



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

RONALDO DE ARAÚJO SILVA

**ESTUDO *IN SILICO* DO POTENCIAL ANTICOAGULANTE DE CATEQUINAS
SULFATADAS**

AREIA

2024

RONALDO DE ARAÚJO SILVA

**ESTUDO *IN SILICO* DO POTENCIAL ANTICOAGULANTE DE CATEQUINAS
SULFATADAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Bacharelado em
Química da Universidade Federal da
Paraíba (UFPB), como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Química.

Orientador: Prof^a Dr^a Elizabeth Almeida
Lafayette.

AREIA

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586e Silva, Ronaldo de Araújo.

Estudo in silico do potencial anticoagulante de catequinas sulfatadas / Ronaldo de Araújo Silva. -
Areia:UFPB/CCA, 2024.

57 f. : il.

Orientação: Elizabeth de Almeida Lafayette.
TCC (Graduação) - UFPB/Campus II.

1. Química. 2. Química medicinal. 3. Modificações
moleculares. 4. Catequinas sulfatadas. 5. Sulfatação.
I. Lafayette, Elizabeth de Almeida. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 54(02)

RONALDO DE ARAÚJO SILVA

ESTUDO *IN SILICO* DO POTENCIAL ANTICOAGULANTE DE CATEQUINAS
SULFATADAS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Bacharelado
em Química da Universidade Federal da
Paraíba (UFPB), como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Química.

Aprovado em: 30/04/2024.

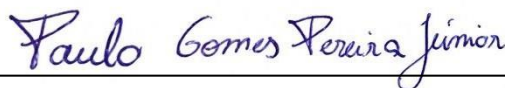
BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ELIZABETH ALMEIDA LAFAYETTE
Data: 13/05/2024 17:46:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Elizabeth de Almeida Lafayette (Orientadora)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente
 YANNA CAROLINA FERREIRA TELES
Data: 13/05/2024 13:50:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Yanna Carolina Ferreira Teles (Examinadora)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Bel. Paulo Gomes Pereira Junior (Examinador)
Programa de Pós-Graduação em Química da UEPB

*Dedico esse trabalho aos meus pais, **José Roberto Quirino da Silva** e **Maria Gorette Nascimento de Araújo Silva** e a minha irmã **Maria Nascimento de Araújo Silva**, ao meu filho **Santiago de Araújo Duarte** e aos meus **avós**, que sempre acreditaram em mim e tornaram essa conquista possível.*

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer primeiro a Deus, sem ele, nada disso seria possível, todos os caminhos que ele idealizou na minha vida me trouxeram até aqui, *“a ele toda honra e toda glória”*.

Agradeço imensamente aos meus pais, que fizeram de tudo para que eu permanecesse no curso, me dando subsídios, conselhos, e as bases essenciais na minha vida, carinho, amor, respeito, honra e honestidade.

Agradeço minha irmã, Maria Rita, que tanto amo, e que está sempre me apoiando no que for preciso. Ao meu filho, Santiago, ele é o motivo e inspiração maior, para tudo que faço e realizo na minha vida, meu amor maior.

Agradeço a minha orientadora, professora Elizabeth, que foi como uma mãe para mim na graduação, sempre esteve presente no que foi preciso para que eu pudesse retirar minhas dúvidas e aprender, que teve paciência para me orientar nos meus momentos de ansiedade, enfim, obrigado por tudo.

Agradeço a professora Yanna, que me trouxe para a química medicinal e me inspirou na criação desse trabalho, se não fosse ela, possivelmente estaria perdido na química sem saber o que fazer no futuro. Ela também foi responsável por me “adotar” como orientando por um tempo, mesmo sobrecarregada, esteve presente e disponível para me auxiliar, obrigado por tudo.

Agradeço as professoras Lucina, Maria Betânia, Edilene e a técnica do laboratório, Tereziana, que me orientaram por um tempo na extensão, contribuindo em muito no meu conhecimento nas mais diversas áreas da química e engrandecendo a minha formação.

Agradeço aos meus amigos do curso, Brenno, Jhon, Joabson, Sabrina Pâmela, Angeliana, Quellya, Felipe, Diego, Matheus, Sandro, Nathália, Victor, Filipe Warlic e Aiza por todo companheirismo durante o curso, por todo conhecimento compartilhado e principalmente, pela amizade. Vocês fazem e fizeram parte dessa realização, obrigado por tudo!

Ao meu amigo, professor Edmilson Dantas, que foi um pai pra mim, durante o ensino médio, minha inspiração para a química e meu primeiro orientador, sem você, seus conselhos e orientação, talvez eu não tivesse seguido pela química, obrigado por tudo meu amigo! Ao meu amigo, professor Iremar (*in memoriam*), que também me

guiou pelo caminho da química, tenho certeza que onde você estiver, estará feliz com a minha realização, obrigado por tudo jogador.

