.....	69
Figura 23 - Relação entre o Peso Molecular e score de <i>docking</i> para os três tipos de inibição.	72
Figura 24 - Relação entre Peso molecular e score do <i>docking</i> para as três classes de inibidores. Em vermelho os covalentes irreversíveis, em verde os covalentes reversíveis e em azul os covalentes reversíveis.....	73
Figura 25 - Padrões estruturais mais frequentes obtidos pela análise de scaffolds.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos inibidores da enzima cruzaína	41
Tabela 2 - Frequência e percentual de violações por regra específica e por tipo de inibição.	45
Tabela 3 - Parâmetros estatísticos da distribuição do Peso Molecular por tipo de inibição.	49
Tabela 4 - Parâmetros estatísticos da distribuição de Aceptores de Hidrogênio por tipo de inibição.....	51
Tabela 5 - Parâmetros estatísticos da distribuição de Doadores de Hidrogênio por tipo de inibição.....	54
Tabela 6 - Parâmetros estatísticos da distribuição de TPSA por tipo de inibição.....	57
Tabela 7 - Parâmetros estatísticos da distribuição de Ligações Rotacionáveis por tipo de inibição.....	60
Tabela 8 - Parâmetros estatísticos da distribuição de LogP por tipo de inibição.....	63
Tabela 9 - Parâmetros estatísticos da distribuição de ChemPLP score por tipo de inibição.	65
Tabela 10 - Comparações múltiplas dos valores de pontuação obtido no docking entre os diferentes grupos de inibidores. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de Welch, seguida de teste post hoc de Games-Howell, com intervalos de confiança de 95%.....	67
Tabela 11 - Correlação entre as propriedades analisadas em relação às três classes de inibidores.	70
 Tabela A 1 - Grupos funcionais associados à inibição covalente reversível da cruzaína.....	 87
Tabela B 1 - Grupos funcionais associados à inibição covalente reversível da cruzaína.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH – Aceptores de hidrogênio

Asn – Asparagina

CCC – Cardiomiopatia chagásica crônica

CCDC – Cambridge Crystallographic Data Centre

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

ChemPLP – Chemical Piecewise Linear Potential (função de pontuação do GOLD)

IC₅₀ – Concentração inibitória média

Cys – Cisteína

DC – Doença de Chagas

DEFAR – Departamento de Farmácia

DTNs – Doenças Tropicais Negligenciadas

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Gln – Glutamina

GOLD – Genetic Optimization for Ligand Docking

HAI – Hemaglutinação Indireta

HBA – Hydrogen Bond Acceptors (Aceptores de ligação de hidrogênio)

HBD – Hydrogen Bond Donors (Doadores de ligação de hidrogênio)

HDI – High Density Interval (Intervalo de Maior Densidade)

His – Histidina

LogP – Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água

OMS – Organização Mundial da Saúde

P&D – Pesquisa e Desenvolvimento

PDB – Protein Data Bank

PM – Peso Molecular

RMSD – Root Mean Square Deviation (Desvio quadrático médio)

SMARTS – SMiles ARbitrary Target Specification

TPSA – Topological Polar Surface Area (Área de Superfície Polar Topológica)

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivos Específicos	31
3	METODOLOGIA.....	32
3.1	seleção E CARACTERIZAÇÃO de inibidores da cruzaína.....	32
3.2	classificação e Análise dos INIBIDORES.....	32
3.3	DOCKING.....	35
3.3.1	Preparo dos ligantes para o <i>docking</i>	35
3.3.2	Obtenção e preparo da estrutura tridimensional da cruzaína	36
3.3.3	<i>Docking</i> molecular	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Obtenção e preparo da estrutura cristalográfica da cruzaína.....	38
4.2	Seleção de inibidores da cruzaína com atividade determinada experimentalmente	38
4.3	Análise da caracterização química e das propriedades físico-químicas das moléculas obtidas.....	44
4.3.1	Peso molecular	47
4.3.2	Aceptores de ligação de hidrogênio.....	50
4.3.3	Doadores de ligação de hidrogênio	53
4.3.4	Área de superfície polar	55
4.3.5	Ligações Rotacionáveis.....	59
4.3.6	LogP	61
4.4	análise da relação entre parâmetros físico-químicos e desempenho no docking.....	64
4.4.1	Correlação entre propriedades físico-químicas e pontuação do <i>Docking</i>	68
4.4.2	Correlação entre Peso Molecular e Pontuação de <i>Docking</i> Molecular ..	72
4.5	perfil estrutural dos compostos (análise de scaffolds).....	74
5	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS BIOGRÁFICAS.....	79
	ANEXO A - GRUPOS FUNCIONAIS ASSOCIADOS À INIBIÇÃO COVALENTE IRREVERSÍVEL DA CRUZAÍNA.....	87
	ANEXO B - GRUPOS FUNCIONAIS ASSOCIADOS À INIBIÇÃO COVALENTE REVERSÍVEL DA CRUZAÍNA	91

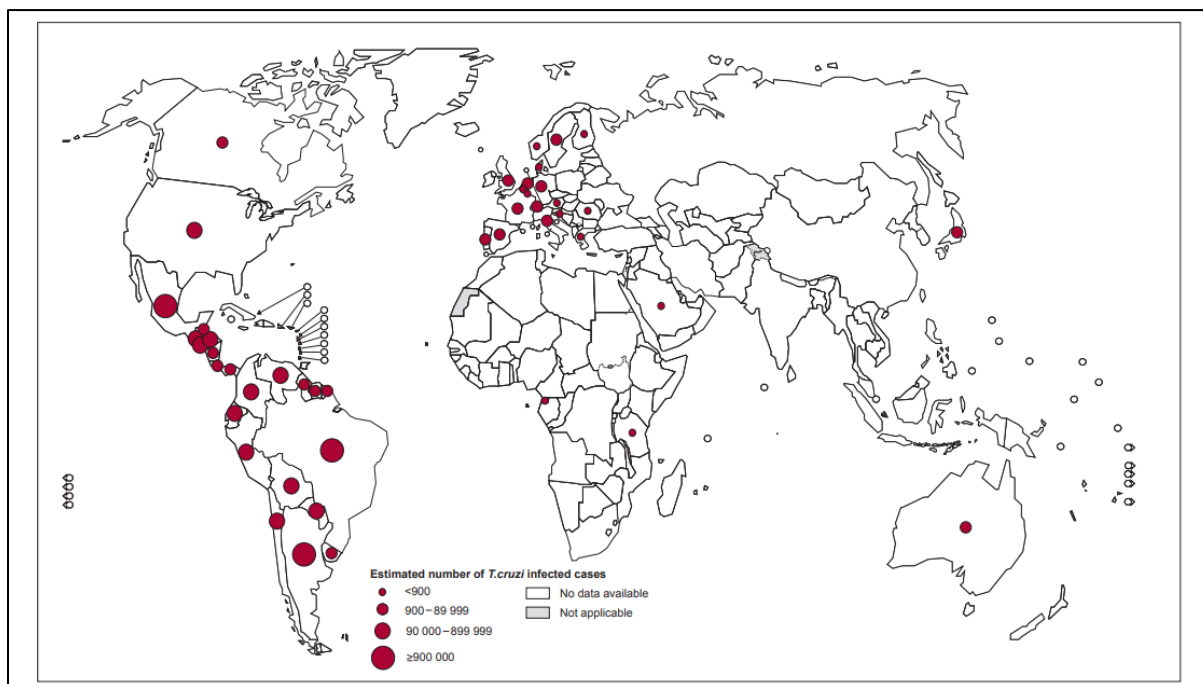
1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) se enquadra nas chamadas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), que engloba doenças prevalentes em regiões tropicais e subtropicais, principalmente em países em desenvolvimento. Essas doenças afetam, sobretudo, populações em situação de vulnerabilidade social e econômica, que enfrentam dificuldades no acesso aos serviços de saúde, além de viverem em condições precárias, sem saneamento básico adequado e acesso à água potável. As causas das DTNs são diversas, podendo ser provocadas por vírus, bactérias, parasitas, entre outros agentes patogênicos (OMS, 2024). Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece 21 doenças como DTNs, incluindo além da doença de Chagas (tripanossomíase americana), a raiva, tracoma, leishmaniose, filariose linfática, oncocercose, esquistossomose e helmintíases transmitidas pelo solo e pela água (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

O termo negligenciada refere-se ao baixo interesse das indústrias farmacêuticas em investir em pesquisas para o desenvolvimento de tratamentos ou cura dessas doenças. Isso está diretamente relacionado à lógica de mercado que rege o setor, pois como são doenças que afetam majoritariamente populações pobres, torna o investimento em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) pouco atrativos. De acordo com Aerts *et al.* (2017), a combinação entre baixo retorno financeiro, altos custos de pesquisa, riscos regulatórios e a ausência de incentivos sólidos por parte do Estado explica a escassez de inovação voltada para essas enfermidades. Como resultado, muitas DTNs permanecem com tratamentos obsoletos, tóxicos ou ineficazes, mesmo décadas após sua identificação.

Segundo estimativas da OMS, a doença de Chagas afeta entre 6 a 7 milhões de pessoas a nível mundial, mas com predominância na América Latina. Os casos da doença humana se predominam no Hemisfério Ocidental, com ampla distribuição em zonas rurais do México, da América Central e América do Sul (Figura 1). Entretanto, devido a globalização e oportunidade de mobilidade populacional, o padrão epidemiológico na última década mudou. Assim foram detectados casos no Canadá, Estados Unidos da América, países europeus e africanos, bem como no Mediterrâneo Oriental e do Pacífico Ocidental.

Figura 1 - Distribuição dos casos da doença de Chagas no mundo, 2018.

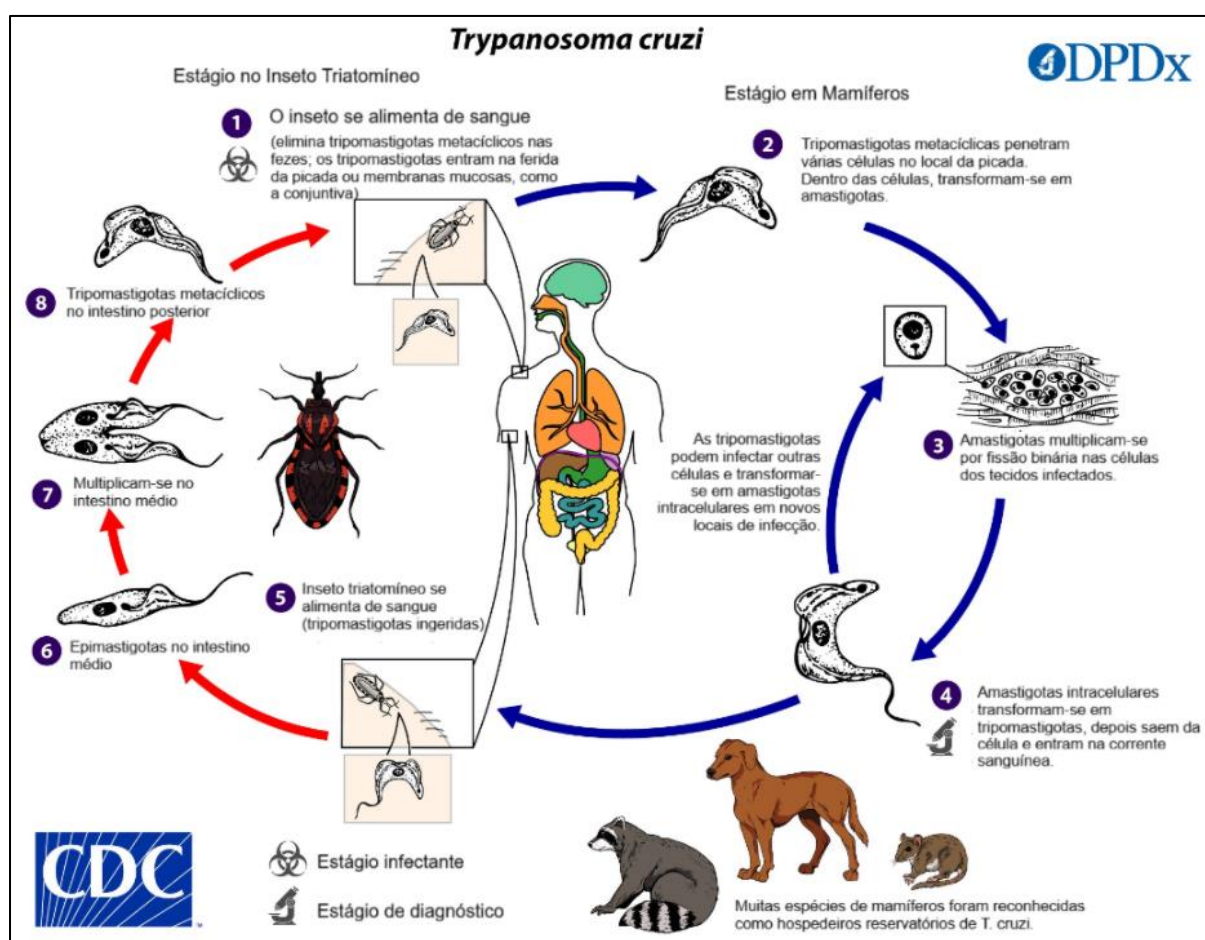


Fonte: World Health Organization Map Production - Control of Neglected Tropical Diseases (NTD), 2018. Traduzido pela Autora.

A DC, uma das principais DTNs, recebeu este nome em homenagem ao médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas, que em 1909 foi o primeiro a descrever o agente etiológico, o vetor, o ciclo do parasita e as manifestações clínicas da enfermidade (Echeverria; Morillo, 2019). O agente causador é o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Ele possui um ciclo de vida complexo, com múltiplas formas morfológicas que se alternam entre um hospedeiro vertebrado e um invertebrado vetor. No ambiente intracelular, o parasita se apresenta na forma amastigota, responsável pela replicação no citoplasma das células infectadas. Já no sangue, circula como tripomastigota, forma infecciosa capaz de invadir novas células e perpetuar a infecção. A forma mais comum de transmissão ocorre por meio da picada de insetos triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiros. Esses insetos hematófagos, ao se alimentarem do sangue do hospedeiro, defecam nas proximidades da lesão, liberando as formas tripomastigotas metacíclicas do parasita. A infecção geralmente ocorre pela fricção involuntária das fezes na pele ou em mucosas.

O ciclo de vida do *T. cruzi* no vetor inicia-se quando o barbeiro se alimenta do sangue de um hospedeiro infectado, ingerindo formas tripomastigotas (Figura 2). No intestino médio do inseto, os parasitas se diferenciam em epimastigotas, forma replicativa do protozoário. Estas se transformam em tripomastigotas metacíclicas no reto do inseto e são eliminadas com as fezes durante a alimentação em um novo hospedeiro. No organismo do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos penetram células fagocíticas, como os macrófagos, e se transformam em amastigotas. Após a replicação intracelular, novas formas tripomastigotas são liberadas na corrente sanguínea, perpetuando o ciclo infeccioso (CDC, 2021).

Figura 2 - Transmissão vetorial da doença de Chagas.



Fonte: Imagem adaptada do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), 2021

Além da via vetorial, outras formas de transmissão incluem a congênita (vertical), transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos e ingestão de alimentos contaminados (Henao-Martínez; Colborn; Parra-Henao, 2016).

A curso da doença apresenta duas fases clínicas distintas. A fase aguda é caracterizada por manifestações inespecíficas, como febre, mal-estar e inflamação no local da picada. Já a fase crônica pode persistir por anos ou décadas, afetando principalmente o coração e o trato gastrointestinal. As manifestações cardíacas, especialmente a miocardiopatia chagásica, são as mais prevalentes e representam a principal causa de mortalidade associada à doença (Echeverria; Morillo, 2019).

Os sintomas da DC são característicos e variam com a fase da doença, sendo aguda ou crônica. O período inicial - fase aguda - inclui febre, anorexia, cefaleia, prostração, mialgia e vômitos, ou seja, são sintomas inespecíficos, podendo ser confundidos com aqueles de doenças virais. Estas manifestações clínicas se iniciam entre oito e dez dias após introdução do parasita no organismo e pode se estender por até três meses, entretanto alguns pacientes podem apresentar um sinal característico da picada do inseto barbeiro, conhecidos como chagomas ou sinal de Romaña (Nunes et. al 2024) (Figura 3). A presença de parasitas na corrente sanguínea pode confirmar o diagnóstico. Segundo Vallejo et al., (2020) a fase crônica da DC pode persistir por mais de 40 anos, sendo caracterizada como indeterminada, pois o único indicativo de infecção é uma resposta imune expressiva de anticorpos anti-T. cruzi. Durante essa fase, de 100 infectados, 30 desenvolvem alterações cardiovasculares e digestivas. A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é uma das principais causas de mortalidade (Nunes et al., 2024) da fase crônica sendo caracterizada por insuficiência cardíaca afetando o ritmo e a condução de batimentos. Considerando que estes sinais clínicos não são específicos, o rastreamento e tratamento precoce é raro de ocorrer, sendo assim, a doença evolui para a forma crônica, que pode levar o infectado à morte (Durães-Oliveira et al., 2024), sendo que a cardiomiopatia é a que apresenta maior número de mortalidade (Nunes et. al 2024).

Figura 3 - Sinal de Romaña e chagoma de inoculação cutâneo

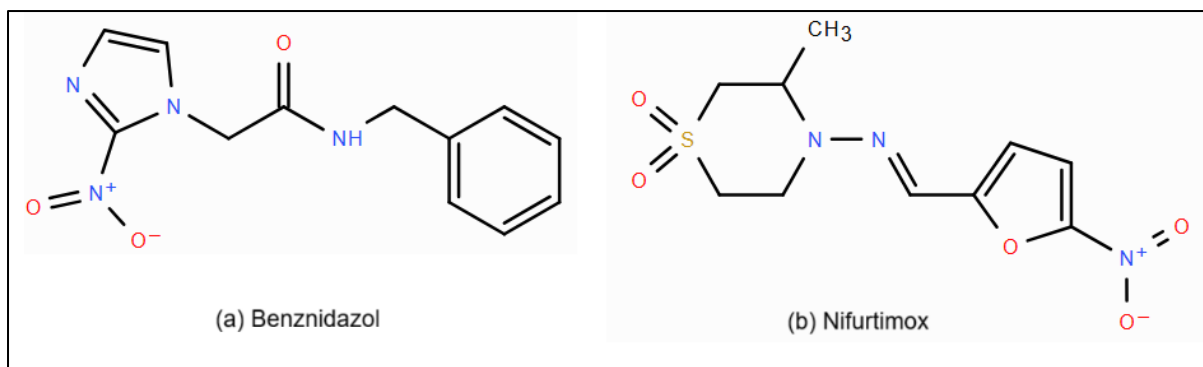


Fonte: Dias et al., 2015

O diagnóstico deve seguir protocolos pré-definidos que variam conforme a fase da infecção que incluem exames parasitológicos e sorológicos. Para a fase aguda, o exame parasitológico é o mais indicado para identificar as formas tripomastigotas através do exame direto do sangue periférico. Já os exames sorológicos são realizados quando a microscopia tiver resultados negativos, sem excluir a possibilidade da infecção pelo triatomíneo. Esse exame consiste na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM no sangue periférico. Para a fase crônica, o principal método diagnóstico é o exame sorológico, devido à presença de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG. Entre os testes disponíveis, o mais indicado é o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), por apresentar alta sensibilidade. Para complementar o diagnóstico, recomenda-se a realização de um teste com elevada especificidade, como a hemaglutinação indireta (HAI) (Monteiro *et al.*, 2016).

Ainda hoje, os únicos medicamentos disponíveis no Brasil para o tratamento etiológico da doença de Chagas são o benznidazol e, em casos de intolerância a este, o nifurtimox (Figura 4), ambos distribuídos pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2023). A eficácia desses nitro-heterocíclicos é consideravelmente maior quando o tratamento é instituído na fase aguda da infecção, alcançando taxas próximas a 80%. No entanto, na fase crônica, sobretudo na forma tardia, a resposta terapêutica torna-se limitada, uma vez que as formas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* são menos susceptíveis à ação dos fármacos em comparação com as formas extracelulares predominantes na fase aguda (Coura et al., 1997; Winters; Nguyen; Waseem, 2025).

Figura 4 - Estrutura química do Benznidazol (a) e do Nifurtimox (b)



Fonte: ChEMBL, 2025.

O mecanismo de ação desses fármacos está diretamente relacionado à presença do grupo nitro em suas estruturas. Tanto o benznidazol quanto o nifurtimox atuam como pró-fármacos, cuja atividade depende da bioativação redutiva catalisada por nitroredutases do *Trypanosoma cruzi*. A redução do grupo nitro leva à formação de intermediários reativos, incluindo espécies reativas e derivados nitroso e hidroxilamina, capazes de interagir com macromoléculas celulares. Esses metabólitos promovem danos ao DNA, modificações proteicas e aumento do estresse oxidativo intracelular, comprometendo a viabilidade do parasita. Contudo, a geração de espécies reativas não é completamente seletiva, podendo também afetar células do hospedeiro, o que contribui para o perfil de toxicidade observado clinicamente (Boiani *et al.*, 2010; Kratz *et al.*, 2018; Melo, 2024).

Considerando a dificuldade de diagnóstico devido aos sintomas inespecíficos e, em muitos casos, assintomáticos, o início precoce do tratamento permanece um desafio significativo (Ferreira; Velloso, 2022). Além disso, tanto o benznidazol quanto o nifurtimox apresentam alta toxicidade, razão pela qual recomenda-se acompanhamento clínico e laboratorial rigoroso durante toda a terapia (Olivera; Fory; Olivera, 2017). Os efeitos adversos associados a esses fármacos constituem um grande obstáculo ao tratamento da doença de Chagas, frequentemente levando à redução de dose ou até mesmo à interrupção terapêutica. Durante o uso clínico, têm sido relatados efeitos indesejáveis importantes para ambos os medicamentos, incluindo anorexia e perda de peso, náuseas, vômitos, excitação nervosa, insônia, alterações psíquicas, convulsões, vertigem, desorientação, adinamia, parestesias e intolerância ao álcool (A Castro; Demecca; Bartel, 2006).

Considerando o panorama apresentado para a doença e, principalmente, sua maior prevalência em regiões em desenvolvimento, atingindo pessoas com pouco ou nenhum acesso à saúde de qualidade, a busca por novos tratamentos e moléculas utilizando metodologias de baixo custo se faz necessário.

Uma metodologia acessível e rápida para a busca de novos tratamentos é a utilização da triagem virtual de compostos. Essa estratégia baseia-se na busca *in silico* por moléculas ativas em determinado alvo molecular, reduzindo assim, o número de moléculas que seriam postas em testes biológicos, garantindo que a pesquisa seja mais rápida e com custos reduzidos. Dentre as várias técnicas, uma que se destaca é a denominada ancoragem molecular ou *docking* molecular. Essa estratégia consiste na simulação da interação entre moléculas pequenas (ligantes) e macromoléculas biológicas (receptores), com o objetivo de prever o modo de ligação e estimar a afinidade de interação. É uma estratégia computacional que analisa e prevê, através de modelos matemáticos, a interação de ligantes com os receptores, para além disso, também pontua a afinidade desta ligação. Diversos programas de *docking* estão disponíveis como AutoDock, AutoDock Vina, GOLD e Molegro Virtual Docker, cada um com seus próprios algoritmos de busca e funções de pontuação (Ferreira *et al.*, 2015; Kirchmair *et al.*, 2008).