Agradecimento aos meus amigos e colegas de outros cursos, Júlio, Alidiel, Thiago, Felipe, Jeremias, José, Arthur, Nayara, Brenda, Vinicius, Wellington pelo conhecimento compartilhado, por todo o tempo junto na universidade, e principalmente pela amizade.

Agradecimento aos professores Pércles, Rufino, Sidney, Renaldo, por todo conhecimento adquirido no curso, pelos conselhos em sala de aula, vocês me ensinaram muitas coisas que vão além do curso, e que levarei para a vida como aprendizado, obrigado por tudo!

RESUMO

A progressão na pesquisa computacional tornou possível que os métodos *in silico* oferecessem efeitos benéficos de época para tanto as necessidades regulatórias quanto a indústria farmacêutica, afim de se avaliar o perfil de segurança de medicamentos. Diante disso, o trabalho tem como objetivo principal avaliar o potencial anticoagulante das catequinas sulfatadas através de docking molecular, e realizar um estudo ADMET, afim de se avaliar as principais características químicas e toxicológicas das moléculas estudadas. As estruturas dos ligantes (catequinas) foram obtidas através da plataforma *ChemSpider*, a adição do trióxido de enxofre (SO_3^-) foi realizada utilizando-se o software *Chemsketch*, a partir disso as estruturas foram tratadas e preparadas, para em seguida serem utilizadas nos processos de docking e redocking molecular, no *AutodockTools*. O código SMILES gerado a partir do *Chemsketch*, foi inserido nas plataformas *SwissADME* e *pkCSM*, e em seguida, foram obtidos os dados ADMET dos compostos estudados. Para análise de parâmetros físico-químicos, foi utilizada a regra de Lipinski, todas as catequinas sulfatadas encontram-se fora da regra, sendo a D. catequina, composto que não foi modificado, o único a atender todos os parâmetros. Quanto aos parâmetros farmacocinéticos, é importante destacar que as moléculas sulfatadas, possuem baixa absorção gastrointestinal, baixa permeabilidade na pele, alta polaridade e possuem a capacidade de atuar como substrato pg-p. Apenas a Epicatequina e a Epigallocatequina (EGC), sulfatadas, apresentaram capacidade de inibir a CYP3A4. Os compostos estudados apresentaram baixa toxicidade, não possuem a capacidade de serem carcinogênicos, hepatóxicos, ou de causarem sensibilidade a pele. Porém, a epigallocatequina, epicatequina e D. catequina, sulfatadas, apresentaram a capacidade de inibir o gene hERG II, podendo vir a causar problemas cardíacos. A partir das análises das interações, entre os ligantes estudados e a serpina antitrombina III, foi possível inferir que todos os ligantes sulfatados, realizaram algumas ou todas as principais interações realizadas pelo pentassacarídeo com a antitrombina III (Asn 45, Arg 46, Arg 47, Lys 114, Lys 125, Arg 129). Dentre todos os compostos estudados, a Epicatequina gallato e D. catequina sulfatada, foram os que apresentaram maior afinidade com o alvo (menor energia de ligação). Todos os compostos sulfatados, a exceção das epigallocatequina, epicatequina e D. catequina, sulfatadas (que inibem o gene hERG II), podem ser administrados pelas vias intravenosa, transdérmica e intramuscular.

Palavras-Chave: química medicinal; modificações moleculares; catequinas sulfatadas, sulfatação.

ABSTRACT

Progress in computational research has made it possible for in silico methods to offer epoch-making benefits for both regulatory needs and the pharmaceutical industry in evaluating the safety profile of medications. Therefore, the main objective of the work is to evaluate the anticoagulant potential of sulfated catechins through molecular docking, and to carry out an ADMET study, in order to evaluate the main chemical and toxicological characteristics of the molecules studied. The structures of the ligands (catechins) were obtained using the ChemSpider platform, the addition of sulfur trioxide (SO_3^-) was carried out using the ChemsSketch software, from this the structures were treated and prepared, to then be used in the processes of molecular docking and redocking, in AutodockTools. The SMILES code generated from ChemsSketch was inserted into the SwissADME and pkCSM platforms, and then ADMET data for the compounds studied were obtained. For analysis of physicochemical parameters, Lipinski's rule was used, all sulfated catechins are outside the rule, with D. catechin, a compound that was not modified, being the only one to meet all parameters. Regarding pharmacokinetic parameters, it is important to highlight that sulfated molecules have low gastrointestinal absorption, low skin permeability, high polarity and have the ability to act as a pg-p substrate. Only Epicatechin and Epigallocatechin (EGC), sulfated, were able to inhibit CYP3A4. The compounds studied showed low toxicity and do not have the capacity to be carcinogenic, hepatotoxic, or cause skin sensitivity. However, sulfated epigallocatechin, epicatechin and D. catechin had the ability to inhibit the hERG II gene, which could cause heart problems. From the analysis of interactions between the studied ligands and the antithrombin III serpin, it was possible to infer that all sulfated ligands carried out some or all of the main interactions carried out by the pentasaccharide with antithrombin III (Asn 45, Arg 46, Arg 47, Lys 114, Lys 125, Arg 129). Among all the compounds studied, Epicatechin gallate and D. sulfated catechin were those that showed the highest affinity with the target (lowest binding energy). All sulfated compounds, with the exception of sulfated epigallocatechin, epicatechin and D. catechin (which inhibit the hERG II gene), can be administered intravenously, transdermally and intramuscularly.