Segundo Guedes, Magalhães e Dardenne (2013) entre o ligante e o receptor há diversas possibilidades de ligação e um algoritmo de busca é responsável por identificar cada uma delas, explorando graus de liberdade translacional, rotacional e conformacional dos ligantes. O *scoring* ou pontuação no *docking* é utilizado para analisar e definir quais alternativas de ligação são teoricamente melhores e para isso ocorre uma ordenação em função das pontuações atribuídas (Khan *et al.*, 2018).

Um dos programas mais usados no mundo é o GOLD (sigla em inglês para Otimização Genética para Ancoragem de Ligantes), desenvolvido pelo Centro de Dados Cristalográficos de Cambridge (CCDC). Esse software emprega uma abordagem computacional bastante utilizada de algoritmos genéticos no seu algoritmo de busca, prevendo eficientemente a ligação entre ligantes e sítios ativos de proteínas (Jones *et al.*, 1997).

Os algoritmos genéticos foram inicialmente introduzidos por John Henry Holland em 1975, sendo uma técnica de otimização e busca baseada nos princípios

da seleção natural e da genética de Charles Darwin. Esse método utiliza uma população de soluções candidatas, codificadas em estruturas correspondente a cromossomos, que são submetidas repetidamente a processos de avaliação por meio de uma função de aptidão, seleção dos indivíduos mais adaptados, recombinação ou cruzamento e mutação. Ou seja, o algoritmo genético simula um processo evolutivo, o que permite a exploração eficiente de espaços de busca complexos e a descoberta de soluções robustas para problemas multidimensionais, bastante útil em áreas como bioinformática e *docking* molecular quando há diversos parâmetros a ser combinados em busca da melhor solução (Massago, 2013).

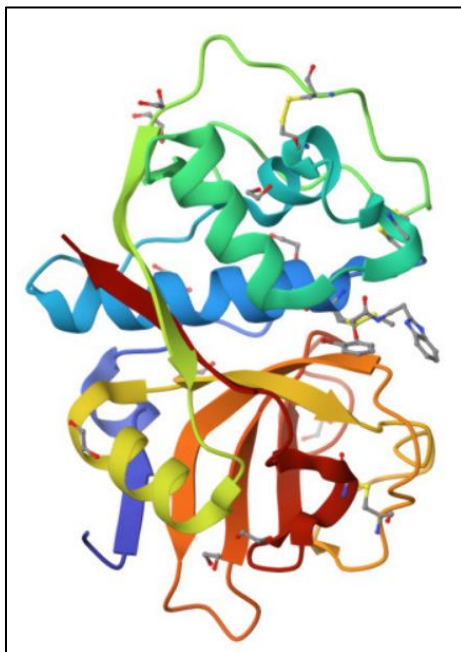
Assim, o programa GOLD baseia-se na geração de múltiplas conformações do ligante, que são avaliadas mediante funções de pontuação específicas, como GoldScore e ChemScore, as quais consideram parâmetros termodinâmicos e energéticos (como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças eletrostáticas) para determinar a afinidade de ligação e, no fim, são identificadas as conformações com melhor acoplamento ao sítio ativo da proteína (Jones *et al.*, 1997).

É importante ressaltar que, embora possua inúmeras vantagens, sua eficácia depende da qualidade dos dados estruturais, como a resolução das estruturas proteicas obtidas por cristalografia (CCDC, 2025). Considerando isso, a utilização de um software como o GOLD na pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novas moléculas com potencial farmacológico é uma ferramenta de extrema importância, pois permite a priorização de compostos com foco na seletividade, afinidade e potencial farmacológico. No caso da DC, essa abordagem tem sido amplamente empregada na busca por inibidores de proteínas essenciais do *Trypanosoma cruzi*, como a cruzipaína ou cruzaina (Nogueira *et al.*, 2020).

A cruzaina é uma cisteína protease do tipo papaína, presente em todo o ciclo de vida do *T. cruzi* devido ao importante papel que desempenha na nutrição, diferenciação e evasão imune do parasita, sendo assim, essencial para o desenvolvimento e sobrevivência do *T. cruzi* (Figura 5) (Durães-oliveira *et al.*, 2024). Faz parte das formas amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas, entretanto, nesta última forma segundo Herrera e colaboradores (2006) a atividade da cruzaina é dez vezes maior. Essa enzima catalisa as reações de hidrólise de ligações peptídicas, desempenhando importante papel na decomposição de proteínas nas células do hospedeiro. Com isso, se tornou um importante alvo molecular para o

desenvolvimento de novos tratamentos para a doença de Chagas, já que sua inibição poderia resultar na morte do parasita (Moreira *et al*, 2014).

Figura 5 - Estrutura cristalográfica da cruzaina complexada com um inibidor (3KKU)



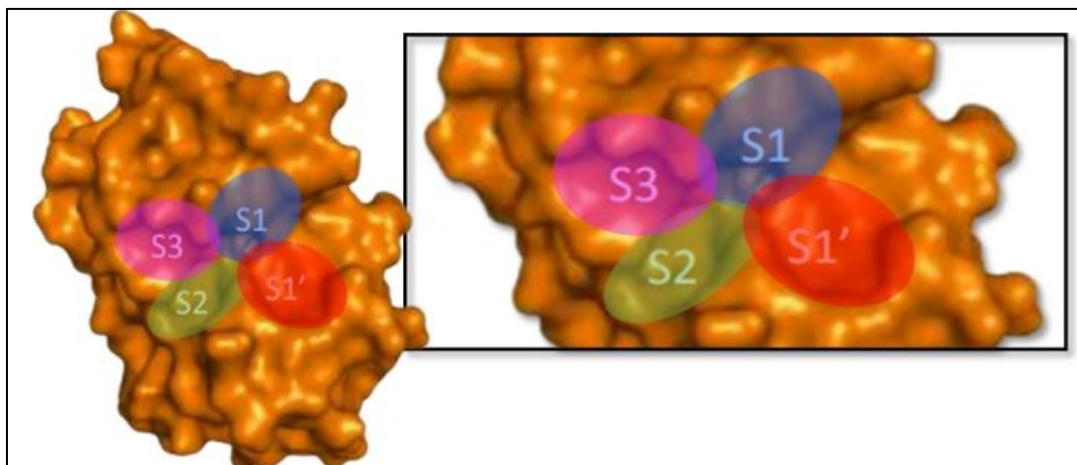
Fonte: RCSB PDB (2024).

As proteases atuam como catalisadoras na hidrólise de proteínas e são classificadas em diferentes grupos, cada um com um arranjo espacial único de resíduos de aminoácidos essenciais em seu sítio catalítico. No caso das cisteínas proteases, a presença de uma cisteína no sítio ativo é uma característica comum. A cruzaina, por exemplo, pertence a essa classe e possui uma tríade catalítica formada por cisteína (Cys), histidina (His) e asparagina (Asn). Além disso, essas enzimas apresentam subsítios de ligação específicos, capazes de acomodar os resíduos de aminoácidos do substrato de acordo com sua especificidade (Mehrtens, 2007).

Estruturalmente, o sítio catalítico da cruzaina é organizado em subsítios de ligação denominados S1, S2, S3 e S1', responsáveis por acomodar diferentes porções do substrato ou de inibidores e por conferir especificidade à enzima. Entre eles, o subsítio S2 destaca-se como o principal determinante de especificidade, caracterizando-se por uma cavidade relativamente profunda e predominantemente hidrofóbica, favorável à interação com grupos apolares volumosos. Já os subsítios S1, S3 e S1' apresentam maior exposição ao solvente e contribuem para o adequado posicionamento e estabilização do ligante na fenda catalítica. O resíduo catalítico Cys25 localiza-se na região correspondente ao S1, enquanto His162 e Asn175

completam o arranjo catalítico típico das proteases do tipo papaína, atuando na ativação nucleofílica do tiol e na estabilização dos intermediários reacionais (HO, 2023; Gillmor *et al.*, 1997). A compreensão dessa organização estrutural é fundamental para o planejamento racional de inibidores.

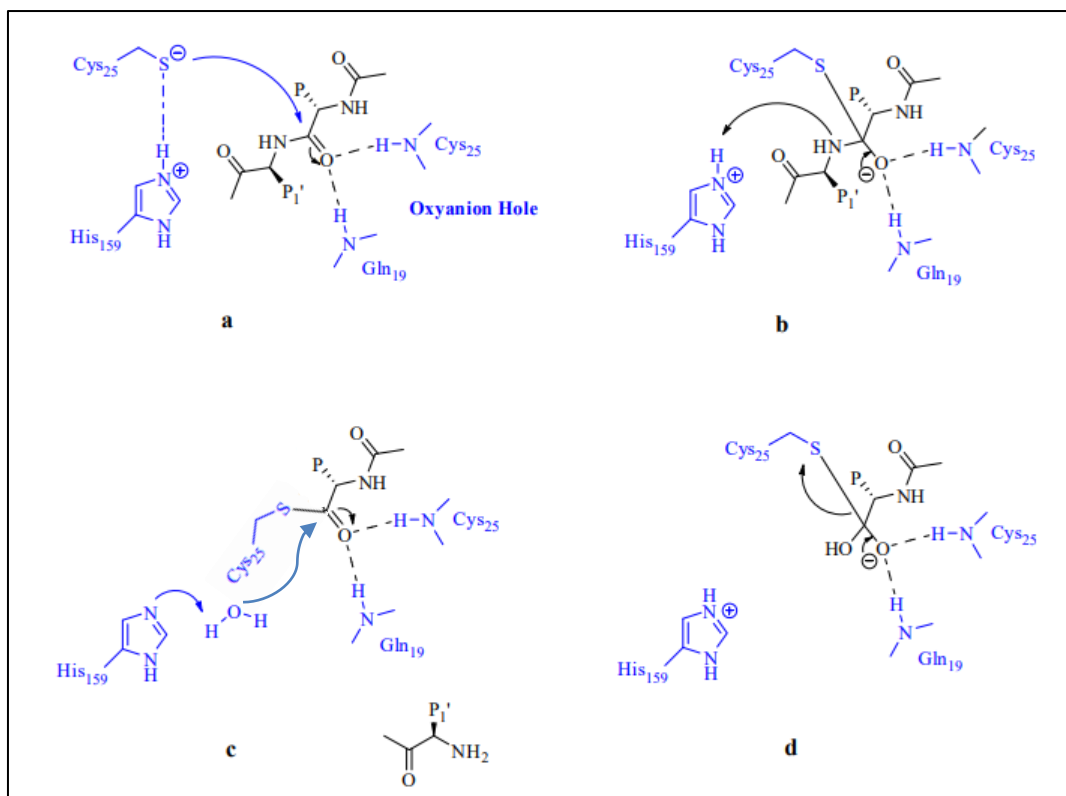
Figura 6 - Superfície da cruzaina destacando os subsítios do sítio catalítico (S1, S2, S3 e S1').



Fonte: HO (2023).

Para entender como ocorre o mecanismo de ação da hidrólise, é importante ressaltar que, a His e Cys formam um par iônico tiolato – imidazólico, garantindo que o tiol da Cys seja um potente nucleófilo que irá hidrolisar a ligação peptídica do substrato. Esse mecanismo é exemplificado em quatro etapas na Figura 6: ataque do tiolato a ligação peptídica (a); o intermediário tetraédrico é estabilizado por meio de ligações de hidrogênio com Cys e Gly (cavidade do oxiânion) (b); a acetilação da enzima e liberação uma cadeia terminal do substrato (c); há formação de um segundo intermediário tetraédrico devido a hidrólise da enzima que foi acetilada (d), com consequente colapso do intermediário para regeneração da enzima liberando o fragmento N-terminal do substrato (Mehrtens, 2007).

Figura 7 - Mecanismo de hidrólise da cisteína protease proposto por Mehrtens (2007).



Fonte: Retirado de Mehrtens (2007, p. 19).

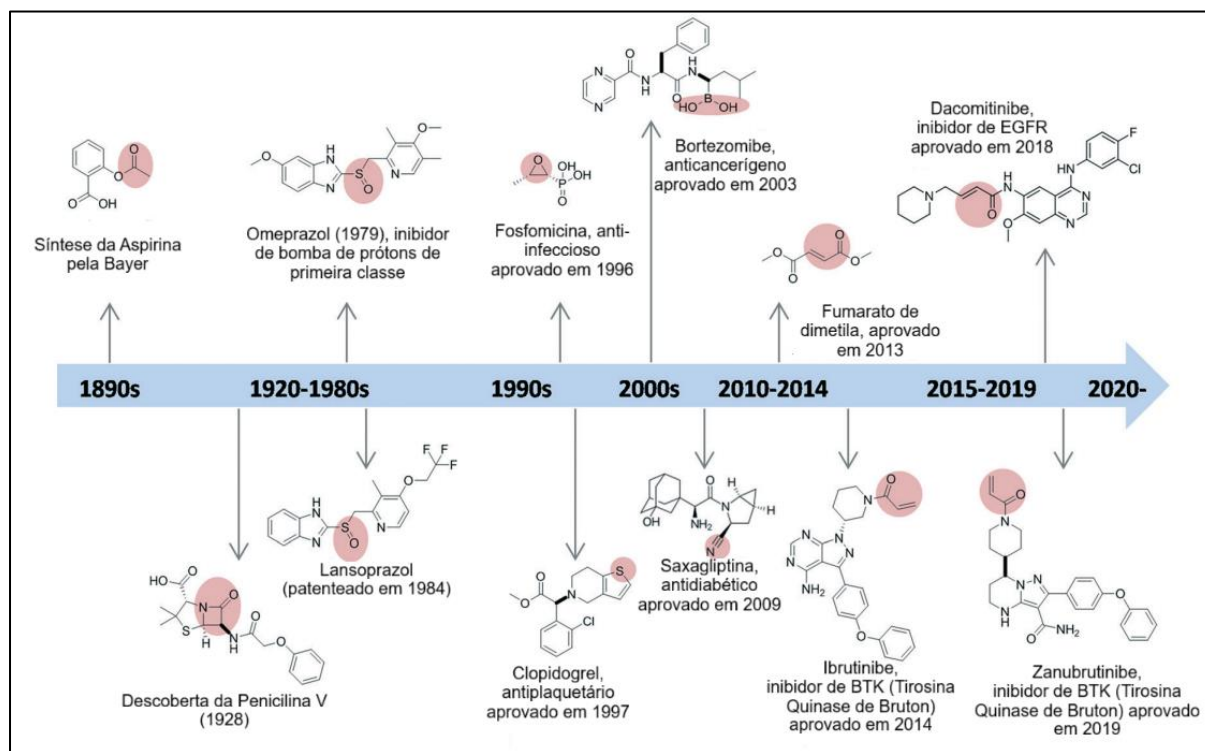
Considerando o contexto de modelagem molecular, quando se determina um alvo molecular, a busca por moléculas que interagem com este alvo é de extrema importância, assim, é importante destacar que na literatura, inibidores covalentes são descritos como sendo compostos que formam uma ligação covalente com um alvo molecular, e a inibição pode ser tanto reversível quanto irreversível, e isso vai depender do grupo reativo - *warhead* – escolhido. O grupo reativo é a parte da molécula responsável por formar a ligação covalente com o alvo. O desenvolvimento de inibidores covalentes representa um marco importante na história da farmacologia, sendo responsável por avanços terapêuticos significativos ao longo do último século (Hillebrand *et al.*, 2024).

Ao longo das últimas décadas, diferentes medicamentos de relevância clínica empregaram o mecanismo de inibição covalente, como a aspirina, cuja ação envolve a acetilação da ciclooxygenase, e a penicilina, responsável pela inativação da transpeptidase bacteriana. Posteriormente, fármacos como omeprazol, clopidogrel, bortezomibe, saxagliptina e inibidores de tirosina quinase reforçaram a aplicabilidade terapêutica dessa abordagem. A evolução histórica desses compostos, ilustrada na Figura 7, evidencia a consolidação da inibição covalente como estratégia

farmacológica robusta e validada clinicamente (Sutanto; Konstantinidou; Dömling, 2020).

Nesse contexto, a investigação de inibidores covalentes para a cruzaina torna-se particularmente relevante, especialmente considerando a necessidade de novas alternativas terapêuticas para a doença de Chagas. A aplicação de ferramentas de modelagem molecular permite, assim, explorar racionalmente essa estratégia no planejamento de novos candidatos.

Figura 8 - Histórico dos inibidores covalentes. Os grupos químicos reativos ou “warheads”.



Fonte: Adaptado de Sutanto; Konstantinidou; Dömling (2018, p. 3).

Devido ao papel essencial da cruzaina no ciclo de vida do *T. cruzi*, diversas classes de inibidores vêm sendo descritas na literatura. De maneira geral, esses compostos podem atuar como inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis ou reversíveis (não covalentes), com mecanismos distintos de reconhecimento e estabilização do complexo enzima-ligante. Nos inibidores covalentes, a presença de um grupo eletrofílico (*warhead*) permite o ataque nucleofílico pelo resíduo catalítico de cisteína no sítio ativo, resultando na formação de um aduto covalente, cuja reversibilidade depende da natureza química do *warhead* e do microambiente catalítico (Johnson et al., 2010; Singh et al., 2011).

Em proteases do tipo cisteína, muitos inibidores são desenhados para explorar a arquitetura do sítio ativo e podem apresentar características peptidomiméticas, uma vez que o reconhecimento molecular frequentemente envolve subsítios responsáveis por acomodar resíduos do substrato natural (Drag; Salvesen, 2010). Nesse contexto, inibidores covalentes reversíveis inativam cisteíno-proteases ao reagirem com o tiol catalítico, levando à formação de um intermediário covalente reversível, frequentemente descrito como tetraédrico no caso de aldeídos e cetonas ativadas. A estabilidade desse intermediário depende tanto do grupo reativo quanto das interações complementares estabelecidas pelas regiões de reconhecimento do ligante.

Diversos inibidores covalentes reversíveis descritos como produtos naturais ou derivados incluem, por exemplo, peptidil aldeídos, os quais podem apresentar elevada potência, mas frequentemente exibem seletividade limitada e podem também inibir serino-proteases dependendo do contexto estrutural e do sítio ativo (Mehrtens et al., 2007; Singh et al., 2011). Assim, modificações estruturais dirigidas à exploração de subsítios específicos do sítio ativo vêm sendo empregadas para aumentar seletividade por cisteíno-proteases, resultando em diferentes classes de compostos sintéticos reversíveis ou covalentes reversíveis descritas na literatura (Mehrtens et al., 2007).

Já os inibidores covalentes irreversíveis frequentemente apresentam *warheads* altamente reativos, como fluorometil-cetonas, β -epóxi-cetonas, epóxidos peptídicos e vinil sulfonas. As vinilssulfonas e vinilssulfonamidas atuam como aceptores de Michael e têm sido descritas como inibidores potentes de diversas cisteíno-proteases, frequentemente exibindo baixa reatividade frente a serino-proteases (Powers et al., 2002). Apesar do potencial terapêutico, inibidores covalentes irreversíveis demandam avaliação criteriosa quanto à seletividade e segurança, uma vez que reatividade excessiva pode favorecer ligações fora do alvo e aumentar o risco de efeitos adversos (Johnson et al., 2010; Singh et al., 2011).

Além disso, deve-se considerar os inibidores reversíveis (não covalentes), os quais se ligam de forma temporária ao sítio ativo ou a regiões alostéricas por meio de interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Esses inibidores modulam a atividade catalítica sem modificar covalentemente o resíduo catalítico e constituem classes relevantes tanto para

triagens iniciais quanto para o entendimento do reconhecimento molecular e da relação estrutura–atividade (Copeland, 2013).

Assim, é fundamental compreender os mecanismos de atuação dos diferentes tipos de inibidores da enzima cruzaina, sendo estes inibidores reversíveis, covalente reversíveis e covalentes irreversíveis, para o desenvolvimento racional de novas moléculas com potencial terapêutico contra a doença de Chagas. Além disso, diante da importância desta enzima para o ciclo de vida do *T. cruzi* a busca de novos candidatos a fármacos por meio de metodologias computacionais é uma estratégia promissora, acessível e de baixo custo. Para isso, é de fundamental importância investigar o atual cenário de inibidores de cruzaina existentes, classificando-os quanto ao modo de inibição, realizando uma caracterização de suas propriedades físico-química e analisando seu comportamento frente a metodologias de predição de interação como o *docking*. Assim, busca-se consolidar estratégias *in silico* visando a descoberta de novos fármacos. Parte-se da hipótese de que diferentes classes de inibidores da cruzaina apresentam perfis estruturais e físico-químicos distintos, os quais podem impactar a pontuação e a interpretação comparativa em estudos de *docking* molecular.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar e analisar as diferentes classes de inibidores da cruzaina descritos na literatura utilizando ferramentas de modelagem molecular.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir este objetivo, objetivou-se especificamente:

- a) Selecionar, obter e preparar a estrutura tridimensional da cruzaina;
- b) Realizar um levantamento na literatura de moléculas ativas contra a cruzaina;
- c) Realizar uma caracterização química e das propriedades físico-química a partir das estruturas obtidas;
- d) Realizar o *docking* molecular ao conjunto de inibidores obtidos.
- e) Analisar o desempenho do *docking* no GOLD em relação aos inibidores descritos na literatura.

3 METODOLOGIA

3.1 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDORES DA CRUZAÍNA

Por meio do programa DataWarrior foi possível obter os inibidores da cruzaína, importando as informações da base de dados ChEMBL (European Bioinformatics Institute, 2024) a partir do termo “*cruzipain*” no campo alvo molecular. Assim, obteve-se 33.189 moléculas que foram selecionadas somente aquelas com atividade inibitória (IC₅₀) expressa em nanomolar (nM) com valores menores que 100.000 nM determinada experimentalmente. Por meio de filtros, moléculas contendo elementos atípicos para fármacos foram excluídas, como o selênio, boro, arsênio e silício. Dentre os registros restantes, removeram-se duplicatas, e enantiômeros redundantes, resultando em 29.413 ligantes únicos, que constituíram o banco de dados final utilizado nas análises. Por fim, para cada molécula, foram calculadas as seguintes propriedades físico-químicas:

- massa molar
- LogP
- número de aceptores de hidrogênio
- número de doadores de hidrogênio
- área de superfície polar topológica (TPSA)
- número de ligações rotacionáveis

Adicionalmente a frequência de determinados sistemas cíclicos foi realizada, utilizando-se a ferramenta *Analyse Scaffold* do DataWarrior para análise mais robusta do perfil destes ligantes.

3.2 CLASSIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS INIBIDORES

A classificação dos compostos como inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e não covalentes reversíveis foi fundamentada em filtros SMARTS (*SMiles ARbitrary Target Specification*) no DataWarrior e baseada na literatura existente aplicados a cisteína-proteases. Essa classificação levou em consideração a presença ou ausência de grupos funcionais com potencial interação

covalente com o resíduo catalítico Cys25 da cruzaína. Foram considerados os seguintes grupos, cujas estruturas são mostradas no Anexo A:

- Carbonilas α - β insaturadas
- α - β -Arilcetonas
- α - β -Cetona-Heterociclo
- Heteroariltioacetamida
- α -fenil-tiofenolcetona
- Ceto-aciloximetano
- Ceto-arilaciloximetano
- Ceto-ariloximetano
- Vinilssulfonas
- Epóxido
- Haleto de alquila
- Tiazolidinodiona
- Tetrafluorofenóxido
- Oxazolona
- Tetrafluorofenoximetil cetona
- Dissulfeto
- Maleimida
- Ester-fosfato
- Nitrofuranos
- Aziridina
- Halometilcetonas
- Carbazatos de alquila
- N-O-diacilhidroxamatos
- Oxidação
- Sais de sulfônico

Os compostos classificados como covalentes irreversíveis possuem grupos eletrofílicos capazes de reagir de forma permanente com o grupo tiol da Cys25, resultando na inativação estável da enzima. Em cisteínas proteases, esses compostos atuam em grande parte por mecanismos de alquilação ou acilação irreversível, levando a perda definitiva da atividade catalítica, conforme descrito em literatura (HILLEBRAND *et al.*, 2024).

Os compostos covalentes reversíveis foram caracterizados pela presença de grupos funcionais capazes de formar adutos covalentes instáveis com a Cys25, permitindo a dissociação do complexo enzima-inibidor. Foram classificados como covalentes reversíveis os compostos que não apresentavam warheads associados à inibição irreversível e contendo ao menos um dos seguintes grupos, cujas estruturas são mostradas no Anexo B:

- N-acil-hidrazonas
- Aril cetonas
- Cetonas heterocíclicas
- Tiossemicarbazonas
- Aldeídos
- Carbazonas
- Oximas
- Trifluorometil cetonas
- Halopiridina
- Hemiacetal de aldeído mascarado

Como uma mesma molécula poderia conter mais de um grupo funcional potencialmente reativo, adotou-se um critério hierárquico de classificação. Compostos contendo qualquer warhead (grupo reativo) associado à inibição covalente irreversível foram prioritariamente classificados nessa categoria, mesmo que também apresentassem grupos característicos de inibição covalente reversível. Na ausência desses grupos, a presença de warheads típicos de formação de adutos covalentes reversíveis levou à classificação como inibidores covalentes reversíveis. Apenas moléculas sem nenhum dos padrões estruturais descritos foram classificadas como inibidores reversíveis não covalentes.

Os filtros SMARTS utilizados foram construídos com base em subestruturas reativas descritas na literatura para cisteíno-proteases, priorizando padrões associados à reatividade do resíduo catalítico Cys25. A classificação estrutural obtida, portanto, representa uma inferência baseada em potencial químico de reatividade, não constituindo confirmação experimental do mecanismo de inibição.

Por fim, as moléculas caracterizadas como inibidores reversíveis foram aquelas que não possuíam grupos eletrofílicos reativos, ou seja, aqueles utilizados na classificação dos inibidores covalentes.

A análise destas classes de compostos (covalentes reversíveis, covalentes irreversíveis e reversíveis), os parâmetros físico-químicos e comparação com o score (pontuação) do *docking* foram realizadas por meio do RStudio, onde foram construídos gráficos e tabelas, incluindo histogramas com curvas de densidade kernel e gráficos de dispersão com regressão linear.

Essa etapa permitiu comparar as três classes de inibidores e identificar tendências relacionadas às propriedades físico-químicas que poderiam influenciar o desempenho nos experimentos de *docking*, além disso, por meio de gráficos de dispersão, correlacionaram-se esses parâmetros com o score do *docking*.

3.3 DOCKING

3.3.1 Preparo dos ligantes para o *docking*

As estruturas bidimensionais dos compostos selecionados foram inicialmente processadas no DataWarrior, onde foi preservado apenas o maior fragmento estrutural de cada molécula por meio da ferramenta *Add Largest Fragment*, a fim de remover sais, contraíons e espécies neutras indesejadas. Ainda nessa etapa, realizou-se a neutralização de cargas formais, quando aplicável.

As estruturas filtradas foram exportadas e convertidas para coordenadas tridimensionais utilizando o OpenBabel, que permitiu a geração inicial das geometrias moleculares, adicionando os hidrogênios considerando o estado de protonação predominante em pH 5,5, condição compatível com o microambiente ácido da cruzaína. No OpenBabel, também foi realizada otimização geométrica das estruturas utilizando campo de força molecular padrão (MMFF94) a partir do conformero de menor energia.

Posteriormente, os arquivos foram inspecionados no PyMOL e no DataWarrior a fim de se detectar inconsistências estruturais, quiralidades indefinidas e possíveis erros de valência. Compostos que apresentaram problemas estruturais graves e não

puderam ser corrigidos foram excluídos do conjunto. Ao final dessa inspeção, 14 moléculas foram removidas.

A exploração conformacional dos ligantes foi conduzida durante o processo de *docking* pelo algoritmo genético do programa GOLD, não sendo necessária a geração prévia extensiva de múltiplas conformações externas.

3.3.2 Obtenção e preparo da estrutura tridimensional da cruzaína

A estrutura tridimensional da enzima cruzaína, em complexo com um ligante não peptídico de modo de ligação reversível, foi obtida a partir do banco de dados Protein Data Bank (PDB). O arquivo de coordenadas atômicas, identificado pelo código de acesso 3KKU, foi recuperado do sítio eletrônico oficial do PDB (disponível em: <https://www.rcsb.org/>).

Após isso, o complexo cristalográfico foi preparado pelo programa GOLD (CCDC - *The Cambridge Crystallographic Data Centre*) seguindo um protocolo que considerou análise criteriosa dos aminoácidos constituintes do sítio de ligação, os possíveis tautômeros dos resíduos de histidina, as orientações das cadeias laterais de asparagina (Asn) e glutamina (Gln) para verificação de eventuais inversões, bem como a ocupância conformacional de cada resíduo. Pela análise de aminoácidos do sítio de ligação foi possível detectar presença de grupos ionizáveis. Assim, o estado de ionização dos resíduos catalíticos Cys25 e His162 foi definida de maneira a se obter o par iônico. Em seguida, a conformação de maior ocupância para o resíduo de Cys25 foi adotada e foi realizada remoção das moléculas de água presentes no sítio de ligação, juntamente com o artefato de cristalização Z222 e o ligante B95.

3.3.3 *Docking* molecular

O *docking* molecular foi realizado no programa GOLD utilizando as estruturas preparadas da cruzaína e dos inibidores. Para isso, algumas configurações foram utilizadas:

- Região de busca: resíduos a um raio de 8 Å do ligante cristalográfico B95;
- Algoritmo de busca com eficiência de 50% do padrão;
- 30 corridas independentes;

- Operações mínimas: 50.000;
- *Early termination* ativado com o critério de parada das 3 melhores poses com RMSD menor que 1,5 Å;
- Demais parâmetros no padrão do programa;
- Apenas a melhor pose (*top-ranked*) foi salva para cada ligante.

A execução do *docking* foi automatizada e otimizada por meio da divisão dos ligantes em lotes menores para execução em paralelo, utilizando um *script* desenvolvido no laboratório.

A função de pontuação ChemPLP foi utilizada como critério de ranqueamento, e os valores obtidos foram incorporados à base de dados original no DataWarrior. As análises finais de correlações, ordenações e inspeções gráficas foram realizadas no RStudio, DataWarrior e Excel, permitindo comparar o desempenho dos diferentes grupos de inibidores em relação às suas propriedades físico-químicas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA CRUZAÍNA

O *Protein Data Bank* foi utilizado como base de dados para a busca da estrutura cristalográfica da cruzaina. Para isso, foi buscado o termo “cruzain” e encontrou-se 31 resultados, entretanto a estrutura escolhida foi a de código 3KKU, que representa um complexo com ligantes não covalente e com resolução de 1,28 Å. Primeiro, observou-se que as moléculas de água no sítio de ligação dos ligantes não possuíam interações significativas entre o ligante e a proteína, permitindo a remoção destas. Esta estrutura foi selecionada por apresentar características relevantes para o presente estudo, como a natureza do ligante e seu mecanismo de ação reversível, servindo como ponto de partida para as análises subsequentes.

4.2 SELEÇÃO DE INIBIDORES DA CRUZAÍNA COM ATIVIDADE DETERMINADA EXPERIMENTALMENTE

Considerando a relevância da cruzaina para a sobrevivência e o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, e seu potencial como alvo molecular para o desenvolvimento de fármacos destinados ao tratamento da doença de Chagas, foram recuperadas 33.189 entradas no ChEMBL. Após aplicação de critérios de atividade IC₅₀ menor de 10 µM e padronização de unidades, restaram 32.466 compostos. Destes, foram removidas moléculas com átomos incomuns em compostos bioativos, como selênio e metais de transição, por não serem contempladas pelos parâmetros do protocolo de *docking* adotado. Além disso, foram removidas as moléculas duplicadas, resultando, assim, em 29.413 inibidores. É importante também considerar que estes inibidores podem atuar de maneira covalente reversível ou irreversível, e o que vai determinar o tipo de ligação é a presença de grupos eletrofílicos em sua estrutura que reagem com o enxofre do resíduo catalítico de Cys25.

Durante estudos clínicos, a alta taxa de perda de candidatos a fármacos é associada a problemas de toxicidade e baixa eficácia (Guengerich, 2011).

No contexto do desenvolvimento de inibidores enzimáticos, diferentes estratégias vêm sendo exploradas para otimizar potência e seletividade. Entre elas, destacam-se os inibidores covalentes, nos quais a formação de uma ligação covalente entre o ligante e o resíduo catalítico pode resultar em maior potência farmacológica, refletida em valores de IC₅₀ mais baixos e em tempos de residência prolongados no sítio ativo. (Sutanto *et al.*, 2020) Com isso, doses menores e administrações menos frequentes podem ser empregados no esquema terapêutico, o que está associado a melhor adesão do paciente ao tratamento (Bauer, 2015). Os inibidores covalentes também são vantajosos frente a enzimas com sítios de ligação altamente flexíveis, pois podem garantir afinidade adequada (Lonsdale; Ward, 2018).

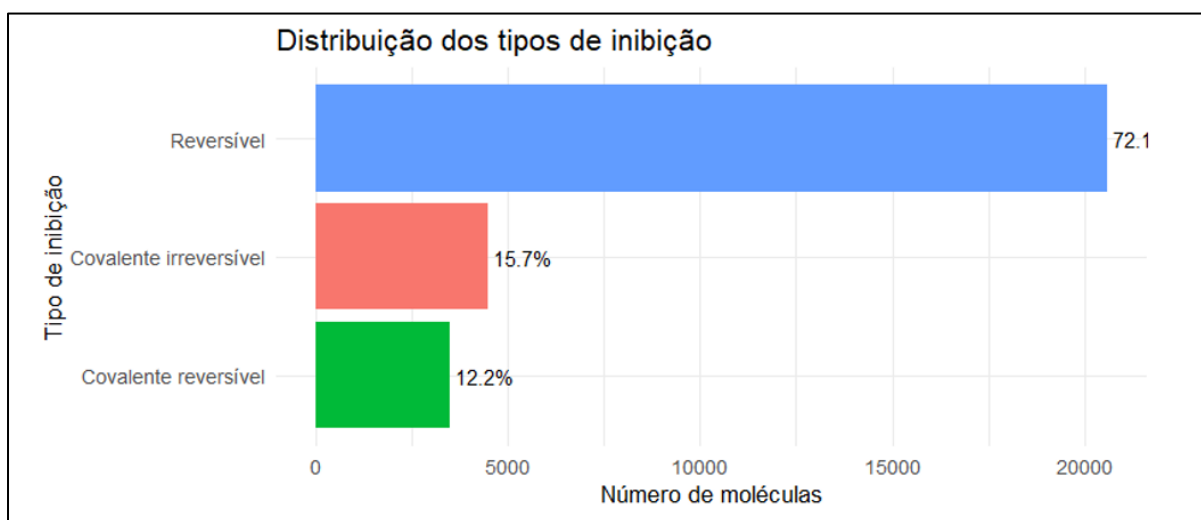
Entretanto, o uso de inibidores covalentes também apresenta limitações importantes, como efeitos adversos inesperados, como reações de hipersensibilidade e toxicidade *off target* (Singh *et al.*, 2011; Johnson; Weerapana; Cravatt, 2010). Além disso, para alvos com alta taxa de turnover proteico, a vantagem do tempo de residência prolongado pode ser reduzida, o que torna a estratégia menos eficaz. Outro desafio relevante reside na escolha adequada do *warhead* eletrofílico, pois exige um equilíbrio delicado entre reatividade suficiente para promover a ligação com o alvo e estabilidade química para evitar reações inespecíficas com nucleófilos endógenos, como por exemplo a glutatona (Powers *et al.*, 2002; Gehring; Laufer, 2018). Dessa forma, a seleção racional de *warheads* permanece uma etapa crítica no desenvolvimento de inibidores covalentes, especialmente para aplicações *in vivo*.

A classificação dos inibidores em covalentes irreversíveis ou covalentes reversíveis depende da natureza química do *warhead*. Com isso, compostos com interações covalentes irreversíveis foram previamente identificados baseados na presença de grupos funcionais como carbonilas α,β -insaturadas, vinilsulfonas, halometilcetonas, epóxidos, haletos de alquila e trifluorometilcetonas. Estes grupos formam uma ligação covalente permanente com o resíduo catalítico Cys25 do sítio ativo. Outros grupos eletrofílicos são conhecidos por formarem ligações covalente com o resíduo de Cys25, porém de maneira reversível. Esses grupos incluem as cetonas, aldeídos e tiossemicarbazonas e também foram identificados nos compostos ativos obtidos do ChEMBL.

A distribuição dessas classes de compostos entre os inibidores obtidos encontra-se na Figura 8, enquanto a identificação dos grupos funcionais utilizados

para essa classificação é apresentada na Tabela 1. É possível observar que dentre os compostos, prevalecem os inibidores reversíveis, nos quais não foram identificados grupos eletrofílicos, correspondendo a um total de 72,1%. Os inibidores covalentes irreversíveis representam 15,7%, enquanto os covalentes reversíveis consistem em 12,2% do conjunto (Figura 8). A predominância de inibidores reversíveis pode sugerir o padrão de busca cauteloso por inibidores covalentes devido aos efeitos adversos (Singh *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2010; Kim, 2021). Entretanto, os inibidores covalentes ainda constituem uma porção significativa de inibidores (27,9%), especialmente os inibidores covalentes irreversíveis. Este fato pode estar relacionado a uma estratégia comumente utilizada de transformar um substrato de uma protease em um inibidor, inserindo grupos eletrofílicos (Drag; Salvesen, 2010; Müller *et al.*, 2023).

Figura 9 - Distribuição total dos compostos de acordo com o tipo de inibição.



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

A Tabela 1 apresenta a distribuição dos inibidores e seus grupos funcionais utilizados para a classificação quanto ao tipo de inibição, evidenciando a diversidade química associada aos inibidores covalentes, tanto reversíveis quanto irreversíveis, frente à enzima cruzaina. Por exemplo, dentro da classe dos inibidores covalentes irreversíveis (4.703 compostos), observa-se que há predominância de carbonilas α - β insaturadas, correspondendo a 43,50% desses compostos, o que é compatível com a literatura, já que os aceptores de Michael são frequentemente utilizados são amplamente empregados como warheads em inibidores direcionados a resíduos de cisteína em proteases (Jackson *et al.*, 2016; Santos; Moreira, 2007)

Já na classe dos inibidores covalentes reversíveis (3.606 compostos) destaca-se a elevada proporção de nitrilas, estando presentes em 50,92% dos compostos dessa categoria. Essa elevada frequência reforça o papel dos compostos contendo grupo nitrila ($-C\equiv N$) em estratégias de descoberta de fármacos, devido ao seu amplo potencial como inibidores de cisteíno-proteases associadas a doenças como leishmaniose, doença de Chagas (via cruzaina) e câncer (via cathepsina L). Isso se deve ao fato de que o grupo nitrila atua como um farmacóforo versátil, promovendo interações efetivas com resíduos do sítio ativo, podendo conferir boa afinidade, estabilidade metabólica e perfil ADME (administração, distribuição, metabolismo, eliminação) favorável (Brogi *et al.*, 2022). Além das nitrilas, grupos como *N*-acilhidrazonas, arilcetonas, cetona-heterocíclicas e tiossemicarbazonas apresentam contribuições relevantes, refletindo a diversidade química empregada para alcançar inibição covalente reversível (Gehringer; Laufer, 2018). Esses compostos formam ligações covalentes transitórias, como hemitioacetais ou tioimidatos, sendo amplamente descritos como estratégias intermediárias entre inibição não covalente e irreversível no desenvolvimento de inibidores de cisteína-proteases, incluindo a cruzaina (Merhtens, 2007).

Os inibidores não covalentes reversíveis ($n = 21.104$) constituem a maior fração da biblioteca analisada, representando 71,75% do total de compostos. Apesar de não reagirem diretamente com a Cys25, esses compostos desempenham papel fundamental como grupo de referência comparativa, permitindo avaliar até que ponto a presença de *warheads* covalentes impacta o desempenho nos estudos de *docking* (Luci *et al.*, 2011). Sua inibição depende de interações hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interação com os subsítios, são menos exploradas pois não reagem com a Cys25, porém são fundamentais para comparação estrutural (Sigma-Aldrich, 2025).

Tabela 1 - Classificação dos inibidores da enzima cruzaina

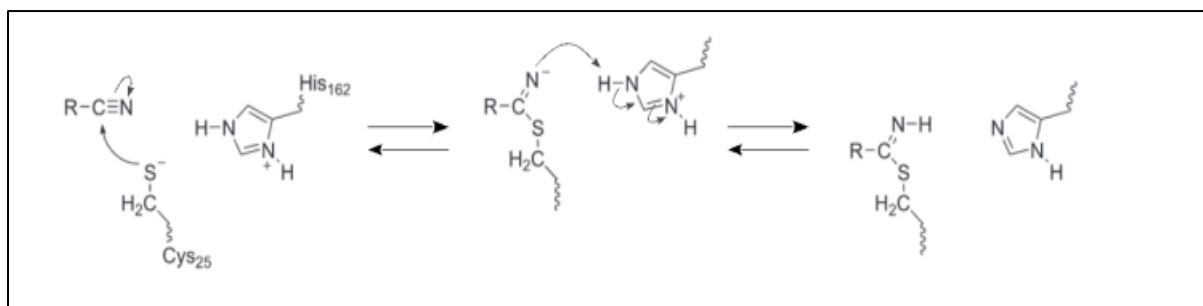
TIPO DE INIBIÇÃO	GRUPO	Nº GRUPO	FREQUÊNCIA	% TIPO DE INIBIÇÃO	% TOTAL
Covalente Irreversível	Carbonilas α - β insaturadas	4703	2046	43,50%	6,96%
	α - β -Arlcetonas	4703	745	15,84%	2,53%
	α - β -Cetona-Heterociclo	4703	89	1,89%	0,30%
	Heteroariltioacetamida	4703	1615	34,34%	5,49%
	α -fenil-tiofenolcetona	4703	337	7,17%	1,15%
	Ceto-aciloximetano	4703	231	4,91%	0,79%
	Ceto-arilaciloximetano	4703	121	2,57%	0,41%

TIPO DE INIBIÇÃO	GRUPO	Nº GRUPO	FREQUÊNCIA	% TIPO DE INIBIÇÃO	% TOTAL
	Ceto-ariloximetano	4703	72	1,53%	0,24%
	Vinilssulfonas	4703	128	2,72%	0,44%
	Epóxido	4703	49	1,04%	0,17%
	Haletos de alquila	4703	98	2,08%	0,33%
	Tiazolidinodiona	4703	88	1,87%	0,30%
	Tetrafluorofenóxido	4703	37	0,79%	0,13%
	Oxazolona	4703	35	0,74%	0,12%
	Tetrafluorofenoximetil cetona	4703	28	0,60%	0,10%
	Dissulfeto	4703	26	0,55%	0,09%
	Maleimida	4703	19	0,40%	0,06%
	Ester-fosfato	4703	18	0,38%	0,06%
	Nitrofuranos	4703	17	0,36%	0,06%
	Aziridina	4703	8	0,17%	0,03%
	Halometilcetonas	4703	8	0,17%	0,03%
	Carbazatos de alquila	4703	7	0,15%	0,02%
	N-O-diacilhidroxamatos	4703	4	0,09%	0,01%
	Oxidação	4703	2	0,04%	0,01%
	Sais de sulfônico	4703	1	0,02%	0,00%
Covalente Reversível	Nitrila	3606	1836	50,92%	6,24%
	N-acil-hidrazonas	3606	1266	35,11%	4,30%
	Aril cetonas	3606	1232	34,17%	4,19%
	Cetonas heterocíclicas	3606	440	12,20%	1,50%
	Tiossemicarbazonas	3606	194	5,38%	0,66%
	Aldeídos	3606	44	1,22%	0,15%
	Carbazonas	3606	23	0,64%	0,08%
	Oximas	3606	21	0,58%	0,07%
	Trifluorometil cetonas	3606	13	0,36%	0,04%
	Halopiridina	3606	11	0,31%	0,04%
	Hemiacetal de aldeído mascarado	3606	11	0,31%	0,04%
Reversíveis	Não definido	21104	21104		71,75%

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Um exemplo de inibição covalente reversível de cisteína proteases é pela adição nucleofílica da cisteína ao carbono nitrílico seguido da abstração de um próton da histidina catalítica, esse tipo de mecanismo forma um intermediário tioimidato reversível (Figura 9) (Ribeiro, 2018).

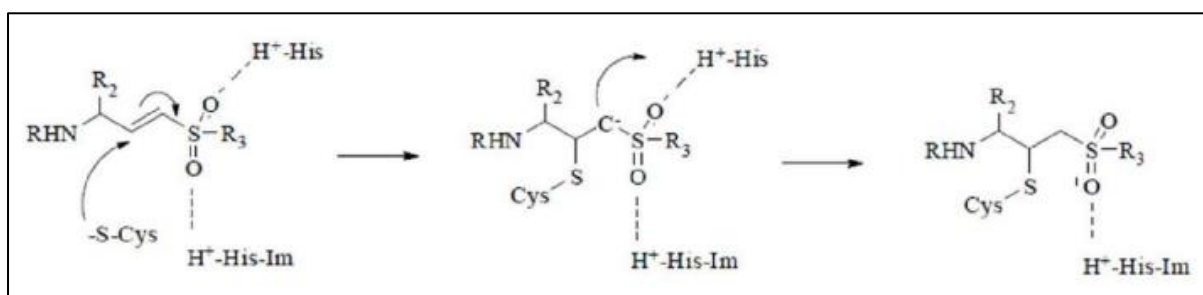
Figura 10 - Mecanismo de inibição covalente reversível de cisteína-proteases por inibidor nitrílico, evidenciando a formação de um aduto reversível entre o grupo nitrila e o resíduo catalítico Cys25, mediado pelo par catalítico Cys25–His162.



Fonte: Imagem retirada de Ribeiro, 2018.