Keywords: medicinal chemistry; molecular modifications; sulfated catechins, sulfation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diagrama esquemático do sulfato de quitosana acilado.....	17
Figura 2 – Estrutura química das catequinas.....	19
Figura 3 – Estrutura química da Heparina.....	21
Figura 4 – Alguns flavonoides sulfatados que apresentam atividade coagulante.....	22
Figura 5 – Sulfatação química de polissacarídeos.....	22
Figura 6 – Estrutura cristalográfica da Serpina Antitrombina III (fator X) (PDBid: 2gd4)	23
Figura 7 – Bioefeitos da ATIII na cascata de coagulação.....	24
Figura 8 – Principais resíduos de interação entre o pentassacarídeo e a antitrombina.....	25
Figura 9 – Ativação do complexo pelo pentassacarídeo.....	26
Figura 10 – Esboço de planejamento de medicamentos baseado em estrutura.....	28
Figura 11 – Estruturas químicas estudadas.....	31
Figura 12 – Sobreposição entre a heparina cocristalizada (amarela) com a redocada (verde)	40
Figura 13 – Interações entre D. Catequina e Antitrombina III.....	41
Figura 14 – Interações entre a Epigallocatequina sulfatada e Antitrombina III.....	42
Figura 15 – Interações entre a D. Catequina sulfatada e Antitrombina III.....	43
Figura 16 – Interações entre Epicatequina Sulfatada e Antitrombina III.....	44
Figura 17 – Interações entre a Epicatequina Gallato sulfatada e Antitrombina III.....	45
Figura 18 – Interações entre a Epigallocatequina Gallato Sulfatada e Antitrombina III.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de parâmetros físico-químicos obtidos através do <i>SwissAdme</i>	32
Tabela 2 – Dados de parâmetros farmacocinéticos obtidos através do <i>SwissAdme</i>	34
Tabela 3 – Dados de parâmetros toxicológicos obtidos através do <i>pkCSM</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
ALA	Alanina
ARG	Arginina
ASN	Asparagina
ASP	Ácido Aspártico
CYS	Cisteína
GLN	Glutamina
GLU	Ácido Glutâmico
ILE	Isoleucina
Log P	Logaritmo de Partição Octanol-água
LYS	Lisina
PHE	Fenilalanina
PRO	Prolina
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
SER	Serina
THR	Treonina
VAL	Valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3.	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	QUÍMICA MEDICINAL	16
3.2	CATEQUINAS E SULFATAÇÃO	18
3.3	ANTICOAGULANTES	20
3.4	ANTITROMBINA III E PENTASSACARÍDEO	23
3.5	DOCKING MOLECULAR	26
4.	METODOLOGIA.....	29
4.1	PREPARAÇÃO DOS LIGANTES	29
4.1.1	<i>Análogos.....</i>	29
4.1.2	<i>Ligante co-cristalizado (pentassacarídeo).....</i>	29
4.2	PREPARAÇÃO DO ALVO MOLECULAR.....	29
4.3	PREPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS PARA TESTES ADMET.....	30
4.4	FLUXOGRAMA DAS ANÁLISES REALIZADAS.....	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1	ESTRUTURA MOLECULAR DAS CATEQUINAS ESTUDADAS.....	31
5.2	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	32
5.3	PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS.....	34
5.4	PARÂMETROS DE TOXICIDADE.....	36
5.5	VALIDAÇÃO POR REDOCKING MOLECULAR.....	39
5.6	DOCKING MOLECULAR E ANÁLISE DAS INTERAÇÕES.....	40