Já para os inibidores irreversíveis, um bom exemplo é a inibição por aceptores de Michael (Figura 10). Os aceptores de Michael são em sua grande maioria, compostos carbonílicos α,β -insaturados usados na reação de Michael ou também chamada de adição de Michael. Diversas subclasses de compostos podem atuar como aceptores de Michael, incluindo aldeídos α,β -insaturados, ésteres e tioésteres α,β -insaturados, amidas conjugadas, nitrilas ativadas e outros sistemas eletronicamente conjugados (Andrés *et al.*, 2024).

Figura 11 - Mecanismo de inibição covalente irreversível de cisteína-proteases por aceptores de Michael, destacando o ataque nucleofílico do tiol da Cys25 ao carbono β da dupla ligação α,β -insaturada e a formação de um aduto estável



Fonte: MEHRTENS, 2007.

A Figura 10 mostra, de forma resumida, como ocorre a inibição covalente do tipo adição de Michael com uma vinilssulfona. Primeiro, o tiolato da cisteína catalítica (Cys25) atua como nucleófilo e reage com carbono β da dupla ligação α,β -insaturada do inibidor. Esse ataque é favorecido porque grupos retiradores de elétrons tornam esse carbono mais eletrofílico. Após o ataque, forma-se um intermediário que é rapidamente protonado, resultando em uma ligação covalente estável entre a enzima e o inibidor. A formação desse intermediário é favorecida devido a possibilidade de

conjugação do par de elétrons com a carbonila ou grupo semelhante. Como essa ligação formada não se rompe facilmente, a enzima permanece inativada, caracterizando um mecanismo típico de inibição covalente irreversível (Souza, 2021; (Andrés *et al.*, 2024).

4.3 ANÁLISE DA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS MOLÉCULAS OBTIDAS

Para análise dos parâmetros físico-químicos calculados, levou-se em conta a regra dos 5 de Lipinski que considera parâmetros como peso molecular, e número de aceptores e doadores de ligação hidrogênio e LogP. Em 1997, um estudo pioneiro realizado por Christopher Lipinski, de um grupo de pesquisadores da Pfizer, introduziu critérios fundamentais para avaliar propriedades farmacocinéticas de moléculas. O trabalho analisou compostos farmacologicamente ativos administrados por via oral, bem como candidatos em fase clínica. A partir dessa análise, os pesquisadores estabeleceram parâmetros específicos que abrangiam aproximadamente 90% das variações observadas em quatro características físico-químicas essenciais: massa ou peso molecular (≤ 500 Da), logaritmo do coeficiente de partição de um soluto entre octanol e água, conhecido como LogP (≤ 5), número de doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 e número de aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 (Lipinski *et al.*, 2001). Esses parâmetros deram origem ao que ficou conhecido como as "regras dos cinco de Lipinski", um marco na triagem de moléculas com potencial terapêutico. A partir disso, estabeleceu-se que moléculas que não respeitarem ou ainda que descumprissem pelo menos dois destes parâmetros, seriam menos propensas a boa absorção oral (Walters, 2012).

Além dos parâmetros definidos pelas regras de Lipinski, considerou-se aqueles definidas por Veber (2002), em que compostos devem ter no máximo dez ligações rotacionáveis e área de superfície polar (*topological polar surface area – TPSA*) igual ou menor que $140 \text{ \AA}^2$, para terem boa biodisponibilidade oral. No presente trabalho, dentre as classes predefinidas aplicou-se as regras de Lipinski e de Veber, para avaliação de parâmetros chave associados à boa absorção e permeabilidade oral. No entanto, tais critérios foram utilizados com finalidade analítica e comparativa entre as classes de inibidores. Inicialmente, foi realizada uma análise detalhada para

identificação das regras que mais frequentemente violadas em cada classe dos inibidores. Os resultados quantitativos se encontram na Tabela 2.

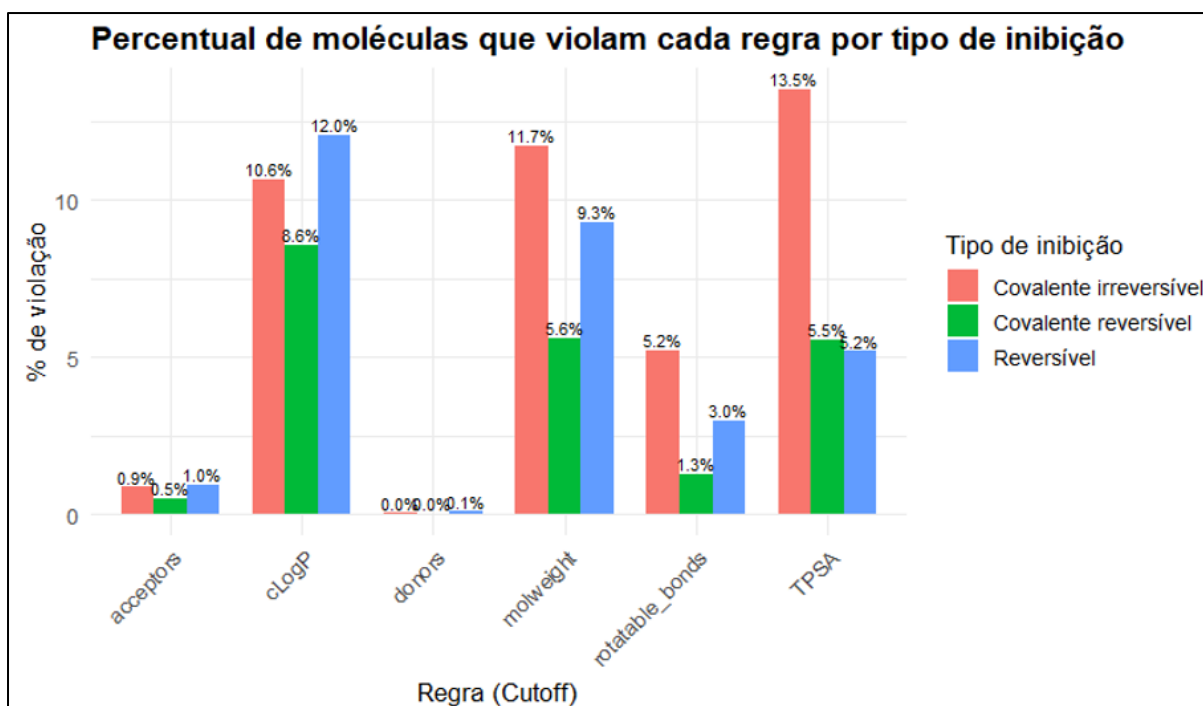
Tabela 2 - Frequência e percentual de violações por regra específica e por tipo de inibição.

Tipo de inibição	Regra	Violações por regra		
		Violações	N	Percentual (%)
Covalente Irreversível	Peso molecular	525	4482	11,7
	Aceptores de hidrogênio	39	4482	0,9
	Doadores de hidrogênio	2	4482	0
	TPSA	606	4482	13,5
	Ligações rotacionáveis	233	4482	5,2
	LogP	477	4482	10,6
Covalente Reversível	Peso molecular	195	3481	5,6
	Aceptores de hidrogênio	17	3481	0,5
	Doadores de hidrogênio	1	3481	0
	TPSA	193	3481	5,5
	Ligações rotacionáveis	45	3481	1,3
	LogP	298	3481	8,6
Reversíveis	Peso molecular	1912	20595	9,3
	Aceptores de hidrogênio	196	20595	1
Tipo de inibição	Regra	Violações por regra		
		Violações	N	Percentual (%)
Reversíveis	Doadores de hidrogênio	17	20595	0,1
	TPSA	1068	20595	5,2
	Ligações rotacionáveis	616	20595	3
	LogP	2480	20595	12

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Para facilitar a visualização da comparação entre os padrões de violação e das classes de inibidores, os dados percentuais da Tabela 2 são apresentados em gráfico de barras na Figura 11.

Figura 12 - Percentual de violações por regra específica e por tipo de inibição.

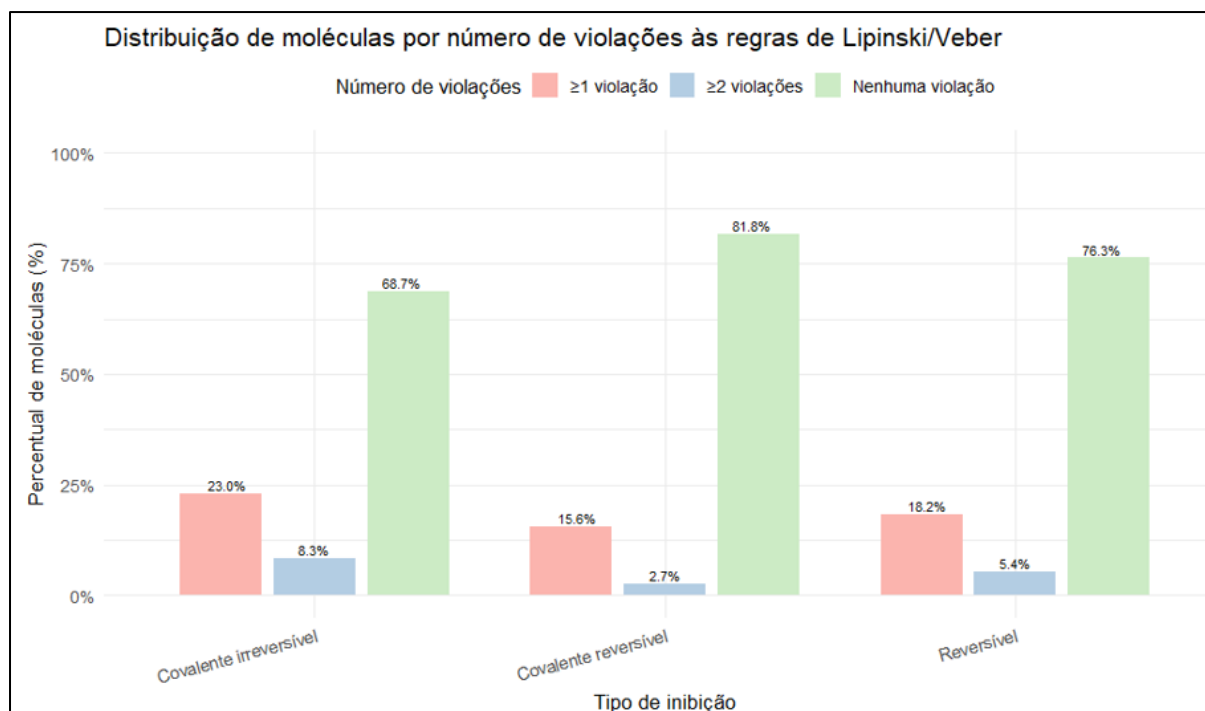


Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Tendo em vista a Tabela 2 e a Figura 11 é perceptível que o perfil de violações é distinto para cada classe de inibidor. Sendo que os inibidores covalentes irreversíveis apresentam as taxas mais elevadas de violação para os parâmetros de TPSA (13,5%) e para Peso Molecular (11,7%). Pode-se inferir que as moléculas desta classe tendem a apresentar maior massa molecular e maior área de superfície polar (TPSA), associadas à presença de grupos polares em sua estrutura. Já para os inibidores covalentes reversíveis e reversíveis convencionais o LogP se mostra um parâmetro mais crítico (8,6% e 12,0% respectivamente), indicando uma tendência a alta lipofilicidade, o que pode impactar negativamente na solubilidade e absorção/penetração. Em contrapartida, as regras com menor percentagem de violação são o número de doadores e aceptores de hidrogênio, com percentuais inferiores a 1%.

Para melhor entendimento e impacto geral dessas violações, avaliou-se quantos compostos em cada classe violaram uma, duas ou mais regras. A distribuição percentual pode ser visualizada na Figura 12.

Figura 13 - Distribuição percentual de moléculas por número de violações às regras de Lipinski e Veber



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Observa-se que a maioria dos compostos apresenta um perfil de *drug-likeness* favorável, sendo perceptível que os compostos que não violam nenhuma regra se sobrepõem àqueles que possuem violações. A classe dos inibidores covalentes reversíveis se destaca, com 81,8% dos compostos livres sem violações das regras de Lipinski e Veber. Contrário a isso, os inibidores covalentes irreversíveis apresentam a menor percentagem de moléculas que não apresentam violações (68,7%) e a maior proporção de compostos com duas ou mais violações (8,3%). Assim em uma campanha de otimização desta classe demandaria maior atenção.

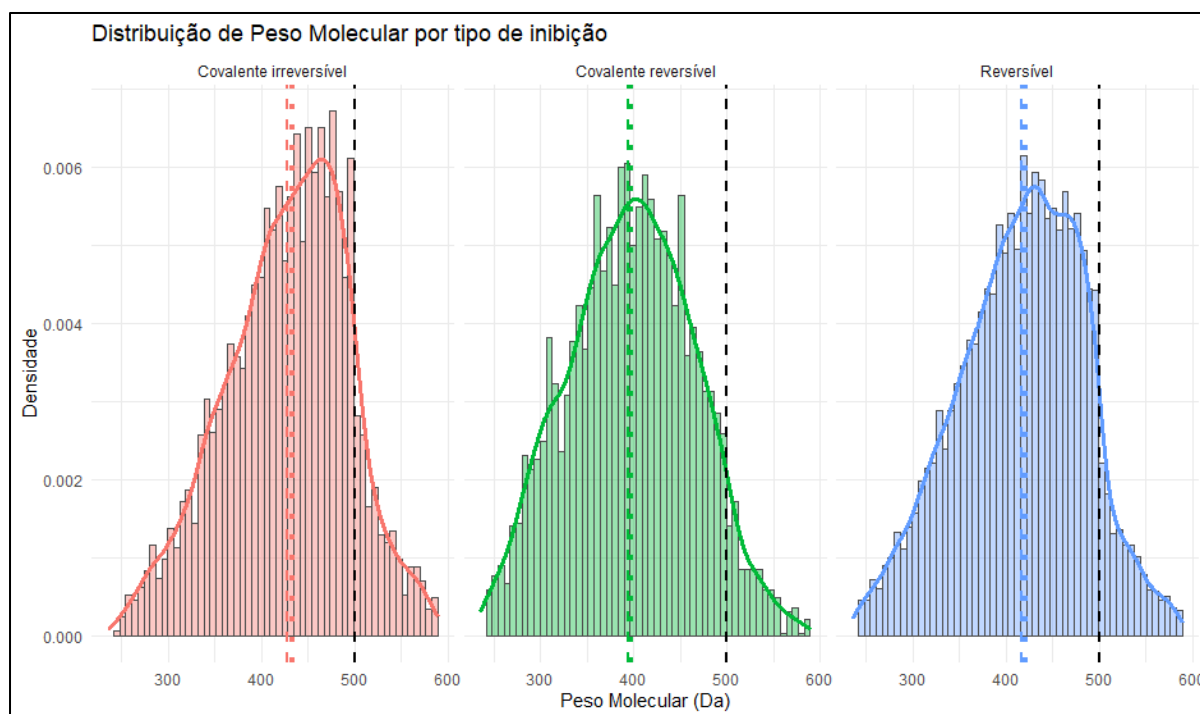
Para uma análise mais detalhada da distribuição das propriedades físico-químicas que compõe a regra de Lipinski, gráficos de densidade distribuição para cada propriedade foram criados e são discutidos a seguir.

4.3.1 Peso molecular

A distribuição dos valores de Peso Molecular (PM) dos inibidores é apresentada por histogramas normalizados sobrepostos por curvas de densidade kernel (Figura 13), considerando os diferentes tipos de inibição. Esse tipo de

representação é amplamente empregado na análise de variáveis contínuas, pois permite avaliar simultaneamente a forma da distribuição, a dispersão dos dados e a comparação entre diferentes grupos (Fiel, 2013; Wicham, 2016). Pela análise do intervalo de maior densidade (*High Density Interval* – HDI – 75%), é possível observar que os compostos analisados estão concentrados nas faixas de 340 Da a 500 Da, sendo que para inibidores covalentes reversíveis essa faixa é menor (306,36-472,57 Da) indicando menor dispersão dos valores de PM quando comparado às demais classes. Esses valores estão condizentes com o preconizado pela Regra dos Cinco de Lipinski para compostos com boa biodisponibilidade oral (Lipinski *et al.*, 2001).

Figura 14 - Distribuição dos valores de Peso Molecular (PM) dos inibidores, apresentada por histogramas normalizados sobrepostos por curvas de densidade kernel, estratificados por tipo de inibição. Inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis são representados em vermelho, verde e azul, respectivamente. Linhas verticais tracejadas indicam a média de cada grupo, enquanto linhas verticais pontilhadas indicam a mediana. A linha vertical pontilhada preta representa o valor limite adotado para o Peso Molecular de acordo com a regra de Lipinski considerada. Para fins de visualização, os gráficos foram limitados à faixa entre os quantis de 1% e 99% dos valores observados.



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

A Tabela 3 resume os parâmetros estatísticos descritivos das distribuições de PM para cada classe de inibidores, incluindo média, mediana, medidas de dispersão e os intervalos de maior densidade (HDI 75%). A análise conjunta desses parâmetros

permite uma caracterização mais robusta da distribuição dos dados, uma vez que o HDI representa a faixa na qual se concentra a maior probabilidade dos valores observados.

Tabela 3 - Parâmetros estatísticos da distribuição do Peso Molecular por tipo de inibição.

Tipo de inibição	N	Média	Med.	Mín.	Máx.	Assi m.	Curt.	HDI 75% inf.	HDI 75% sup.
Covalente irreversível	4.482	428,55	433,55	49,52	973,66	0,26	3,40	347,39	500,62
Covalente reversível	3.481	394,20	396,45	59,07	598,07	-0,16	-0,06	306,36	472,57
Reversível	20.595	416,87	421,44	61,04	1297,29	0,11	2,23	342,35	500,04

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Nota: N = número de compostos; Med. = mediana; - Mín. = valor mínimo; Máx. = valor máximo; Assim. = assimetria; Curt. = curtose, HDI 75% inf. = Intervalo de Maior Densidade Inferior; HDI 75% sup. = Intervalo de Maior Densidade Superior.

Os inibidores covalentes reversíveis apresentam distribuição mais estreita e simétrica, possuindo média de 394,20 Da e mediana de 396,44 Da, além do o HDI 75% situa-se entre 306,36 e 472,57 Da, configurando o intervalo com valores menores entre as três classes avaliadas. Além disso, essa distribuição apresentou baixos valores de assimetria (-0,16) e curtose (-0,06), indicando uma distribuição aproximadamente simétrica e homogênea. A concentração da maior parte dos compostos nessa faixa de PM, integralmente abaixo do limite de 500 Da, reforça o potencial dessa classe para o desenvolvimento de fármacos com perfil favorável de biodisponibilidade oral, além de maior flexibilidade para otimizações estruturais futuras. Isso pode indicar maior potencial de sucesso em fases posteriores do desenvolvimento farmacêutico (Hughes *et al.*, 2008).

Os inibidores covalentes irreversíveis e inibidores reversíveis apresentaram gráficos com valores de curtose mais elevados (3,40 e 2,23, respectivamente), indicando a presença de inibidores com valores extremos de peso molecular. Isso é coerente quando se observa os valores máximo de PM registrados em cada categoria (973,66 Da para inibidores covalentes irreversíveis e 1.297,29 Da para inibidores reversíveis). Inibidores covalentes irreversíveis geralmente requerem grupos reativos adicionais, como epóxidos, aldeídos ou acrilamidas, o que aumenta o peso molecular e a complexidade estrutural (Singh *et al.*, 2011). Vale ressaltar que muitos desses

inibidores foram obtidos a partir da modificação do substrato peptídico. Esses dados reforçam a ideia de que, embora os inibidores irreversíveis possam apresentar maior potência e duração de efeito, sua complexidade pode demandar estratégias adicionais de modificação estrutural para adequação às propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção).

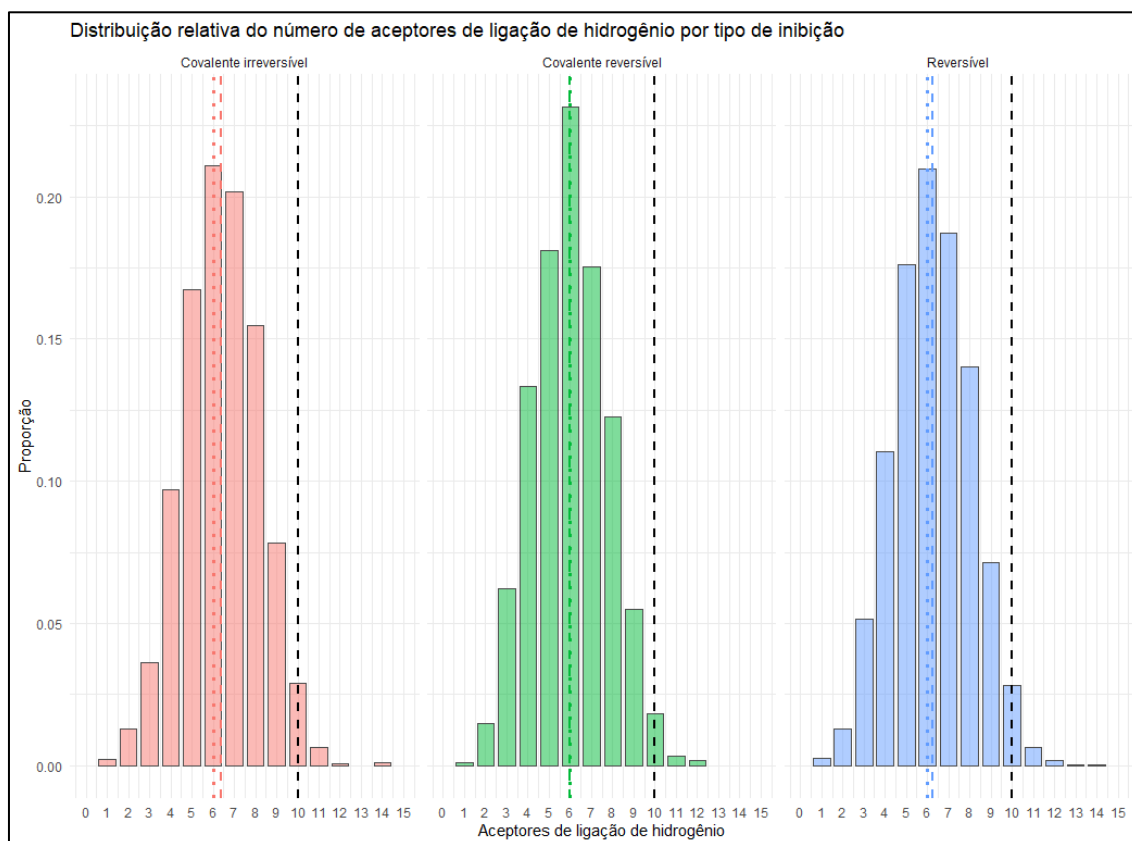
Assim, de modo geral, todas as classes apresentam médias compatíveis com a faixa preconizada por Lipinski para moléculas com boa permeabilidade e biodisponibilidade oral (Lipinski *et al.*, 2001). Contudo, os perfis de dispersão diferem conforme o tipo de inibição: os covalentes reversíveis destacam-se pela maior simetria e homogeneidade, enquanto os irreversíveis e reversíveis mostram maior dispersão, refletindo possível maior variabilidade estrutural. Essa análise sugere que a escolha entre inibidores covalentes reversíveis, covalentes irreversíveis e reversíveis devem considerar não apenas a afinidade com o alvo, mas também o perfil farmacocinético desejado.