5.6.1	<i>Interações entre a D. Catequina e a Antitrombina III (fator X).....</i>	40
5.6.2	<i>Interações entre a Epigallocatequina sulfatada e a Antitrombina III (fator X).....</i>	41
5.6.3	<i>Interações entre a D. catequina sulfatada e a Antitrombina III (fatorX).....</i>	42
5.6.4	<i>Interações entre a Epicatequina sulfatada e a Antitrombina III (fator X).....</i>	43
5.6.5	<i>Interações entre a Epicatequina gallato sulfatada e a Antitrombina III (fator X).....</i>	44
5.6.6	<i>Interações entre a Epigallocatequina gallato sulfatada e a Antitrombina III (fator X).....</i>	46
5.6.7	<i>Comparação dos resultados.....</i>	47
6.	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Computadores e *softwares*, cada vez mais rápidos e modernos, permitem a modelagem molecular de diferentes formas, como modelos básicos de valência, representações gráficas, modelos de nuvens eletrônicas, e estruturas em três dimensões. Os *softwares* utilizados para simulações físico-químicas baseiam-se em algoritmos que são capazes de calcular descritores moleculares, que são representações matemáticas de uma molécula provenientes de uma transformação da informação estrutural disponível da molécula em estudo. Uma vez que a estrutura de um composto é quantificada em um conjunto de descritores moleculares, os algoritmos podem ser capazes de estabelecer uma relação matemática entre o composto e sua atividade (Alves; Streit; Pizzolato, 2023).

A progressão na pesquisa computacional tornou possível que os métodos *in silico* oferecessem efeitos benéficos de época para tanto as necessidades regulatórias quanto a indústria farmacêutica, afim de se avaliar o perfil de segurança de medicamentos. Grandes quantidades de flavonoides estão presentes na dieta humana. Eles mostram potenciais efeitos terapêuticos contra uma ampla variedade de doenças (Hasan *et al.*, 2022).

O acoplamento molecular é uma técnica computacional que prevê a afinidade de ligação de ligantes a proteínas receptoras. Embora tenha usos potenciais, na pesquisa nutracêutica, desenvolveu-se em uma ferramenta formidável para o desenvolvimento de medicamentos (Agu *et al.*, 2023).

O desenvolvimento de fármacos contempla os estudos farmacocinéticos, os quais abrangem os processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), ou seja, “a biotransformação do fármaco no organismo”. Neste sentido, a previsão dos processos de ADMET logo nos estágios iniciais da pesquisa é de extrema importância. A otimização destas propriedades, por meio de modificações moleculares de compostos promissores, é essencial na seleção de compostos candidatos com maiores probabilidades de não serem abandonados, mais adiante, na fase clínica (Silva; De Mello Padilha, 2023).

As doenças tromboembólicas são uma das principais causas de mortalidade em humanos e os anticoagulantes atualmente disponíveis estão associados a vários

inconvenientes, portanto, a busca por anticoagulantes que tenham melhor perfil de segurança é altamente desejável (Bano *et al.*, 2023). Diante disso, torna-se importante investigar outras moléculas (análogos) que possam servir ao tratamento de trombose.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho tem como objetivo principal avaliar o potencial anticoagulante das catequinas sulfatadas através de docking molecular, e realizar um estudo ADMET, afim de se avaliar as principais características químicas e toxicológicas das moléculas estudadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um levantamento das principais catequinas encontradas na literatura com potencial medicinal;
- Realizar modificações (adicionar grupos sulfatos) e avaliar as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas, dessas moléculas.
- Comparar as interações com a antitrombina III, dos compostos estudados, com as do complexo pentassacarídeo-antitrombina III, através de docking molecular;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 QUÍMICA MEDICINAL

A Química Medicinal é uma área de estudo que visa o desenvolvimento de novos fármacos, e assim, fornece meios para a obtenção de Novas Entidades Químicas (NEQ). A síntese orgânica colabora com este processo promovendo a obtenção das moléculas propostas. A formação de recursos humanos capacitados para o desenvolvimento de NEQ é uma maneira de colaborar com o setor nacional de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de fármacos, área considerada estratégica do ponto de vista social, econômico e político (Santos; Gonsalves; Araujo, 2018).

Durante o desenvolvimento de fármacos o “*Lead compound*” (molécula com atividade farmacológica promissora que necessita de melhoramento) pode ter origem de uma fonte natural (vegetal ou animal), ou ser um produto de síntese química, item pertencente a uma coleção química, ou ainda, ser um protótipo molecular resultado de um planejamento racional para obtenção de fármacos (Santos; Gonsalves; Araujo, 2018).