4.3.2 Aceptores de ligação de hidrogênio

Os aceptores de ligação de hidrogênio são aqueles átomos e/ou grupos funcionais que podem receber ligações de hidrogênio provenientes de doadores, estes são comumente hidrogênios ligados a átomos eletronegativos, ou seja, é aquele grupo funcional rico em elétrons que recebe a ligação de hidrogênio (O e N) (Rodrigues *et al.*, 2021). A presença de aceptores influencia propriedades como polaridade, solubilidade em meio aquoso e capacidade de interação com o alvo biológico. A quantidade de aceptores de hidrogênio (AH) também faz parte dos critérios estabelecidos pela Regra de Lipinski, que recomenda que moléculas com potencial atividade oral possuam no máximo 10 aceptores (Lipinski *et al.*, 2001).

A Figura 14 mostra a distribuição referente ao número de aceptores de hidrogênio dos inibidores covalente reversíveis, covalente irreversíveis e reversíveis por meio de histogramas enquanto que a Tabela 4 apresenta as estatísticas descritivas referentes a distribuição dessa propriedade.

Figura 15 - Distribuição do número de aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) dos inibidores, representada por histogramas normalizados e estratificados por tipo de inibição. Inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis são indicados em vermelho, verde e azul, respectivamente. Linhas verticais tracejadas correspondem às médias de cada grupo, enquanto linhas verticais pontilhadas indicam as medianas. A linha vertical tracejada preta indica o valor limite adotado para HBD conforme a regra de Lipinski considerada. Por questões de clareza visual, os gráficos foram limitados a valores de até 15 aceptores de ligação de hidrogênio.



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Tabela 4 - Parâmetros estatísticos da distribuição de Aceptores de Hidrogênio por tipo de inibição.

Tipo de inibição	Média	Med.	Mín.	Máx.	Assi m.	Curt.	HDI 75% inf.	HDI 75% sup.
Covalente irreversível	6,38	6	0	16	0,06	0,33	4	8
Covalente reversível	5,99	6	1	12	0,13	-0,22	3	7
Reversível	6,23	6	0	29	0,46	3,25	3	8

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Nota: N = número de compostos; Med. = mediana; Mín. = valor mínimo; Máx. = valor máximo; Assim. = assimetria; Curt. = curtose, HDI 75% inf. = Intervalo de Maior Densidade Inferior; HDI 75% sup. = Intervalo de Maior Densidade Superior.

De modo geral todos os grupos apresentam valores médios semelhantes e mediana igual a seis, indicando um perfil globalmente consistente entre os diferentes tipos de inibição. A proximidade entre média e mediana indica distribuições aproximadamente simétricas, o que está de acordo com os valores encontrados para assimetria e curtose. Uma exceção são os inibidores reversíveis que apresentou uma curtose de 3,25 indicando uma distribuição mais influenciada pela presença de valores extremos. De fato, 1% inibidores desse grupo apresentaram um número de aceptores de ligação de hidrogênio superior a 10, porém com valores bem maiores aos presentes em outros grupos (29 *versus* 16 e 12), o que contribui para esse desvio de curtose. Mais uma vez, as moléculas com maior PM devem ter influenciado essa distribuição.

A análise dos intervalos de maior densidade (HDI 75%) reforça essa similaridade. Para os inibidores covalentes irreversíveis, o HDI 75% situa-se entre 4 e 8 aceptores, enquanto para os covalentes reversíveis o intervalo é ainda mais restrito, variando de 3 a 7. Já os inibidores reversíveis apresentam HDI 75% entre 3 e 8 aceptores. Esses resultados evidenciam que a maior parte dos compostos, independentemente do tipo de inibição, concentra-se em uma faixa considerada adequada segundo os critérios de Lipinski, permanecendo abaixo do limite máximo recomendado.

A Figura 14 confirma esse comportamento: as três curvas são semelhantes, concentradas na faixa de 4 a 8 aceptores, evidenciando uma semelhança geral entre os perfis de ligação de hidrogênio dos diferentes tipos de inibição. Esses resultados indicam que o número de aceptores de ligação de hidrogênio tende a ser relativamente constante entre os tipos de inibição, permanecendo dentro da faixa considerada adequada segundo Lipinski *et al.* (2001), os quais destacam que valores excessivos desse parâmetro podem prejudicar a permeabilidade através de membranas biológicas.

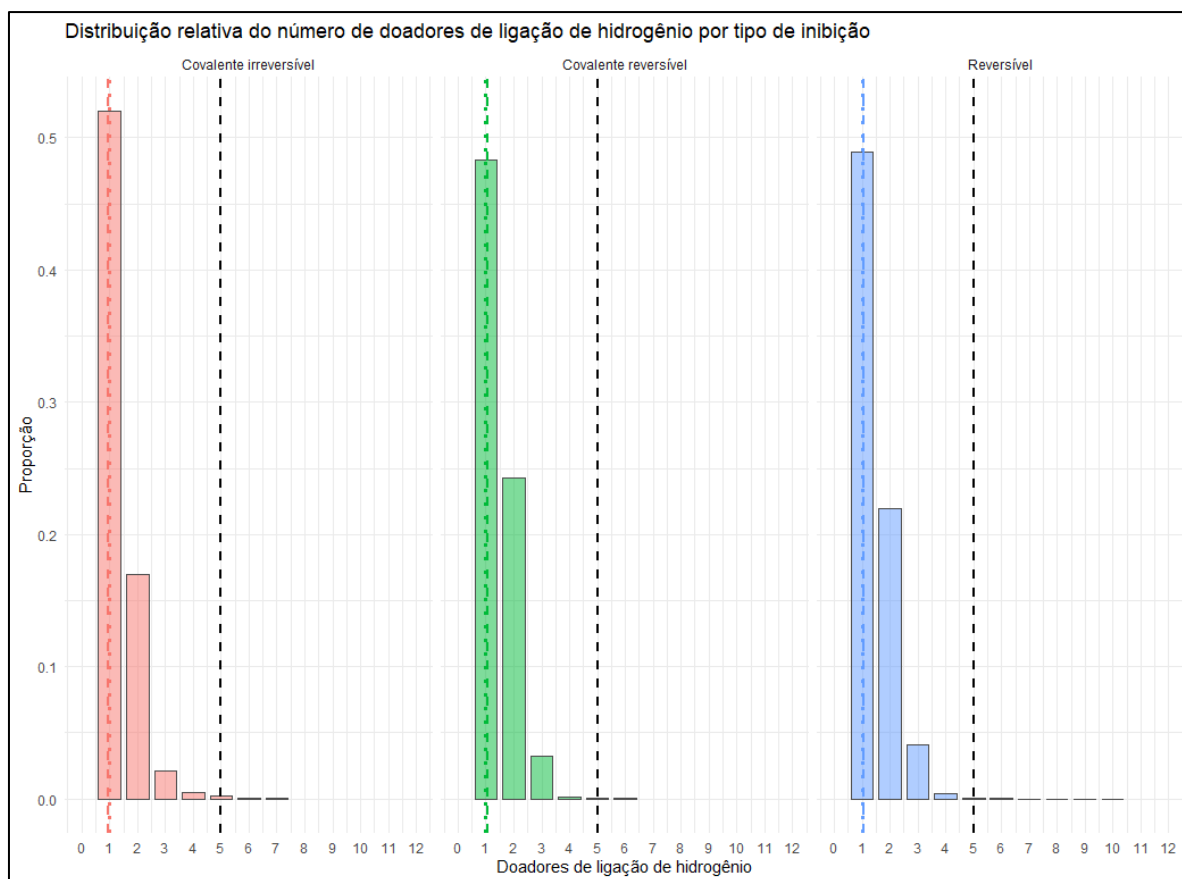
4.3.3 Doadores de ligação de hidrogênio

Assim como os aceptores de ligação de hidrogênio, os doadores de hidrogênio (DH) influenciam a capacidade das moléculas em formar ligações de hidrogênio com proteínas-alvo, assim como afeta diretamente a solubilidade, portanto um número elevado de DH pode comprometer a solubilidade aquosa e permeabilidade da membrana celular, impactando negativamente a biodisponibilidade (Lipinski *et al.*, 2001). Os grupos doadores de hidrogênio consistem em átomos de hidrogênio ligados a átomos eletronegativos, como o oxigênio ou nitrogênio (OH e NH). Normalmente esses grupos estão presentes em álcoois, fenóis, aminas e amidas, e estes desempenham papel fundamental na estabilização de complexos ligante-receptor e na afinidade de ligação com alvos biológicos, uma vez que a satisfação de doadores e aceptores de hidrogênio dentro do sítio ativo contribui energeticamente para a formação do complexo proteína-ligante (Hubbard; Haider, 2010).

Assim, a Regra de Lipinski prediz que o número ideal de DH para compostos com boa absorção oral deve ser igual ou inferior a cinco. Embora grupos doadores e aceptores de hidrogênio contribuam para interações específicas no complexo proteína-ligante, seu excesso aumenta significativamente a polaridade da molécula, reduzindo a permeabilidade através de membranas biológicas e comprometendo a absorção oral. Essa relação é bem estabelecida nos critérios de Lipinski *et al.* (2001), que destacam que valores elevados de doadores e aceptores estão associados à baixa biodisponibilidade.

Nesse contexto, a Figura 15 apresenta a distribuição relativa do número de HBD para os inibidores estratificados por tipo de inibição, enquanto a Tabela 5 resume os parâmetros estatísticos descritivos dessa propriedade.

Figura 16 - Distribuição do número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD) dos inibidores, representada por histogramas normalizados e estratificados por tipo de inibição. Inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis são indicados em vermelho, verde e azul, respectivamente. Linhas verticais tracejadas correspondem às médias de cada grupo, enquanto linhas verticais pontilhadas indicam as medianas. A linha vertical tracejada preta indica o valor limite adotado para HBD conforme a regra de Lipinski considerada.



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Tabela 5 - Parâmetros estatísticos da distribuição de Doadores de Hidrogênio por tipo de inibição.

Tipo de inibição	Média	Med.	Mín.	Máx.	Assim.	Curt.	HDI 75% inf.	HDI 75% sup.
Covalente irreversível	0,95	1	0	7	0,96	2,64	0	1
Covalente reversível	1,08	1	0	6	0,48	0,49	0	2
Reversível	1,08	1	0	12	0,93	4,08	0	2

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Nota: N = número de compostos; Med. = mediana; Mín. = valor mínimo; Máx. = valor máximo; Assim. = assimetria; Curt. = curtose, HDI 75% inf. = Intervalo de Maior Densidade Inferior; HDI 75% sup. = Intervalo de Maior Densidade Superior.

Os histogramas indicam que as três classes apresentam distribuições semelhantes, com predominância de compostos contendo 1 doador de ligação de hidrogênio, evidenciado pela média comum aos grupos. As medianas iguais a 1 reforçam que a maior parte dos compostos analisados se concentra em baixos valores de HBD. As médias também permanecem próximas entre as classes, variando de 0,95 (inibidores covalentes irreversíveis) a 1,08 (inibidores covalentes reversíveis e reversíveis), sugerindo um perfil geral homogêneo quanto a essa propriedade.

A análise do intervalo de maior densidade (HDI 75%) complementa essa interpretação. Para os inibidores covalentes irreversíveis, o HDI 75% concentra-se entre 0 e 1, indicando predominância mais acentuada de compostos com até um doador. Para os inibidores covalentes reversíveis e reversíveis, o HDI 75% estende-se de 0 a 2, refletindo uma proporção discretamente maior de moléculas contendo dois doadores de hidrogênio, o que contribui para o leve aumento das médias nessas classes.

Apesar do perfil geral favorável, observa-se a presença de valores máximos superiores no grupo dos inibidores reversíveis (máximo = 12), além de curtose mais elevada (4,08), sugerindo que uma pequena fração de compostos apresenta valores extremos de HBD. Esse comportamento é compatível com distribuições influenciadas por poucos compostos mais polares e estruturalmente mais complexos. Ainda assim, tais valores extremos não representam o padrão predominante do conjunto, uma vez que a maior parte dos inibidores permanece concentrada nas faixas indicadas pelos intervalos HDI e pelas medianas.

Considerando a regra estabelecida por Lipinski e colaboradores (2001) percebe-se que as três classes de inibidores se enquadram quanto ao parâmetro de DH, com poucos compostos violando a regra. Portanto, independentemente do mecanismo de inibição, os compostos analisados apresentam perfil molecular condizente com requisitos de viabilidade farmacocinética.

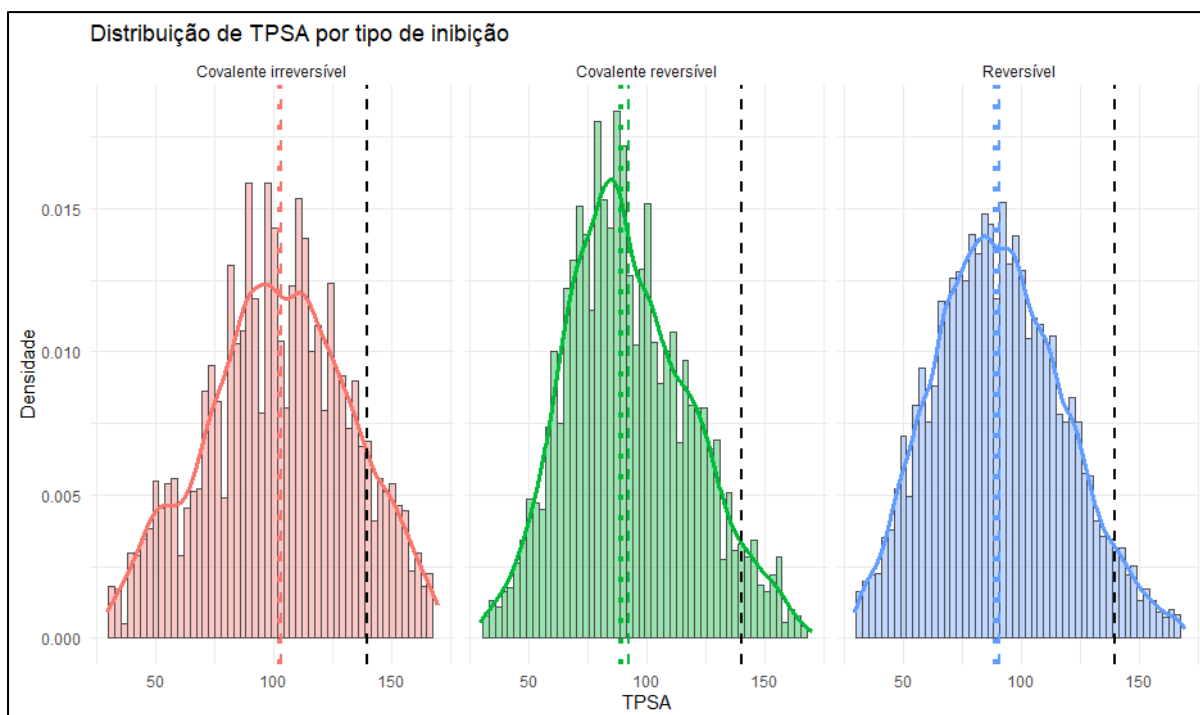
4.3.4 Área de superfície polar

A Área de Superfície Polar Topológica (TPSA – *Topological Polar Surface Area*) é um parâmetro molecular definido como a soma das contribuições das

superfícies polares associadas principalmente a átomos eletronegativos, como oxigênio e nitrogênio, incluindo os hidrogênios a eles ligados, sendo expressa em Å² (Eriksson et al., 2000). A TPSA está diretamente relacionada à capacidade da molécula em formar ligações de hidrogênio e, conseqüentemente, influencia propriedades farmacocinéticas como permeabilidade, absorção e biodisponibilidade oral. Segundo os critérios propostos por Veber e colaboradores (2002), compostos com TPSA ≤ 140 Å² apresentam maior tendência a boa absorção oral, enquanto valores acima desse limite estão associados à menor permeabilidade e possível redução da absorção.

A Figura 16 apresenta a distribuição dos valores de TPSA para as três classes de inibidores avaliadas (covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis), por meio de histogramas normalizados sobrepostos a curvas de densidade kernel. A Tabela 6 reúne os parâmetros estatísticos descritivos correspondentes. Observa-se que os três grupos exibem concentrações predominantes de compostos em faixas inferiores a 140 Å², evidenciando compatibilidade geral com o critério de Veber para absorção oral.

Figura 17 - Distribuição dos valores de Área de Superfície Polar (TPSA) dos inibidores, apresentada por histogramas normalizados sobrepostos por curvas de densidade kernel, estratificados por tipo de inibição. Inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis são representados em vermelho, verde e azul, respectivamente. Linhas verticais tracejadas indicam a média de cada grupo, enquanto linhas verticais pontilhadas indicam a mediana. A linha vertical pontilhada preta representa o valor limite adotado para a TPSA de acordo com a regra de Lipinski considerada. Para fins de visualização, os gráficos foram limitados à faixa entre os quantis de 1% e 99% dos valores observados.



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Tabela 6 - Parâmetros estatísticos da distribuição de TPSA por tipo de inibição.

Tipo de inibição	Média	Med.	Mín.	Máx.	Assim.	Curt.	HDI 75% inf.	HDI 75% sup.
Covalente irreversível	103,61	102,73	0	255,98	0,14	0,10	63,6	140,38
Covalente reversível	92,43	89,07	17,07	227,15	0,45	0,41	59,04	120,65
Reversível	90,83	89,17	0	534,03	0,70	4,56	57,38	123,39

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Nota: N = número de compostos; Med. = mediana; Mín. = valor mínimo; Máx. = valor máximo; Assim. = assimetria; Curt. = curtose, HDI 75% inf. = Intervalo de Maior Densidade Inferior; HDI 75% sup. = Intervalo de Maior Densidade Superior.

As medidas de tendência central mostram que os inibidores covalentes irreversíveis apresentam TPSA médio de 103,61 Å² e mediana de 102,73 Å², enquanto os covalentes reversíveis apresentam média de 92,43 Å² e mediana de 89,07 Å². Os inibidores reversíveis, por sua vez, apresentam média de 90,83 Å² e mediana de 89,17 Å². Esses valores indicam que, apesar de pequenas variações entre as classes, o perfil central de TPSA permanece relativamente próximo, com leve tendência a valores mais altos para os inibidores covalentes irreversíveis. Embora essa diferença não seja determinante por si só, ela indica que os inibidores covalentes irreversíveis possuem menor margem estrutural antes de ultrapassar o limite recomendado de TPSA.

A avaliação do intervalo de maior densidade (HDI 75%) reforça diferenças relevantes entre as classes. Os inibidores covalentes irreversíveis apresentam HDI 75% entre 63,6 e 140,38 Å², com limite superior praticamente coincidente com o valor máximo recomendado por Veber. Esse resultado sugere que essa classe inclui uma fração maior de compostos próximos ao limiar de 140 Å² e, portanto, com maior propensão a extrapolar esse limite quando comparada às demais. Sob a perspectiva farmacocinética, essa proximidade pode representar uma limitação potencial de permeabilidade, especialmente em estratégias que envolvam aumento adicional de polaridade (Prasanna; Doerksen, 2009). Em contraste, os inibidores covalentes reversíveis apresentam HDI 75% entre 59,04 e 120,65 Å², enquanto os inibidores reversíveis apresentam HDI 75% entre 57,38 e 123,39 Å², indicando maior concentração de compostos em faixas confortavelmente abaixo do limite proposto.

Além disso, os inibidores reversíveis apresentaram curtose elevada (4,56), compatíveis com a presença de valores extremos de TPSA, evidenciada pelo máximo de 534,03 Å². Esse comportamento sugere que uma pequena parcela de compostos desse grupo apresenta perfil altamente polar, influenciando significativamente a forma da distribuição. Ressalta-se que esta mesma classe inclui também compostos com maiores valores de peso molecular, o que pode contribuir para o aumento de TPSA devido ao maior número potencial de heteroátomos e grupos funcionais polares. Essa característica pode impactar o balanço entre solubilidade e permeabilidade, o que se relaciona com a tendência observada de menores valores de LogP para parte desses compostos, conforme discutido adiante.

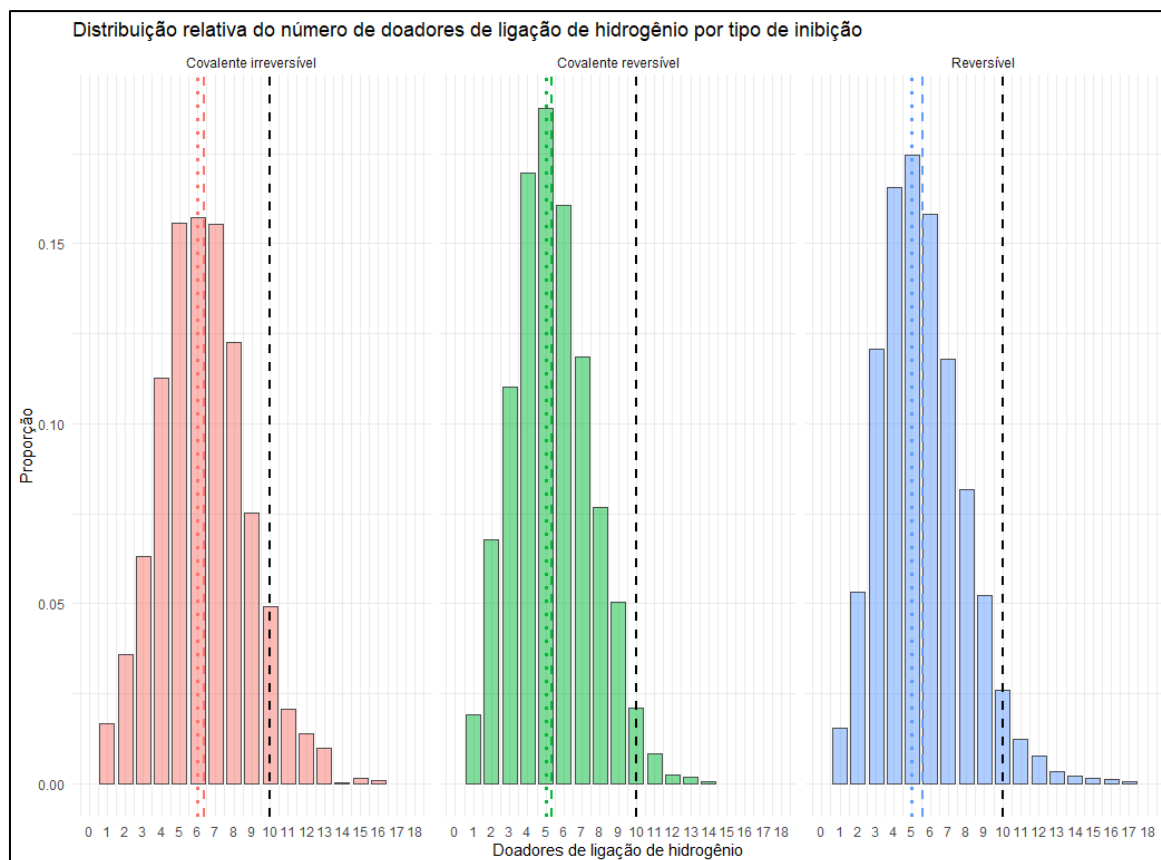
De modo geral, os resultados sugerem que a maioria dos inibidores das três classes apresenta valores de TPSA compatíveis com boas propriedades de absorção, especialmente no intervalo de maior densidade observado. Entretanto, os inibidores covalentes irreversíveis demonstram maior proximidade do limite de Veber, o que sugere que, sob a perspectiva de permeabilidade oral, os inibidores covalentes reversíveis e reversíveis apresentam maior margem de segurança estrutural (Abonyi et al., 2022).

4.3.5 Ligações Rotacionáveis

O número de ligações rotacionáveis está relacionado à flexibilidade conformacional, característica fundamental para a conformação da molécula ao sítio ativo da cruzaína, ajustando-se às interações necessárias para a inibição eficaz sendo que, moléculas com número moderado de ligações rotacionáveis tendem a apresentar melhor equilíbrio entre ajuste estrutural no alvo e manutenção de uma conformação favorável para a ligação. Por outro lado, excesso de flexibilidade pode reduzir a afinidade devido ao aumento da entropia conformacional, enquanto rigidez excessiva pode limitar interações importantes no sítio ativo. (Wagner *et al.*, 2021).

A Tabela 7 apresenta as estatísticas descritivas referentes ao número de ligações rotacionáveis dos compostos analisados por tipo de inibição, enquanto a Figura 17 mostra a distribuição dessa propriedade por meio de histogramas normalizados.

Figura 18 - Distribuição do número de ligações rotacionáveis dos inibidores, representada por histogramas normalizados e estratificados por tipo de inibição. Inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis são indicados em vermelho, verde e azul, respectivamente. Linhas verticais tracejadas correspondem às médias de cada grupo, enquanto linhas verticais pontilhadas indicam as medianas. A linha vertical tracejada preta indica o valor limite adotado conforme a regra de Veber. Por questões de clareza visual, os gráficos foram limitados a valores de até 18 ligações rotacionáveis.



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Tabela 7 - Parâmetros estatísticos da distribuição de Ligações Rotacionáveis por tipo de inibição.

Tipo de inibição	Média	Med.	Mín.	Máx.	Assim.	Curt.
Covalente irreversível	6,38	6	0	40	1,95	13,57
Covalente reversível	5,32	5	0	14	0,33	0,05
Reversível	5,56	5	0	35	1,14	5,10

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Nota: N = número de compostos; Med. = mediana; Mín. = valor mínimo; Máx. = valor máximo; Assim. = assimetria; Curt. = curtose.

De modo geral, observa-se que as três classes apresentam valores médios e medianos próximos, variando entre 5 e 6 ligações rotacionáveis, indicando que a maior parte dos compostos possui grau de flexibilidade compatível com perfis esperados para moléculas bioativas com potencial farmacocinético. Apesar disso, os grupos covalentes irreversível e reversível apresentaram maior dispersão e assimetria positiva, evidenciada pelos valores de assimetria (1,95 e 1,14, respectivamente) e pela presença de poucos compostos com números extremamente altos de ligações rotacionáveis. Isso também é refletido pelos valores máximos observados nessas classes (40 e 35 ligações rotacionáveis), sugerindo a ocorrência de outliers altamente flexíveis.

Uma explicação plausível para esse comportamento é que esses compostos correspondam a ligantes de maior tamanho molecular, possivelmente estruturas alongadas e/ou peptidomiméticas, as quais tendem a apresentar simultaneamente maior peso molecular e maior número de ligações simples rotacionáveis. Essa hipótese é coerente com o fato de a cruzaina ser uma protease, cujo sítio ativo apresenta subsítios de reconhecimento (por exemplo, S1, S2 e S3), frequentemente favorecendo ligantes capazes de ocupar múltiplas regiões e mimetizar aspectos do substrato peptídico (Santos et al., 2022; Jasinski et al., 2024; Cianni et al., 2019). Assim, compostos maiores e mais flexíveis podem ter sido descritos na literatura com o objetivo de explorar interações adicionais no sítio ativo, ainda que isso aumente sua complexidade estrutural e reduza a viabilidade farmacocinética.

Do ponto de vista de desenvolvimento de fármacos, a presença desses valores extremos deve ser interpretada com cautela, pois moléculas muito flexíveis tendem a apresentar desafios adicionais, como menor previsibilidade conformacional, penalidade entrópica elevada e potenciais limitações de absorção oral. Ainda assim, segundo à Regra de Veber as moléculas com melhor biodisponibilidade oral são aquelas com ≤ 10 ligações rotacionais (Veber *et al.*, 2002), sendo assim, os compostos analisados mantêm perfis adequados de flexibilidade molecular.

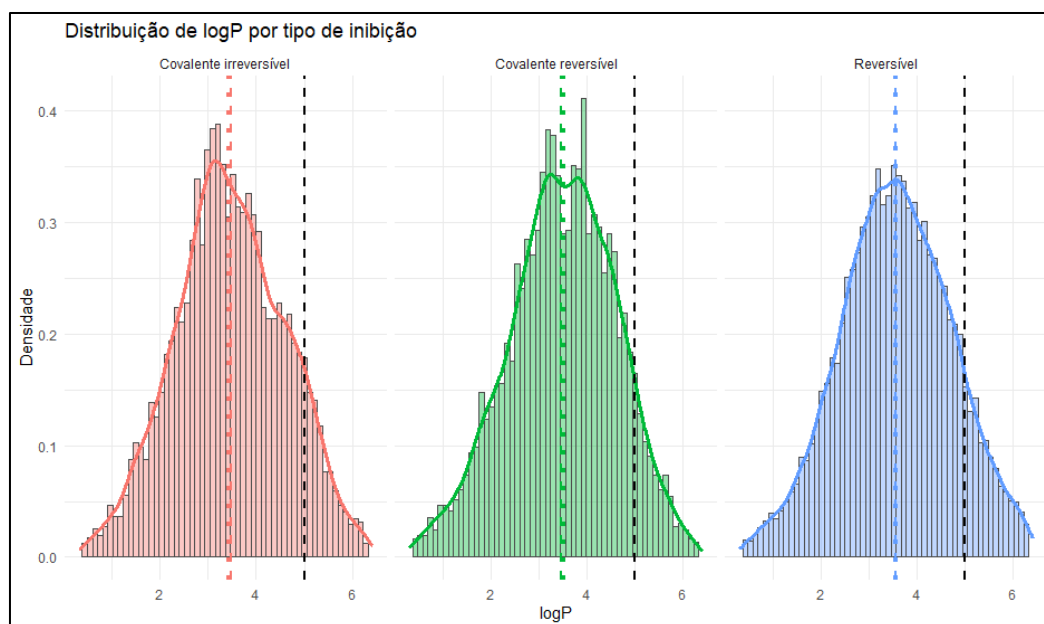
4.3.6 LogP

O parâmetro LogP (logaritmo do coeficiente de partição octanol/água) quantifica a lipofilicidade de uma molécula e constitui um descritor central na

caracterização de propriedades farmacocinéticas, uma vez que influencia diretamente a permeabilidade através de membranas biológicas, a solubilidade em meio aquoso e a tendência à bioacumulação. No contexto da Regra dos Cinco de Lipinski, compostos com maior probabilidade de apresentar boa absorção oral tendem a apresentar $\text{LogP} \leq 5$ (Lipinski et al., 2001).

A distribuição dos valores de LogP dos compostos analisados está apresentada na Figura 18 por meio de histogramas normalizados sobrepostos por curvas de densidade kernel, estratificada por tipo de inibição. A Tabela 8 reúne os parâmetros estatísticos descritivos correspondentes.

Figura 19 - Distribuição dos valores de LogP dos inibidores, apresentada por histogramas normalizados sobrepostos por curvas de densidade kernel, estratificados por tipo de inibição. Inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis são representados em 60 vermelho, verde e azul, respectivamente. Linhas verticais tracejadas indicam a média de cada grupo, enquanto linhas verticais pontilhadas indicam a mediana. A linha vertical pontilhada preta representa o valor limite adotado para LogP de acordo com a regra de Lipinski considerada. Para fins de visualização, os gráficos foram limitados à faixa entre os quantis de 1% e 99% dos valores observados.



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Tabela 8 - Parâmetros estatísticos da distribuição de LogP por tipo de inibição.

Tipo de inibição	Média	Med.	Mín.	Máx.	Assim.	Curt.	HDI 75% inf.	HDI 75% sup.
Covalente irreversível	3,47	3,42	-2,19	12,46	0,17	1,81	2,16	4,94
Covalente reversível	3,46	3,51	3,36	8,40	-0,41	0,81	2,37	5,00
Reversível	3,56	3,56	-6,39	11,69	-0,18	1,36	2,16	4,94

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Nota: N = número de compostos; Med. = mediana; Mín. = valor mínimo; Máx. = valor máximo; Assim. = assimetria; Curt. = curtose, HDI 75% inf. = Intervalo de Maior Densidade Inferior; HDI 75% sup. = Intervalo de Maior Densidade Superior.

De modo geral, observa-se elevada semelhança entre as três classes, com valores médios e medianos próximos entre si. Os inibidores covalentes irreversíveis apresentam média de 3,47 e mediana de 3,42, os covalentes reversíveis média de 3,46 e mediana de 3,51, enquanto os inibidores reversíveis apresentam média e mediana coincidentes (3,56). Esses valores indicam que, em termos centrais, a lipofilicidade dos compostos permanece estável independentemente do mecanismo de inibição.

As distribuições observadas na Figura 18 corroboram esse comportamento, apresentando curvas semelhantes e com predominância de compostos na faixa intermediária de LogP. Os valores reduzidos de assimetria e curtose apresentados na Tabela 8 reforçam um perfil geral equilibrado para essa propriedade, com diferenças discretas entre grupos. Nesse sentido, o grupo de inibidores covalentes irreversíveis apresenta assimetria levemente positiva (0,17), compatível com maior extensão da cauda à direita. Por outro lado, os inibidores covalentes reversíveis exibem assimetria negativa (-0,41), sugerindo a presença de uma cauda relativamente mais pronunciada em direção a valores menores. Já os inibidores reversíveis apresentam assimetria próxima de zero (-0,18), evidenciando distribuição globalmente mais centrada.

A análise do intervalo de maior densidade (HDI 75%) evidencia diferenças pontuais. Os inibidores covalentes reversíveis apresentam limite inferior do HDI deslocado para valores mais elevados (2,37) quando comparados aos covalentes irreversíveis e reversíveis (2,16), sugerindo que a faixa de maior concentração de compostos nesse grupo tende a incluir valores mínimos de LogP ligeiramente

maiores. Ainda assim, o limite superior do HDI permanece próximo entre as classes (variando de 4,94 a 5,00), indicando convergência na faixa principal de lipofilicidade.

Embora a maioria dos compostos se concentre dentro do intervalo recomendado por Lipinski ($\text{LogP} \leq 5$), observa-se a presença de valores extremos, refletidos pelos máximos elevados registrados principalmente para os grupos covalentes irreversíveis (12,46) e reversíveis (11,69). Esses valores sugerem a existência de uma pequena fração de compostos altamente lipofílicos, com potencial maior de apresentar baixa solubilidade e comportamento farmacocinético desfavorável. Entretanto, considerando que a maior parte das distribuições permanece concentrada abaixo do limite estabelecido, tais extremos não caracterizam o perfil predominante do conjunto.

Esses resultados demonstram que os compostos, independentemente do tipo de inibição, mantêm perfil lipofílico semelhante, com valores de LogP compatíveis com os limites estabelecidos pela Regra dos Cinco de Lipinski ($\text{LogP} \leq 5$) para boa permeabilidade e absorção oral (Lipinski *et al.*, 2001).

4.4 ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E DESEMPENHO NO DOCKING

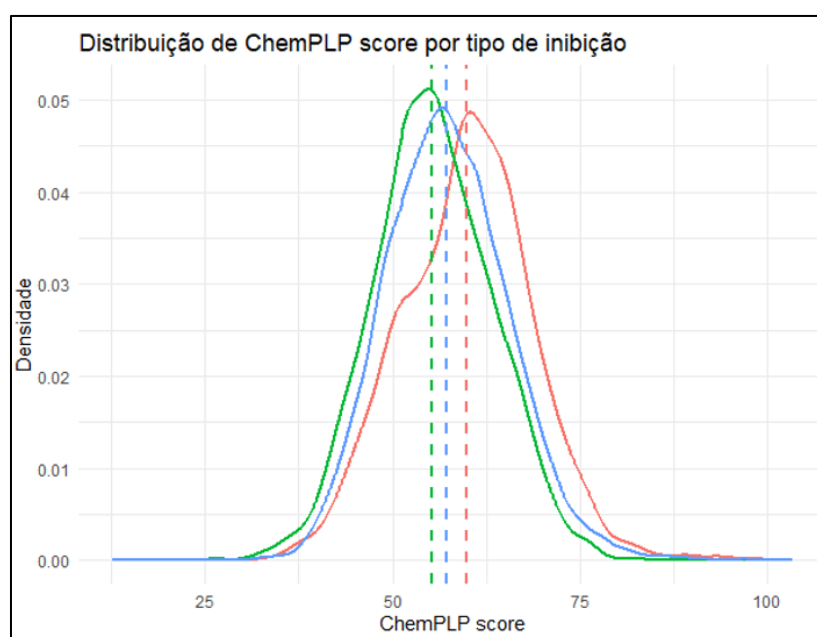
O *docking* molecular é uma técnica computacional amplamente utilizada na química medicinal e no planejamento racional de fármacos pois permite avaliar a afinidade e o modo de interação dos compostos testados com o sítio ativo da proteína alvo (Agu *et al.*, 2023). O método simula conformações e orientações diversas do ligante no sítio ativo da proteína alvo, atribuindo uma pontuação denominada de *score function* que estima a estabilidade do complexo formado (Jones *et al.*, 1997).

No presente estudo empregou-se o software GOLD (*Genetic Optimization for Ligand Docking*), que faz uso de algoritmos genéticos para explorar superfícies de interação entre ligantes flexíveis e sítios ativos de proteínas, utilizando a função de pontuação ChemPLP, que considera interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, complementaridade estérica e penalidades por colisões ou desalinhamento geométrico (CCDC, 2025). Pontuações mais altas indicam maior afinidade prevista e potencial de ligação mais estável (Jones *et al.*, 1997). Dessa forma, a correlação entre

esses valores, parâmetros físico-químicos e classe de inibidor poderia fornecer *insights* sobre tendências estruturais que favorecem a interação ligante-proteína.

A Tabela 9 apresenta os parâmetros estatísticos descritivos dos valores de pontuação do *docking* (ChemPLP) para as três classes de inibidores, enquanto a Figura 19 ilustra a distribuição dos scores por curvas de densidade kernel. Observa-se que os grupos apresentam distribuições com formatos semelhantes e valores reduzidos de assimetria e curtose, sugerindo que as diferenças entre os tipos de inibição não decorrem de mudanças expressivas no formato global das distribuições, mas principalmente de deslocamentos nas medidas centrais.

Figura 20 - Gráfico de densidade representando a distribuição de ChemPLP score para os três tipos de inibição



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Tabela 9 - Parâmetros estatísticos da distribuição de ChemPLP score por tipo de inibição.

Tipo de inibição	Média	Med.	Mín.	Máx.	Assim.	Curt.
Covalente irreversível	59,84	60,13	20,65	103,40	0,13	0,59
Covalente reversível	55,31	55,15	16,52	83,20	0,01	0,08
Reversível	57,22	56,94	12,75	97,75	0,29	0,51

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Nota: N = número de compostos; Med. = mediana; Mín. = valor mínimo; Máx. = valor máximo; Assim. = assimetria; Curt. = curtose.

De acordo com a Tabela 9, os inibidores covalentes irreversíveis apresentaram média de 59,84, os reversíveis média de 57,22, enquanto os covalentes reversíveis exibiram valores médios mais baixos (55,31). Embora as diferenças entre as médias não sejam expressivas em termos absolutos, observa-se uma tendência consistente de maiores scores para os inibidores covalentes irreversíveis, seguidos pelos reversíveis, ao passo que os covalentes reversíveis apresentaram pontuações menores dentro do conjunto analisado.

É importante destacar que o *docking* convencional aplicado neste estudo estima predominantemente a complementaridade estérica e as interações intermoleculares não covalentes, não sendo projetado para modelar explicitamente a formação de ligações covalentes entre ligante e alvo (Jones *et al.*, 1997; Huang; Shoichet; Irwin, 2006; Morris *et al.*, 2009). Dessa forma, a interpretação dos scores deve considerar que moléculas classificadas como covalentes podem não apresentar vantagem explícita no *docking* em relação às moléculas reversíveis, uma vez que o mecanismo real de ação envolve etapas adicionais não capturadas pela função de pontuação. Além disso, essas representam aproximações e podem não reproduzir de forma precisa a afinidade experimental, especialmente em séries químicas estruturalmente diversas (Perola *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2021).

Apesar dessas limitações, as diferenças observadas nas médias foram estatisticamente avaliadas. Considerando a desigualdade de variâncias entre os grupos, foi aplicada ANOVA de Welch, que indicou diferença estatisticamente significativa entre os tipos de inibição ($F(2, 6923) = 296, p < 0,001$). Em seguida, o teste post hoc de Games–Howell evidenciou que todas as comparações par a par apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 10): covalentes irreversíveis apresentaram scores médios superiores aos covalentes reversíveis (diferença média = 4,53; $p\text{-ajustado} < 0,001$) e aos reversíveis (diferença média = 2,63; $p\text{-ajustado} < 0,001$), enquanto os reversíveis superaram os covalentes reversíveis (diferença média = 1,90; $p\text{-ajustado} < 0,001$). Esses resultados confirmam que, mesmo com sobreposição parcial das distribuições, os grupos possuem centros de distribuição distintos.

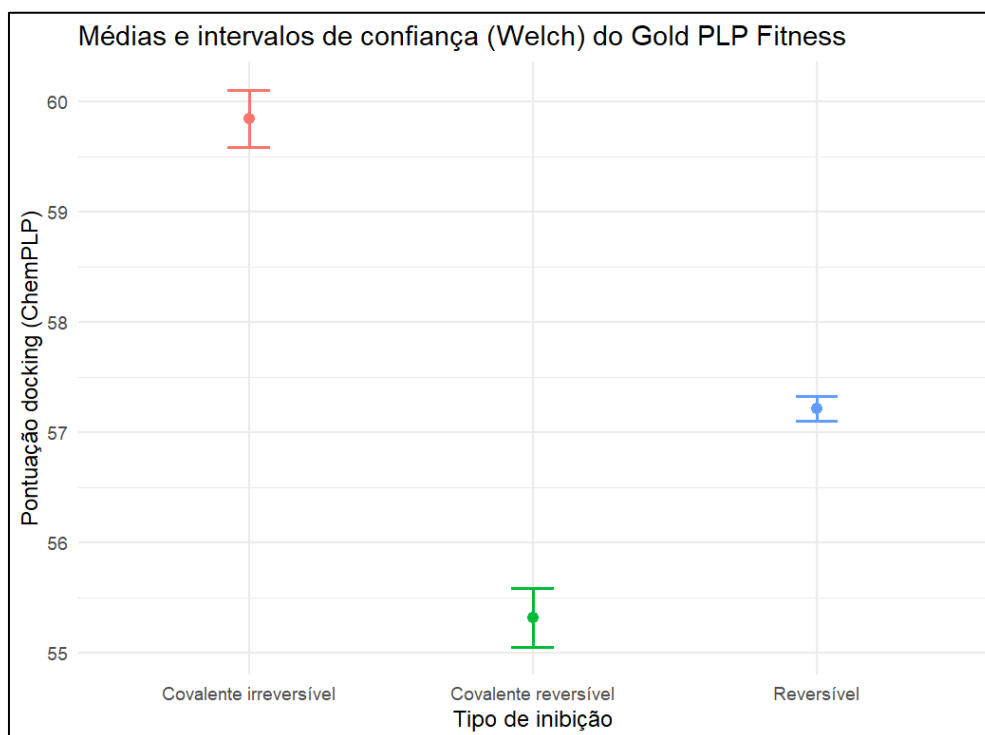
Tabela 10 - Comparações múltiplas dos valores de pontuação obtido no docking entre os diferentes grupos de inibidores. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de Welch, seguida de teste post hoc de Games-Howell, com intervalos de confiança de 95%.

Comparação	Diferença Média	IC _{95%}	p-ajustado.
Covalente irreversível x Covalente reversível	-4,53	[-4,97; -4,09]	< 0,001
Covalente irreversível x Reversível	-2,63	[-2,97; -2,29]	< 0,001
Covalente reversível x Reversível	1,90	[1,56; 2,24]	< 0,001

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Para fins de visualização, a Figura 20 apresenta as médias da pontuação de *docking* acompanhadas de seus intervalos de confiança de 95%, calculados segundo o critério de Welch, evidenciando separação clara entre as médias dos três grupos. Esse padrão indica consistência entre os resultados inferenciais e a análise visual das distribuições: os covalentes irreversíveis obtiveram maior score médio, seguidos pelos reversíveis, enquanto os covalentes reversíveis apresentaram scores menores.

Figura 21 - Médias dos valores de pontuação de *docking* dos inibidores, estratificadas por tipo de inibição, acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança de 95% calculados segundo o critério de Welch. Inibidores covalentes irreversíveis, covalentes reversíveis e reversíveis são indicados em vermelho, verde e azul, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Em termos interpretativos, esses achados sugerem que os inibidores covalentes irreversíveis, no conjunto analisado, apresentam maior compatibilidade geométrica e intermolecular com o sítio de ligação avaliado, refletida por pontuações mais altas. No entanto, deve-se ressaltar que a classificação dos compostos quanto ao tipo de inibição não implica necessariamente maior pontuação no *docking*, pois o método não incorpora a contribuição energética e mecanística da formação da ligação covalente (Jain, 1996). Assim, a diferença estatística detectada pode refletir tendências estruturais associadas às classes químicas mais representadas em cada grupo (por exemplo, maior complementaridade estérica, maior número de interações intermoleculares ou diferenças na distribuição de grupos funcionais), e não necessariamente maior eficácia farmacológica no contexto experimental. Dessa forma, os resultados de *docking* devem ser interpretados como uma métrica comparativa de afinidade prevista, sendo mais informativos quando combinados a outros descritores físico-químicos e análises estruturais (Korb; Stützel; Exner, 2009).