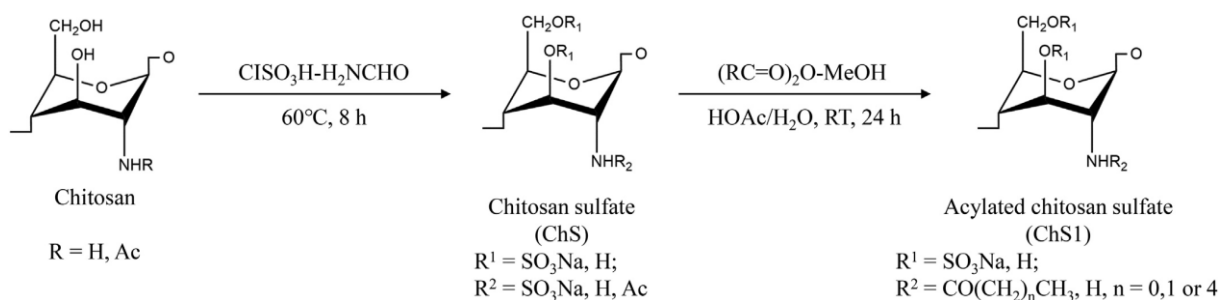
Embora os termos similaridade química e molecular são frequentemente usados como sinônimos, isso pode não ser totalmente preciso. A similaridade química é baseada principalmente nas características físico-químicas dos compostos (por exemplo, solubilidade, ponto de ebulição, log P, peso molecular, densidades eletrônicas, momentos dipolares, etc.) enquanto a similaridade molecular se concentra principalmente nas características estruturais (por exemplo, subestruturas compartilhadas, sistemas de anéis, topologias, etc.) dos compostos e sua representação (Maggiora *et al.*, 2014).

Propriedades físico-químicas e características estruturais são tipicamente explicadas por diferentes tipos de descritores. Tais descritores são geralmente definidos como funções matemáticas ou modelos de propriedades químicas ou estrutura molecular. Para avaliação da similaridade química, informações sobre reações e diferentes grupos funcionais também podem ser considerados (Maggiora *et al.*, 2014).

No presente estudo, a similaridade molecular foi utilizada para modificar as estruturas das catequinas, adicionando grupos sulfatos, fazendo com que elas

possuísssem uma característica similar a anticoagulantes comerciais, a exemplo da heparina. Algo semelhante, Chandika *et al.* (2020) realizou em seu trabalho, ao modificar quitosanas através da sulfatação (figura 1), e avaliando em seguida, seu potencial anticoagulante.

Figura 1 - Diagrama esquemático do sulfato de quitosana acilado.



Fonte: Chandika *et al.*, 2020.

Em 1997, Christopher A. Lipinski e colaboradores, quando trabalhavam para a Indústria Farmacêutica Pfizer, realizaram um estudo com mais de 2000 fármacos, no qual observaram que algumas propriedades físico-químicas eram necessárias para que as drogas apresentassem boa solubilidade em água e permeabilidade intestinal, características essenciais para a disponibilidade oral (Santos; Gonsalves; Araujo, 2018).

Os resultados alcançados pelo estudo, geraram a regra dos cinco de Lipinski. Tal regra tem o intuito de auxiliar os químicos medicinais nas decisões relacionadas às modificações químicas e, assim, reduzir o número de compostos preparados com propriedades físico-químicas indesejadas. De acordo com as regras de Lipinski são propriedades moleculares relevantes: o log P, o número de doadores de ligações de hidrogênio, o número de aceptores de ligações de hidrogênio, o peso molecular, bem como, os pontos de interação para os principais alvos de fármacos, como os ligantes de receptores acoplados à proteína G, inibidores de cinases, moduladores de canais iônicos e receptores nucleares (Rodrigues *et al.*, 2022).

A regra propõe que a má absorção ou permeação é mais provável quando a molécula possui mais que 5 doadores de ligação de hidrogênio, mais que 10 aceptores de ligação de hidrogênio, peso molecular maior do que 500 daltons e log P calculado (Clog P) maior do que 5, sendo todos os parâmetros múltiplos de cinco (Rodrigues *et al.*, 2022).

O estudo da toxicidade de um composto é determinado pela exposição de ecossistemas simples e complexos a substâncias químicas e os efeitos decorrentes desta exposição, que vão de efeitos leves a graves, incluindo a morte de organismos. Esses efeitos, reversíveis ou irreversíveis, são influenciados pelas propriedades de absorção, exposição, distribuição, metabolismo e excreção do composto em estudo ou seus metabólitos. Essas propriedades, por sua vez, determinam a interação dos compostos e seus metabólitos com macromoléculas celulares (Alves; Streit; Pizzolato, 2023).

Os principais objetivos na avaliação toxicológica são o diagnóstico, tratamento e prevenção de intoxicações por xenobióticos. Um dos principais pontos que cerca o estudo da toxicologia de um determinado composto reside no fato de as interações de natureza complexa poderem ser estudadas e mapeadas. Metodologias e princípios das áreas da biologia, química e informática podem ser empregados a fim de compreender o quanto os sistemas vivos são resilientes aos efeitos tóxicos de determinados compostos (Alves; Streit; Pizzolato, 2023).