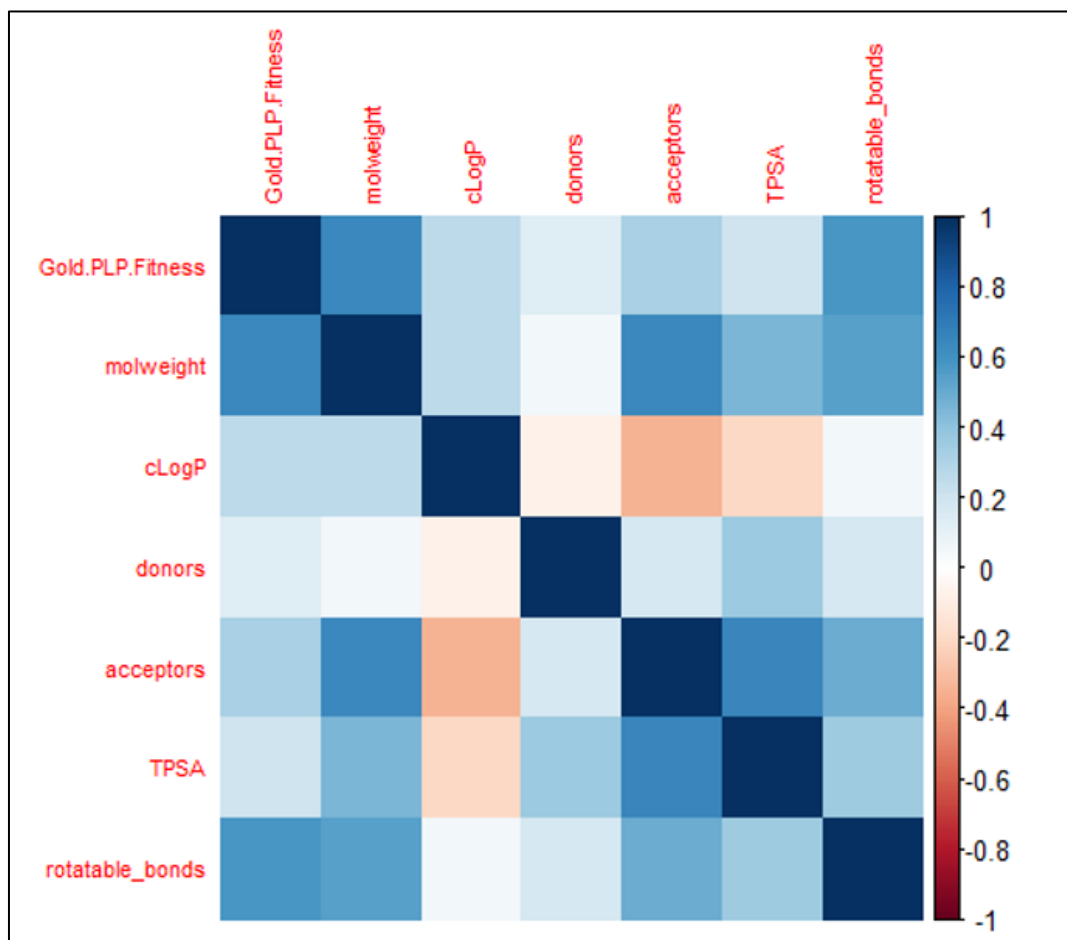
De modo geral, embora o *docking* convencional empregado não modele explicitamente a formação de ligações covalentes, os resultados obtidos indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os tipos de inibição. Em média, os inibidores covalentes irreversíveis apresentaram maiores pontuações de *docking* (ChemPLP), assim, considerando que funções de pontuação em *docking* estimam a afinidade de ligação com base em componentes energéticos associados a interações estéricas e intermoleculares não covalentes (Jain, 1996; Meng *et al.*, 2011). Portanto, maiores pontuações podem refletir maior estabilização predita do complexo proteína-ligante no modelo utilizado., seguidos pelos inibidores reversíveis, enquanto os covalentes reversíveis apresentaram scores inferiores. Esses achados reforçam que, mesmo com limitações metodológicas, as classes exibem perfis distintos de interação no modelo computacional, motivando a investigação da relação entre propriedades físico-químicas e pontuação de *docking*, discutida a seguir.

4.4.1 Correlação entre propriedades físico-químicas e pontuação do *Docking*

Para avaliar a influência das propriedades físico-químicas na pontuação obtida no *docking* molecular, foi construída uma matriz de correlação de Pearson entre o score ChemPLP e os descritores moleculares selecionados (Figura 21). Essa análise

teve como objetivo investigar de que forma características intrínsecas dos ligantes podem influenciar seu desempenho no modelo computacional empregado.

Figura 22 - Mapa de calor das correlações de Pearson entre a pontuação de *docking* (Gold.PLP.Fitness) e descritores moleculares selecionados. Correlações positivas aparecem em azul; negativas, em vermelho; intensidade proporcional ao coeficiente.



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

De modo geral, observa-se que o *score* ChemPLP apresentou correlação positiva moderada com o peso molecular e com o número de ligações rotacionáveis. Esse comportamento indica que, no conjunto analisado, moléculas maiores e estruturalmente mais flexíveis tendem a apresentar valores de *score* ligeiramente mais elevados, possivelmente em função do maior número de interações potenciais que podem ser estabelecidas com o sítio ativo da enzima.

Entretanto, embora o peso molecular e o número de ligações rotacionáveis apresentem correlação positiva com o *score*, esse resultado não deve ser interpretado como indicativo direto de maior confiabilidade ou afinidade real. Ligantes altamente flexíveis aumentam a complexidade da busca conformacional, o que pode

comprometer a precisão das predições de *docking*, mesmo quando valores elevados de score são observados (Teague, 2003). Assim, o aumento do score pode refletir principalmente a capacidade do algoritmo em identificar múltiplas interações possíveis, e não necessariamente uma interação mais estável ou biologicamente relevante.

Em relação às propriedades associadas à polaridade, o LogP apresentou correlação negativa com o número de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, bem como com a área de superfície polar topológica (TPSA). Esse comportamento é esperado, uma vez que o aumento da polaridade molecular tende a reduzir a lipofilicidade do composto. A TPSA, por sua vez, é definida como a soma das contribuições de átomos polares, como nitrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo, refletindo diretamente a presença de grupos capazes de estabelecer interações polares (Ertl; Rohde; Selzer, 2000).

De forma geral, as correlações entre o score de *docking* e descritores físico-químicos isolados variaram de fracas a moderadas, o que está de acordo com a literatura, uma vez que as funções de pontuação buscam capturar a complementariedade tridimensional entre ligante e receptor, levando em consideração aspectos tridimensionais como distâncias, ângulos e geometria das interações, o que torna essa abordagem inerentemente mais complexa do que descritores unidimensionais (Halperin et al., 2002).

Tabela 11 - Correlação entre as propriedades analisadas em relação às três classes de inibidores.

Tipo de Inibição	Propriedade	Correlação
Covalente Irreversível	Peso molecular	0,6766141
	Ligações rotacionáveis	0,5859308
	Aceptores de hidrogênio	0,3829965
	TPSA	0,3503239
	LogP	0,3049963
	Doadores de hidrogênio	0,2259684
Covalente Reversível	Peso molecular	0,6407226
	Ligações rotacionáveis	0,5609925
	Aceptores de hidrogênio	0,3216749
	TPSA	0,3145599
	LogP	0,136986
	Doadores de hidrogênio	0,1113266
Reversível	Peso molecular	0,6309947
	Ligações rotacionáveis	0,5825185
	Aceptores de hidrogênio	0,3097027
	TPSA	0,2483788
	LogP	0,1589882
	Doadores de hidrogênio	0,1356647

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Ao analisar as correlações separadamente por tipo de inibição (Tabela 11), observa-se que os padrões gerais se mantêm semelhantes entre as três classes, variando principalmente no grau das correlações. Para os inibidores covalentes irreversíveis, o peso molecular apresentou correlação de 0,677 e o número de ligações rotacionáveis de 0,586. Valores comparáveis foram observados para os inibidores covalentes reversíveis e reversíveis. Em contraste, as propriedades relacionadas à polaridade, ou seja, número de doadores de hidrogênio, número de aceptores e TPSA, apresentaram correlações fracas em todas as classes, variando entre aproximadamente 0,11 e 0,38.

Na prática, esses resultados indicam que, embora propriedades como o peso molecular e o número de ligações rotacionáveis apresentem correlação positiva com o *score* de *docking*, elas não atuam de forma isolada ou dominante no modelo utilizado. Observa-se uma correlação intrínseca entre esses descritores, uma vez que moléculas de maior peso molecular tendem a apresentar maior flexibilidade estrutural, refletida no aumento do número de ligações rotacionáveis, conforme evidenciado no mapa de correlação. Esse efeito combinado contribui para a obtenção de *scores* mais elevados, especialmente no caso dos inibidores covalentes irreversíveis, que apresentam maior tamanho médio e, conseqüentemente, maior potencial de estabelecer múltiplas interações com o sítio ativo. Assim, o valor do *score* de *docking* reflete o equilíbrio entre diferentes características estruturais e energético-químicas, sendo influenciado por um conjunto integrado de descritores moleculares, comportamento amplamente observado em estudos de *docking* molecular (Xue et al., 2025).

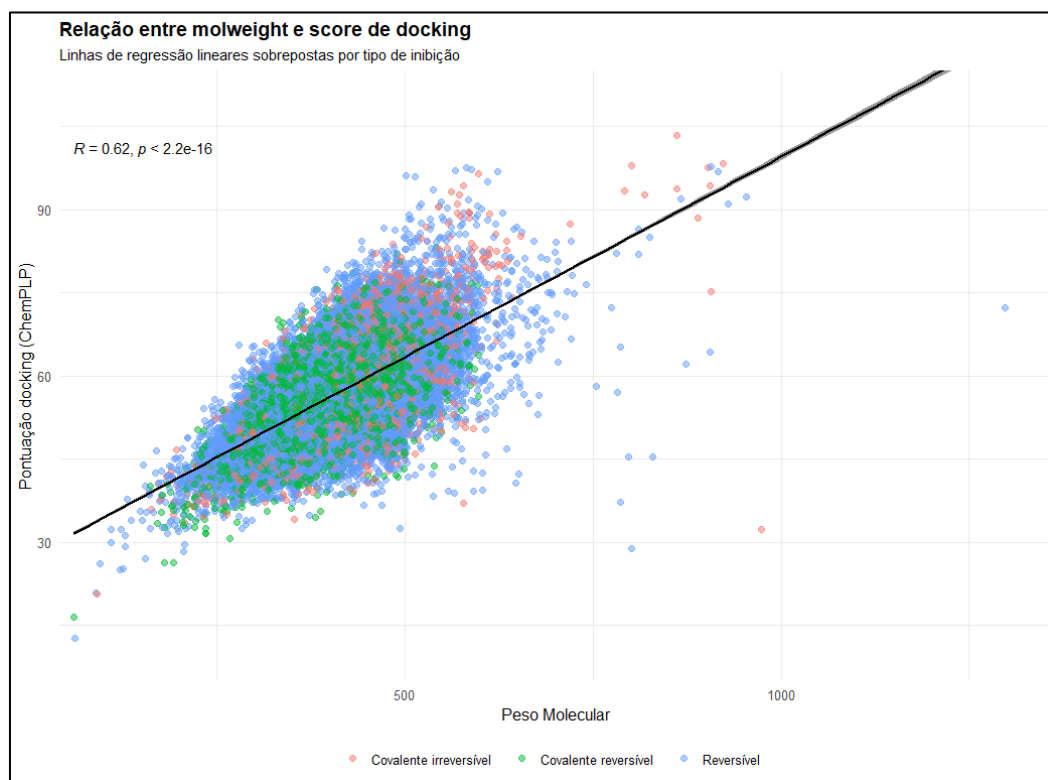
Embora outros descritores tenham sido avaliados, observou-se que as associações entre o *score* de *docking* e propriedades relacionadas à polaridade (TPSA, número de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio) e lipofilicidade (LogP) foram, em geral, fracas. Além disso, o número de ligações rotacionáveis apresentou correlação moderada com o *score*, porém essa tendência é parcialmente esperada devido à correlação inerente entre flexibilidade e tamanho molecular. Assim, optou-se por aprofundar apenas a relação entre peso molecular e pontuação de *docking*, uma vez que esta apresentou a associação mais consistente e relevante no conjunto analisado.

4.4.2 Correlação entre Peso Molecular e Pontuação de *Docking* Molecular

Considerando que o peso molecular (PM) apresentou a maior correlação com a pontuação obtida no *docking* (ChemPLP) no conjunto analisado, e que o PM também se correlaciona com o número de ligações rotacionáveis, optou-se por avaliar essa associação com maior detalhamento. Na análise conjunta dos três tipos de inibição, por meio de gráfico de dispersão com regressão linear (Figura 22), observou-se correlação positiva moderada entre PM e score, com coeficiente de Spearman $r = 0,64$ ($p < 2,2 \times 10^{-16}$). Esse resultado indica que ligantes com maior peso molecular tendem a apresentar pontuações mais elevadas no *docking*.

Essa tendência pode ser explicada pelo fato de que moléculas maiores, em geral, apresentam maior número de átomos e grupos funcionais, aumentando o número de pontos de contato potenciais com o sítio ativo. Como a pontuação ChemPLP é calculada a partir da soma de contribuições de interações intermoleculares, incluindo termos relacionados à complementaridade estérica, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, o aumento do número de contatos tende a elevar o score final (Verdonk et al., 2003).

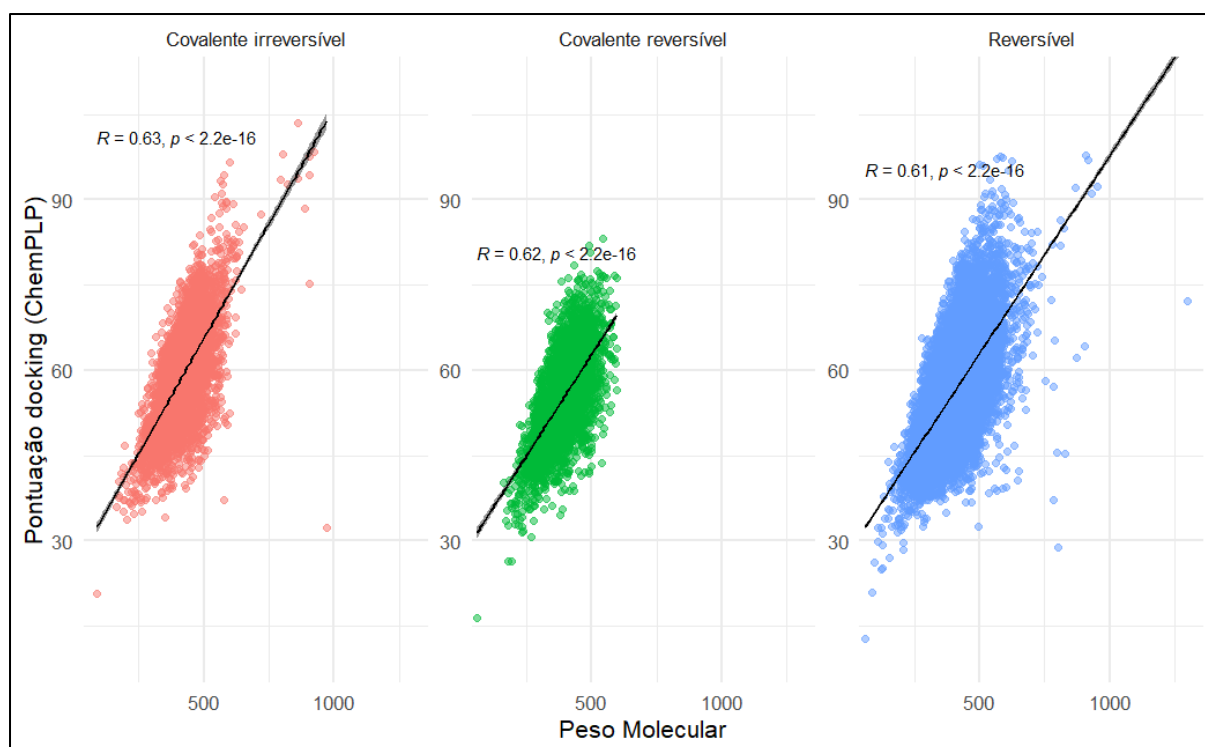
Figura 23 - Relação entre o Peso Molecular e score de *docking* para os três tipos de inibição.



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Ao avaliar a correlação separadamente por tipo de inibição (Figura 23), o comportamento foi consistente entre os grupos: $r = 0,63$ para inibidores covalentes irreversíveis, $r = 0,62$ para covalentes reversíveis e $r = 0,61$ para reversíveis (todos com $p < 2,2 \times 10^{-16}$). Esses achados indicam que o peso molecular influencia a pontuação de *docking* de forma semelhante independentemente do mecanismo de inibição. Resultados semelhantes são descritos na literatura, na qual se ressalta que moléculas maiores frequentemente exibem scores mais elevados em *docking* por possibilitarem maior número de interações hipotéticas no sítio de ligação, embora isso não necessariamente reflita maior afinidade experimental (Kitchen et al., 2004).

Figura 24 - Relação entre Peso molecular e score do *docking* para as três classes de inibidores. Em vermelho os covalentes irreversíveis, em verde os covalentes reversíveis e em azul os covalentes reversíveis.



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Assim, apesar da correlação positiva consistente observada entre peso molecular e pontuação de *docking*, scores mais altos devem ser interpretados com cautela. Isso ocorre porque funções de pontuação aditivas podem favorecer artificialmente ligantes maiores, uma vez que a presença de mais átomos e grupos funcionais aumenta o número potencial de contatos intermoleculares, elevando o valor final do score sem necessariamente refletir maior afinidade experimental ou eficácia farmacológica (Warren et al., 2006). Uma estratégia descrita na literatura para

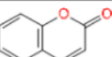
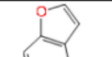
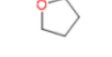
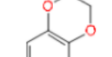
reduzir esse viés consiste na normalização do score em relação ao tamanho molecular, por exemplo, por meio do conceito de eficiência de ligação (*ligand efficiency*) ou normalizações por número de átomos/massa molecular (Hopkins et al., 2004). Essa abordagem pode ser explorada em análises futuras, considerando que o ChemPLP não inclui um termo explícito de normalização, favorecendo pontuações maiores em compostos de maior tamanho.

Dessa forma, conclui-se que o peso molecular está associado a maiores pontuações no *docking*, porém essa relação deve ser interpretada com cautela, visto que scores elevados podem refletir, em parte, um viés da função de pontuação em favor de moléculas maiores, e não necessariamente maior afinidade experimental.

4.5 PERFIL ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS (ANÁLISE DE SCAFFOLDS)

Por fim, para compreender melhor os padrões estruturais presentes nos inibidores de cruzaína estudados, faz-se uma análise de arcabouços ou esqueletos moleculares (*scaffolds*) no programa DataWarrior. Essa análise representa uma etapa útil para caracterização da composição estrutural da biblioteca química, pois permite identificar os esqueletos moleculares centrais recorrentes entre os ligantes avaliados. Dessa forma, contribui para a compreensão do perfil de diversidade química presente no conjunto estudado (Böhm; Flohr; Stahl, 2004; Müller et al., 2017).

Figura 25 - Padrões estruturais mais frequentes obtidos pela análise de scaffolds.

Estrutura	Frequência	Estrutura	Frequência	Estrutura	Frequência	Estrutura	Frequência	Estrutura	Frequência
	38865		1027		683		400		303
	2613		947		680		391		289
	2589		800		651		370		
	2058		793		571		365		
	1870		741		571		332		
	1471		727		478		324		
	1303		701		472		304		
	1224				422				
	1191								

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

A Figura 24 apresenta os núcleos estruturais mais frequentes na biblioteka analisada, sendo o anel benzênico o mais frequente (38.865 ocorrências). Bioisósteros do anel benzênico como o furano (2.589 ocorrências), tiofeno (2.058 ocorrências) e piridina (1.471 ocorrências) também apareceram entre os núcleos mais frequentes, ocupando o terceiro, quarto e sexto lugar, respectivamente. Esse resultado é consistente com a literatura, que descreve anéis aromáticos como estruturas recorrentes em química medicinal devido ao seu papel nas interações hidrofóbicas e aromáticas (Desimone *et al.*, 2004).

Além desses núcleos aromáticos, destacam-se os anéis heterocíclicos alifáticos, como piperazina (2.613 ocorrências), piperidina (1.870 ocorrências) e morfolina (1.303 ocorrências). Esses sistemas exercem papel relevante em propriedades farmacológicas, pois contribuem com grupos aceptores e/ou doadores de ligação de hidrogênio, aumentando a polaridade global da molécula e favorecendo parâmetros farmacocinéticos mais adequados. A presença de átomos de nitrogênio nesses anéis possibilita ainda a formação de sais, o que amplia significativamente a solubilidade aquosa e facilita o desenvolvimento farmacêutico. Ademais, esses heterociclos podem participar de interações iônicas com resíduos carregados no sítio ativo, contribuindo para a estabilização do complexo ligante-enzima e potencialmente

aumentando a afinidade de ligação (Faizan *et al.*, 2024; Zolotareva *et al.*, 2024; Łowicki, Przybylski, 2026).

Deve-se ressaltar que a análise apresentada é baseada na frequência de ocorrência dos scaffolds na biblioteca e não constitui uma análise direta de *scaffold* × atividade/afinidade. Dessa forma, a recorrência de um núcleo estrutural pode refletir tendências de exploração química na literatura e não necessariamente maior desempenho farmacológico. Avaliações futuras podem empregar estratégias de enriquecimento por faixa de *score* e/ou agrupamento por *scaffold* para investigar tendências estruturais associadas aos compostos de melhor desempenho. Portanto, essa análise fornece uma visão dos principais núcleos utilizados, podendo servir como referência para o desenho de novos inibidores, seja por meio da construção de análogos estruturais ou da aplicação de estratégias de bioisosterismo.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho caracterizou diferentes classes de inibidores da cruzaina descritos na literatura, utilizando ferramentas de bioinformática. A análise do conjunto de inibidores evidenciou que, de maneira geral, os compostos descritos apresentam perfil compatível com parâmetros clássicos de *drug-likeness*, com concentrações predominantes em faixas esperadas para propriedades associadas à absorção oral, como peso molecular, número de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio, área de superfície polar e lipofilicidade. Apesar de diferenças de dispersão entre classes, observou-se que grande parte das moléculas se mantém dentro de limites preconizados por regras empíricas amplamente utilizadas no desenvolvimento de fármacos, como Lipinski e Veber, o que sugere que a literatura tem priorizado características estruturais com maior viabilidade farmacocinética. Entre os perfis avaliados, destacou-se maior homogeneidade em determinados descritores para compostos covalentes reversíveis, enquanto classes com maior variabilidade estrutural apresentaram a presença de valores extremos, refletindo bibliotecas quimicamente mais heterogêneas.

O *docking* molecular permitiu comparar o desempenho relativo dos inibidores e identificar tendências de classificação pela função de pontuação. Foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tipos de inibidores, indicando que os compostos covalentes irreversíveis apresentaram, em média, melhor pontuação no *docking*, seguidos pelos reversíveis e covalentes reversíveis. Isso reforça que o score é sensível a características estruturais e ao padrão de interações intermoleculares nos diferentes grupos.

Contudo, como discutido ao longo do trabalho, os resultados do *docking* devem ser interpretados como uma métrica comparativa, e não como uma estimativa direta de afinidade experimental, especialmente no caso de inibidores covalentes, uma vez que o método empregado não modela explicitamente a formação de ligações covalentes.

A análise de correlação entre descritores físico-químicos e desempenho no *docking* mostrou que a pontuação foi mais influenciada por propriedades relacionadas ao tamanho molecular, com destaque para o peso molecular e a flexibilidade (ligações rotacionáveis), os quais apresentaram associações moderadas e consistentes. Esse

achado reforça que funções de pontuação tendem a favorecer moléculas maiores por permitirem mais contatos e interações potenciais, o que pode inflar artificialmente o desempenho computacional. Assim, estratégias de normalização por tamanho molecular (como abordagens baseadas em eficiência de ligação) constituem perspectivas relevantes para análises futuras.

Por fim, a análise de *scaffolds* possibilitou caracterizar a composição estrutural da biblioteca, evidenciando alta recorrência de núcleos aromáticos e heterocíclicos frequentemente empregados em química medicinal, contribuindo para compreensão dos padrões estruturais predominantes no conjunto analisado. Esse panorama estrutural pode orientar investigações posteriores focadas em modificações moleculares desses inibidores.

REFERÊNCIAS BIOGRÁFICAS

ABONYI, Emmanuel Ebuka et al. Molecular docking studies on isolated and characterized compounds of marine and plant origin with antidiabetic activity. *South Asian Research Journal of Natural Products*, v. 5, n. 3, p. 152–172, 2022. Disponível em: <https://journalsarjnp.com/index.php/SARJNP/article/view/94>. Acesso em: 2 dez. 2025.

AERTS, Céline et al. Are public-private partnerships the solution to tackle neglected tropical diseases? A systematic review of the literature. *Health Policy*, v. 121, n. 7, p. 745–754, 2017. DOI: 10.1016/j.healthpol.2017.05.005.

AGU, P. C. et al. Molecular docking as a tool for discovering molecular targets of nutraceuticals in disease management. *Scientific Reports*, v. 13, p. 13398, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-40160-2.

BARF, Tjeerd; KAPTEIN, Allard. Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks. *Journal of Medicinal Chemistry*, [S.l.], v. 55, n. 14, p. 6243–6262, 2012. DOI: 10.1021/jm3003203

BAUER, Renato A. Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discovery Today*, [S.l.], v. 20, n. 9, p. 1061–1073, set. 2015. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.05.005.

BÖHM, Hans-Joachim; FLOHR, Alexander; STAHL, Martin. Scaffold hopping. *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 1, n. 3, p. 217–224, 2004.

BOIANI, M.; PIACENZA, L.; HERNÁNDEZ, P.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; DENICOLA, A. Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved? *Biochemical Pharmacology*, v. 79, n. 12, p. 1736–1745, 15 jun. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.02.009>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Chagas. Brasília, DF, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas>. Acesso em: 11 jul. 2024.

BROGI, Simone et al. Covalent reversible inhibitors of cysteine proteases containing the nitrile warhead. *Molecules*, v. 27, n. 8, p. 2561, 2022. DOI: 10.3390/molecules27082561.

CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE (CCDC). GOLD: genetic optimization for ligand docking. [S.l.: s.n.], [s.d.]. Disponível em: <https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/software/gold/>. Acesso em: 15 jul. 2025.

CASTRO, José; DEMECCA, María Montalto; BARTEL, Laura C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, v. 25, n. 8, p. 471–479, 2006. DOI: 10.1191/0960327106het653oa.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Trypanosomiasis (American). 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>. Acesso em: 10 maio 2025.

CHEMBL. Estrutura química do nifurtimox. [S.l.: s.n.], [20--]. Disponível em: https://www.ebi.ac.uk/chembl/search_results/nifurtimox. Acesso em: 11 jul. 2025.

CIANNI, Lorenzo et al. Can cysteine protease cross-class inhibitors achieve selectivity? *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 62, n. 23, p. 10497–10525, 2019.

COPELAND, Robert A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists. 2. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118540398>. Acesso em: 21 jan. 2026.

COURA, José Rodrigues et al. Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo na forma crônica da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30, n. 2, p. 139–144, 1997.

DESIMONE, R. et al. Privileged structures: applications in drug discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, v. 7, n. 5, p. 473–493, 2004.

DRAG, Marcin; SALVESEN, Guy S. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 9, n. 9, p. 690–701, 2010.

DURÃES-OLIVEIRA, João et al. Chagas disease: a silent threat for dogs and humans. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 7, p. 3840, 2024. DOI: 10.3390/ijms25073840.

ERIKSSON, L.; LEMMING, B.; ARTURSSON, P. High-throughput screening and prediction of oral absorption of drugs in humans. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 46, p. 59–76, 2000.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE (EMBL-EBI). ChEMBL database. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>. Acesso em: 13 fev. 2026.

FAIZAN, M. et al. The medicinal chemistry of piperazines: a review. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 103, n. 6, 2024. DOI: 10.1111/cbdd.14537.

FERREIRA, Rafael André; VELLOSO, Ricardo Viana. Doença de Chagas: mecanismos de infecção, resposta imune durante o processo patológico induzido pelo parasito e fatores que favorecem a interação parasito-hospedeiro. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*, ano 7, ed. 9, v. 6, p. 59–80, set. 2022. Disponível em: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/parasito-hospedeiro>. Acesso em: 11 jul. 2025.

GEHRINGER, Matthias; LAUFER, Stefan A. Emerging and re-emerging warheads for targeted covalent inhibitors: applications in medicinal chemistry and chemical biology. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 62, n. 12, p. 5673–5724, 2018. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01153.

GILLMOR, S. A.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. Structural determination of specificity in the cysteine protease cruzain. *Protein Science*, v. 6, n. 8, p. 1603-1611, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.5560060801>.

GUEDES, Isabella A.; MAGALHÃES, Camila S.; DARDENNE, Laurent E. Receptor–ligand molecular docking. *Biophysical Reviews*, v. 6, n. 1, p. 75–87, 2013.

GUENGERICH, F. Peter. Mechanisms of drug toxicity and relevance to pharmaceutical development. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 3–14, 2011. DOI: 10.2133/dmpk.dmpk-10-rv-062.

HALPERIN, Inbal et al. Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 47, n. 4, p. 409–443, 2002. DOI: 10.1002/prot.10115.

HAN, L. et al. The role of lipophilicity in drug discovery. *Medicinal Research Reviews*, v. 39, n. 5, p. 1509–1544, 2019.

HERRERA, Rosina Olivia. Efecto de la cruzipaina y otras cisteína-proteases sobre linfocitos T. 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2006. Disponível em: <https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000606834/3/0606834.pdf>. Acesso em: 20 maio 2025.

HILLEBRAND, Laura et al. Emerging and re-emerging warheads for targeted covalent inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 67, n. 10, p. 7668–7758, 2024.

HO, Beatriz Siqueira. *Estudo da constante de afinidade de inibidores da principal cisteína protease do Trypanosoma cruzi*. 2023. Monografia (Bacharelado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

HUANG, Niu; SHOICHET, Brian K.; IRWIN, John J. Benchmarking sets for molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, n. 23, p. 6789–6801, 2006. DOI: 10.1021/jm0608356.

HUBBARD, Roderick E.; HAIDER, Muhammad Kamran. Hydrogen bonds in proteins. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: Wiley, 2010.

JACKSON, Paul A.; WIDEN, John C.; HARKI, Daniel A.; BRUMMOND, Kay M. Covalent modifiers: a chemical perspective on the reactivity of α,β -unsaturated carbonyls with thiols via hetero-Michael addition reactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, [S.l.], v. 60, n. 3, p. 839-885, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00788>.

JAIN, Ajay N. Scoring noncovalent protein-ligand interactions: a continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, [S.l.], v. 10, n. 5, p. 427-440, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00124474>.

JASINSKI, G.; MARTINI, M. F.; MOGLIONI, A. G. Thirty years in the design and development of cruzain inhibitors. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 35, 2024.

JOHNSON, Daniel S.; WEERAPANA, Eranthie; CRAVATT, Benjamin F. Strategies for discovering and derisking covalent, irreversible enzyme inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 9, n. 10, p. 759–775, 2010. DOI: 10.1038/nrd3130.

JONES, Gareth et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, v. 267, n. 3, p. 727–748, 1997.

KHAN, T. et al. Molecular docking simulation with special reference to flexible docking approach. *JSM Chemistry*, v. 6, n. 1, p. 1053, 2018.

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

KRATZ, Jadel Müller; BOURNISSEN, Facundo Garcia; FORSYTH, Colin J.; SOSA-ESTANI, Sergio. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 11, n. 10, p. 943–957, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1509704>.

LIMA, A. et al. Structure-based virtual screening: successes and pitfalls. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2024.

LIPINSKI, Christopher A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 46, p. 3–26, 2001.

LONSDALE, Richard; WARD, Richard A. Structure-based design of targeted covalent inhibitors. *Chemical Society Reviews*, [S.I.], v. 47, n. 11, p. 3816–3830, 2018. DOI: 10.1039/C7CS00220C.

ŁOWICKI, Daniel; PRZYBYLSKI, Piotr. Piperidine-containing drugs and recently studied analogs – biological activity, mechanism of action and synthetic cascade access to their scaffolds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 302, p. 118213, 2026. DOI: 10.1016/j.ejmech.2025.118213.

MASSAGO, Sadao. Introdução ao algoritmo genético. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2013. Disponível em: <https://www.dm.ufscar.br/~sadao/download/?file=article%2Falgoritmos-geneticos.pdf>. Acesso em: 29 out. 2025.

MEHRTENS, Janna M. The design, synthesis and biological assay of cysteine protease specific inhibitors. 2007. Tese (Doutorado em Química) – University of Canterbury, Christchurch, 2007.

MELO, Igor Matheus de. *Síntese de análogos do benznidazol e avaliação de sua atividade anti-Trypanosoma cruzi*. 2024. 75 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2024.

MENG, Xuan-Yu; ZHANG, Hong-Xing; MEZEI, Mihaly; CUI, Meng. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>.

MONTEIRO, Wuelton Marcelo et al. Morbimortalidade da doença de Chagas no Estado do Amazonas: análise do banco de dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade de 2010 a 2014. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, n. 5, p. 745–754, 2016. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742016000500007. Acesso em: 11 jul. 2025.

MORRIS, Garrett M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

MÜLLER, P. et al. Investigation of the compatibility between warheads and peptidomimetic sequences of protease inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, 2023.

NOGUEIRA, F. B. et al. Structure-based virtual screening for new cruzain inhibitors: hits with trypanocidal activity. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 38, n. 11, p. 3203–3212, 2020.

NUNES, Maria Carmo P. et al. Clinical features of Chagas disease progression and severity. *The Lancet Regional Health – Americas*, v. 37, p. 100832, 2024.

OLIVERA, Mario Javier; FORY, Johana Alexandra; OLIVERA, Antonio José. Therapeutic drug monitoring of benznidazole and nifurtimox. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, n. 6, p. 748–755, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). 2022. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasi\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasi)). Acesso em: 28 maio 2025.

PEROLA, Emanuele; WALTERS, W. Patrick; CHARIFSON, Paul S. A detailed comparison of current docking and scoring methods on systems of pharmaceutical relevance. *Proteins*, v. 56, n. 2, p. 235–249, 2004.

POWERS, James C. et al. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chemical Reviews*, v. 102, n. 12, p. 4639–4750, 2002. DOI: 10.1021/cr010182v.

PRASANNA, S.; DOERKSEN, Robert J. Topological polar surface area: a useful descriptor in 2D-QSAR. *Current Medicinal Chemistry*, [S.l.], v. 16, n. 1, p. 21-41, 2009. DOI: <https://doi.org/10.2174/092986709787002817>.

RCSB PROTEIN DATA BANK. Estrutura cristalográfica da cruzaina de *Trypanosoma cruzi* (PDB ID: 3KKU). 2025. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/3KKU>. Acesso em: 20 mai. 2025.

RODRIGUES, Gabriela et al. O uso de softwares livres em aula prática sobre filtros moleculares de biodisponibilidade oral de fármacos. *Química Nova*, v. 44, n. 8, p. 1036–1044, 2021.

SANTOS, Maria M. M.; MOREIRA, Rui. Michael acceptors as cysteine protease inhibitors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, [S.l.], v. 7, n. 10, p. 1040-1050, 2007. DOI: <https://doi.org/10.2174/138955707782110105>.

SANTOS, V. C.; FERREIRA, R. S. Computational approaches towards the discovery and optimisation of cruzain inhibitors. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 117, e210385, 2022.

SIGMA-ALDRICH. Reversible inhibitors. Technical article. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/protein-biology/interrogation-protein-pathways/reversible-inhibitors>. Acesso em: 4 nov 2025

SINGH, Juswinder et al. The resurgence of covalent drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 10, n. 4, p. 307–317, 2011.

SOUZA, Camila Viana de. Construção e aplicação de um protocolo de triagem virtual no desenvolvimento de potenciais inibidores da cruzaina. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021.

SUTANTO, F.; KONSTANTINIDOU, M.; DÖMLING, A. Covalent inhibitors: a rational approach to drug discovery. *RSC Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 876–884, 2020. DOI: 10.1039/D0MD00154F.

TEAGUE, S. J. Implications of protein flexibility for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, n. 7, p. 527–541, 2003.

VALLEJO, Maite et al. Trypanocidal drugs for late-stage, symptomatic Chagas disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 12, 2020.

VEBER, Daniel F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002.

WINTERS, Ryan; NGUYEN, Tina; WASEEM, Muhammad. Chagas disease. *StatPearls*, 2025.

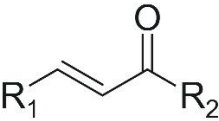
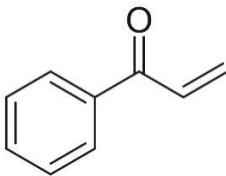
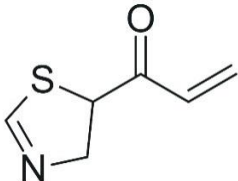
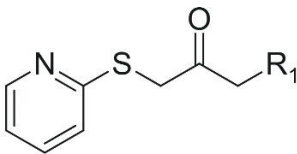
XUE, Mingyi et al. FeatureDock for protein-ligand docking guided by physicochemical feature-based learning. *npj Drug Discovery*, v. 2, 2025.

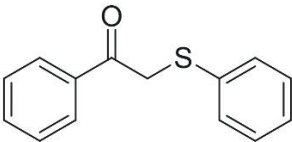
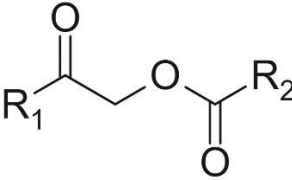
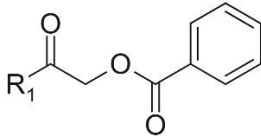
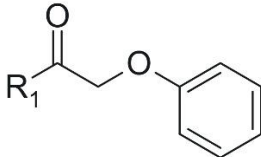
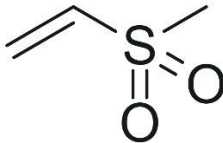
ZOLOTAREVA, D. et al. Morpholine, piperazine, and piperidine derivatives as antidiabetic agents. *Molecules*, v. 29, n. 13, 2024.

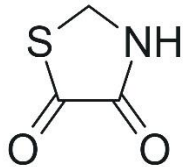
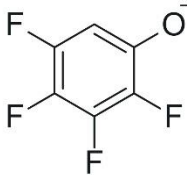
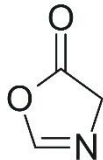
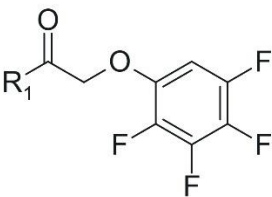
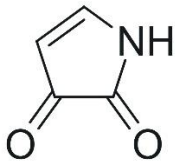
ANEXO A - GRUPOS FUNCIONAIS ASSOCIADOS À INIBIÇÃO COVALENTE IRREVERSÍVEL DA CRUZAÍNA

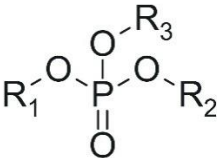
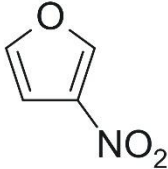
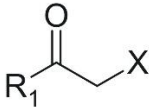
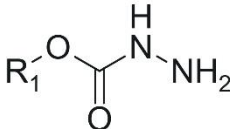
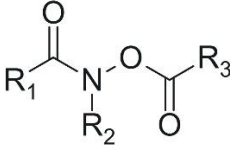
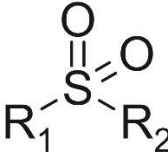
Este anexo apresenta os principais grupos funcionais associados à inibição covalente irreversível da enzima cruzaína. As estruturas representadas correspondem aos motivos reativos (warheads) responsáveis pela interação com o resíduo catalítico Cys25, não representando moléculas completas.

Tabela A 1 - Grupos funcionais associados à inibição covalente reversível da cruzaína

Nomenclatura	Grupos Funcionais
Carbolinas α-β insaturadas Sistema carbonílico α,β -insaturado atuando como aceptor de Michael.	
α-β-Arilcetonas Cetona α,β -insaturada contendo substituinte aromático.	
α-β-Cetona-Heterociclo Sistema α,β -insaturado conjugado a heterociclo.	
Heteroariltioacetamida Grupo tioacetamida ligado a heteroaromático.	
Nomenclatura	Grupos Funcionais

α-fenil-tiofenolcetona Cetona aromática contendo enxofre ligado a anel aromático.	
Ceto-aciloximetano Cetona com grupo aciloxi ligado ao carbono α.	
Ceto-arilaciloximetano Cetona com substituinte arilaciloxi.	
Ceto-ariloximetano Cetona contendo grupo ariloxi.	
Vinilsulfonas Sistema vinílico conjugado a grupo sulfona,ceptor de Michael.	
Epóxido Anel de três membros contendo oxigênio, suscetível à abertura nucleofílica.	
Nomenclatura	Grupos Funcionais

Haletos de alquila Carbono alquílico ligado a halogênio, suscetível à substituição nucleofílica.	R_1-CH_2-X X = F, Cl, Br ou I
Tiazolidinodiona Heterociclo com enxofre, nitrogênio e duas carbonilas.	
Tetrafluorofenóxido Anel aromático polifluorado com grupo fenóxido.	
Oxazolona Heterociclo contendo oxigênio, nitrogênio e carbonila conjugada.	
Tetrafluorofenoximetil cetona Cetona ligada a grupo fenoxi polifluorado.	
Dissulfeto Grupo contendo ponte S–S, capaz de troca tiol–dissulfeto.	$R_1-S-S-R_2$
Maleimida Imida α,β-insaturada atuando como acceptor de Michael.	
Nomenclatura	Grupos Funcionais

Éster-fosfato Grupo fosforilado contendo P=O e ligações P–O–R.	
Nitrofuranos Derivados aromáticos do furano contendo grupo nitro.	
Aziridina Heterociclo de três membros contendo nitrogênio.	
Halometilcetonas Cetona contendo carbono α halogenado.	 X = F, Cl, Br ou I
Carbazatos de alquila Derivado carbamato contendo grupo hidrazina.	
N-O-diacilhidroxamatos Derivado hidroxâmico com dois grupos acila.	
Grupo oxidado reativo (ex.: sulfona) Sistema contendo heteroátomo em alto estado de oxidação.	
Nomenclatura	Grupos Funcionais

Sais de sulfônico (sulfonatos) Derivados do ácido sulfônico contendo grupo SO_3^- .	
--	--

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

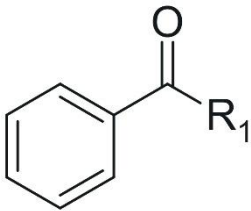
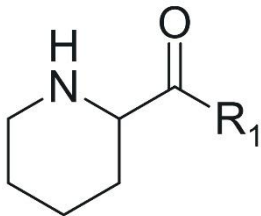
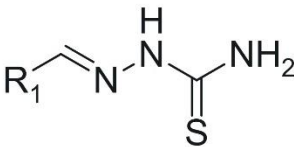
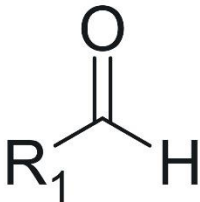
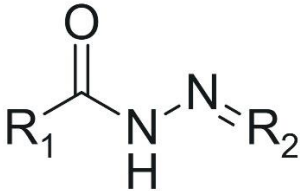
Nota: As estruturas representadas correspondem aos (warheads) responsáveis pela interação covalente com o resíduo catalítico Cys25 da cruzaina e não representam moléculas completas.

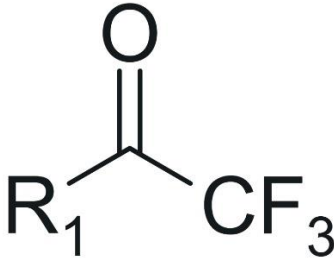
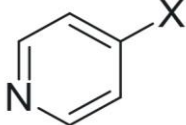
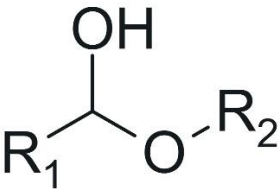
ANEXO B - GRUPOS FUNCIONAIS ASSOCIADOS À INIBIÇÃO COVALENTE REVERSÍVEL DA CRUZAÍNA

Este anexo apresenta os principais grupos funcionais associados à inibição covalente reversível da enzima cruzaina. As estruturas representadas correspondem aos motivos reativos capazes de formar adutos covalentes reversíveis com o resíduo catalítico Cys25, não representando moléculas completas.

Tabela B 1 - Grupos funcionais associados à inibição covalente reversível da cruzaina

Nomenclatura	Grupos Funcionais
Nitrila Grupo $-\text{C}\equiv\text{N}$ capaz de formar adutos covalentes reversíveis com resíduos nucleofílicos de cisteína.	
N-acil-hidrazonas Sistema hidrazona acilado contendo $\text{C}=\text{N}$, associado à formação de adutos covalentes reversíveis.	

Nomenclatura	Grupos Funcionais
Aril cetonas Cetonas aromáticas suscetíveis à formação de adutos covalentes reversíveis com resíduos de cisteína.	
Cetonas heterocíclicas Cetonas ligadas a heterociclos contendo heteroátomos, associadas à formação de adutos reversíveis.	
Tiossemicarbazonas Derivados contendo sistema imínico e grupo tioamida, associados à formação de adutos reversíveis.	
Aldeídos Grupos carbonila ligados a hidrogênio, capazes de formar hemithioacetais reversíveis.	
Carbazonas Derivados contendo sistema imínico C=N–NH–R, associados à formação de adutos reversíveis.	

Nomenclatura	Grupos Funcionais
Oximas Derivados contendo grupo C=NOH, associados à formação de interações covalentes reversíveis.	
Trifluorometil cetonas Cetonas contendo grupo CF₃ diretamente ligado à carbonila, associadas à formação de adutos reversíveis.	
Halopiridina Heterociclo aromático nitrogenado contendo halogênio, associado à formação de interações covalentes reversíveis.	 X= F, Cl, Br ou I
Hemiacetal de aldeído mascarado Forma protegida de aldeído capaz de regenerar a carbonila reativa e formar adutos reversíveis.	

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Nota: Os grupos funcionais ilustrados correspondem a *warheads* capazes de formar ligações covalentes reversíveis com o resíduo catalítico Cys25 da cruzaina, não representando moléculas completas.