O termo “toxicidade *in silico*” refere-se a experimentos computacionais, cálculos matemáticos ou análise científica de dados de substâncias químicas através de ferramentas computacionais que os analise e faça a predição de uma possível atividade toxicológica. A agência de proteção ambiental dos Estados Unidos da América (Environmental Protection Agency, EPA) define toxicidade *in silico* como “a integração da computação e tecnologia da informação com biologia molecular para melhorar a priorização de requerimentos e predizer o potencial de risco de compostos químicos” (De Brito, 2010).

3.2 CATEQUINAS E SULFATAÇÃO

Catequina, cujo nome é derivado do extrato de *Acacia catechu* L., é 3,3',4',5,7-penathidroxiflavan. A catequina representa o nome da família química dos compostos derivados da catequina (Isemura, 2019).

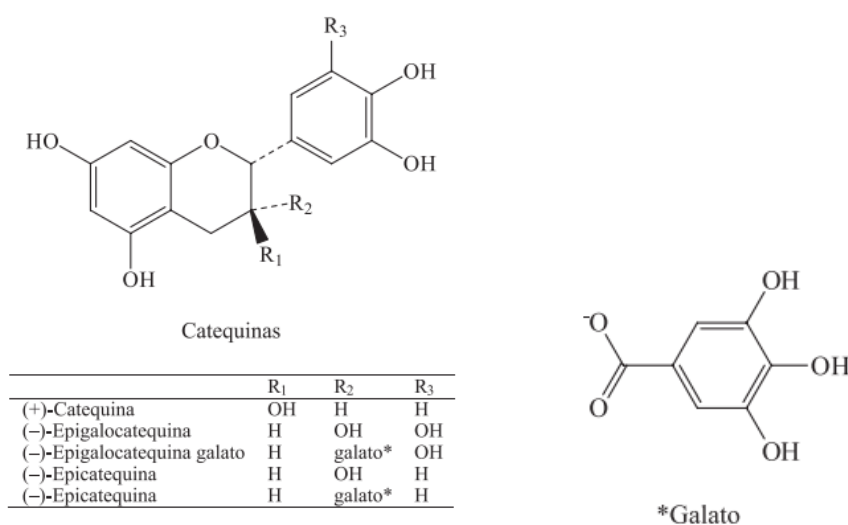
O chá, produto obtido das folhas e gemas da planta *Camellia sinensis*, é uma das fontes mais ricas em catequinas e contém, como catequina majoritária, (-)-

epigallocatequina-3-galato (EGCG) (Figura 2) e apresenta várias propriedades benéficas para a saúde humana, tais como anticâncer, anti-obesidade, antidiabético, efeitos anticardiovasculares, anti-infecciosos, hepatoprotetores e neuroprotetores (Isemura, 2019).

A composição das folhas do chá depende de uma variedade de fatores, incluindo clima, estação, processo utilizado na horticultura, além do tipo e idade da planta. O chá verde contém componentes polifenólicos, que incluem flavanóis, flavandióis, flavonóides e ácidos fenólicos, que totalizam cerca de 30% do peso seco das folhas. A maioria dos polifenóis do chá verde se apresentam como flavanóis, e dentre estes, predominam as catequinas. As quatro principais catequinas do chá verde são (-)-epicatequina (EC), (-)-3-galato de epicatequina (GEC), (-)-epigallocatequina (EGC) e 3-galato de epigallocatequina (EGCG) (Lamalhão; Fialho, 2009).

Uma das principais características das catequinas, é a presença de grupos hidroxilados em sua estrutura (figura 2), o que a torna um excelente antioxidante natural. A presença desses grupos, também facilita as ligações de hidrogênio entre essas estruturas e um eventual receptor (proteína).

Figura 2 – Estrutura química das catequinas.



Fonte: Adaptado de Braibante *et al.*, 2014.

A sulfatação de biomoléculas é conhecida em uma variedade de organismos, desde procariontes até espécies multicelulares. Nos últimos anos, muito se avançou no entendimento do processo de sulfatação e novas funções biológicas relacionadas a essa importante transformação continuam sendo descobertas (Correia-Da-Silva; Sousa; Pinto, 2014).

Uma pequena molécula sulfatada combina simultaneamente uma natureza hidrofóbica e uma hidrofílica. Além disso, a alta solubilidade em água e a natureza atóxica desta família de compostos devem ser destacadas. Como a natureza parece brincar com esse equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico. A síntese de pequenas moléculas sulfatadas não naturais poderia ser uma forma de ajudar a natureza na geração de novos agentes bioativos (Correia-Da-Silva; Sousa; Pinto, 2014).

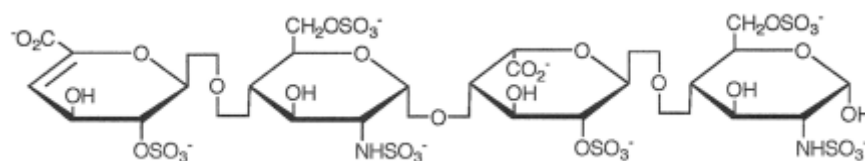
Existem estudos relatados no início do século XXI (Gunnarsson; Desai, 2002), acerca das propriedades anticoagulantes da D. catequina persulfatada e epicatequina persulfatada, onde foram avaliadas as interações e afinidade com a antitrombina III (fator X).

.

3.3 ANTICOAGULANTES

A heparina, um anticoagulante bastante utilizado clinicamente, consiste em uma mistura heterogênea de polímeros de um polissacarídeo natural, extraído da mucosa intestinal suína ou também de pulmão bovino, com peso molecular variando entre 17.000 e 20.000 daltons. A interação da heparina com a antitrombina provoca uma mudança conformacional nesta última, respondendo, assim, por seu principal efeito anticoagulante. Esta interação aumenta a inativação pela antitrombina de enzimas da coagulação, tais como a trombina e os fatores Xa e IXa (Chaves *et al.*, 2010).

Uma das principais características da heparina é a presença de grupos sulfatos (figura 3), que fazem com que ela possua uma alta massa molecular, além disso, esses grupos são de fundamental importância nas interações com o alvo proteico. Devido a essa alta massa molar, a heparina apresenta alta polaridade, sendo assim, não interage com meios lipofílicos, tendo amplo uso através da via intravenosa.

Figura 3 - Estrutura química da Heparina

Fonte: Nguyen; Rabenstein, 2016.

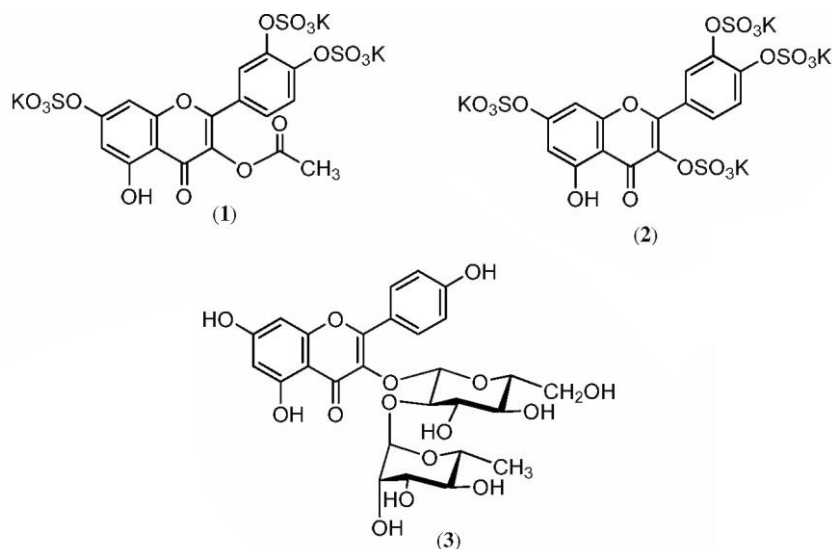
A heparina, um anticoagulante de ocorrência natural, é um polissacarídeo sulfatado com carga negativa, e a carga negativa de flavonoides sulfatados pode permitir que eles se liguem aos receptores de heparina (Teles; Souza, 2018).

O principal modulador da função da antitrombina é a sequência de pentassacarídeos de heparina, um motivo altamente específico aperfeiçoado pela natureza ao longo de anos de evolução (Henry *et al.*, 2009).

Apenas uma fração das cadeias polissacarídicas em preparações de heparina contém a estrutura do pentassacarídeo de ligação a Antitrombina (AT) e, portanto, liga-se a AT com alta afinidade (AT-heparina), apresentando atividade anticoagulante significativa (Lindahl; Li, 2020).

Os flavonoides sulfatados 3-acetil-7,3',4'-trissulfato de quercetina e 3,7,3',4'-tetrassulfato de quercetina (figura 4) fazem parte de um grupo de substâncias presentes, principalmente, em espécies da família *Asteraceae*. A incubação de plaquetas com estes flavonoides resultou em uma inibição da agregação plaquetária tempo-dependente frente a diferentes agonistas incluindo ADP, trombina e colágeno (Chaves *et al.*, 2010).

Figura 4 – Alguns flavonoides sulfatados que apresentam atividade anticoagulante.

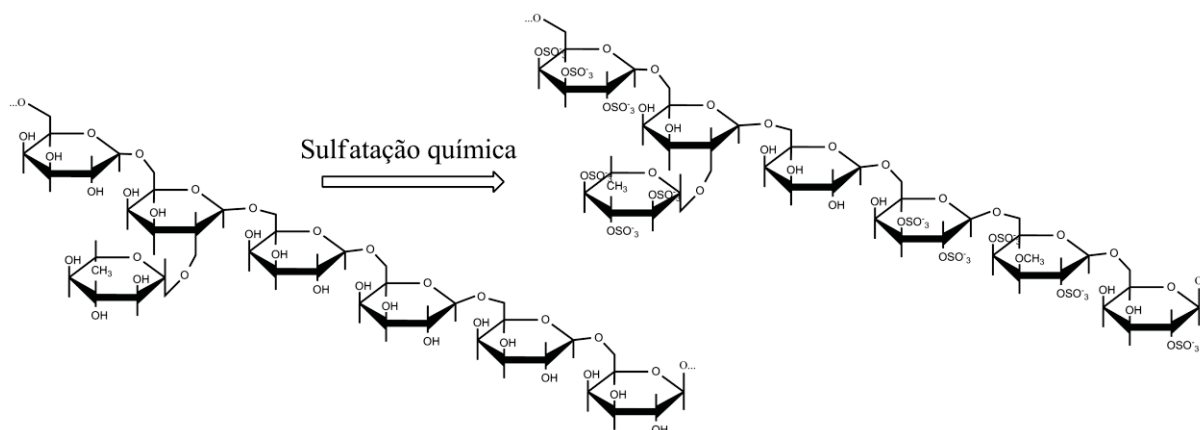


Fonte: Chaves *et al.*, 2010.

Outros flavonoides sintetizados, tais como o persulfato de (–)-epicatequina, o persulfato de (+)-catequina, o persulfato de quercetina, o persulfato de morina, o persulfato de 20,3,30,6-tetrahidroxiflavanol, são descritos como agentes anticoagulantes (Teles; Souza, 2018).

A modificação estrutural através da sulfatação também é realizada em grandes moléculas (polissacarídeos) (figura 5), com a finalidade de atribuir novas características, como por exemplo, a similaridade molecular a heparina.

Figura 5 – Sulfatação química de polissacarídeos.



Fonte: Boaron, 2021.

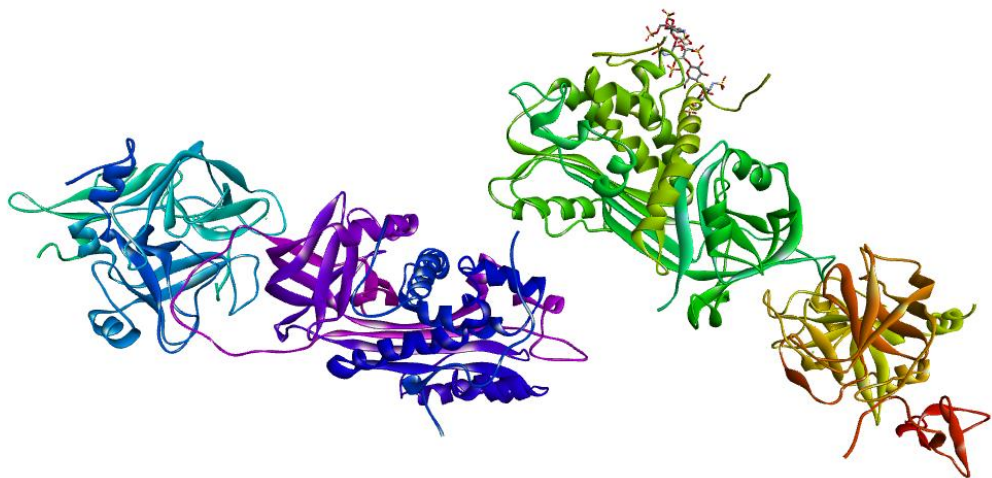
3.4 ANTITROMBINA III E PENTASSACARÍDEO

O gene SerpinC1 codifica um inibidor de serinoprotease denominado antitrombina III (ATIII). Essa protease demonstra ação anticoagulante e antiinflamatória. A ATIII é o mais importante inibidor do fator de coagulação, e mesmo pequenas alterações na antitrombina, podem alterar significadamente o risco de tromboembolismo. ATIII também pode suprimir a inflamação através de um efeito coagulação-dependente ou independente (Lu; Wang; Liang, 2017).

A ATIII é uma protease não dependente de vitamina K que inibe a coagulação por lise da trombina e do fator Xa. A ATIII se assemelha à α 1- antitripsina em estrutura, mas inibe a trombina de forma mais significativa em comparação a elastase. Também bloqueia outras serinoproteases na cascata da coagulação, incluindo os fatores XIIa, XIa, IXa e Xa (Lu; Wang; Liang, 2017).

A natureza idêntica das duas cópias do complexo (figura 6) observadas por Johnson *et al.*, 2006, na unidade assimétrica suporta um único modo de interação entre a AT ativada por pentassacarídeo e o S195A fXa, consistente com um mecanismo de reconhecimento dependente de exosíto.

Figura 6 – Estrutura cristalográfica da Serpina Antitrombina III (fator X) (PDBid: 2gd4).

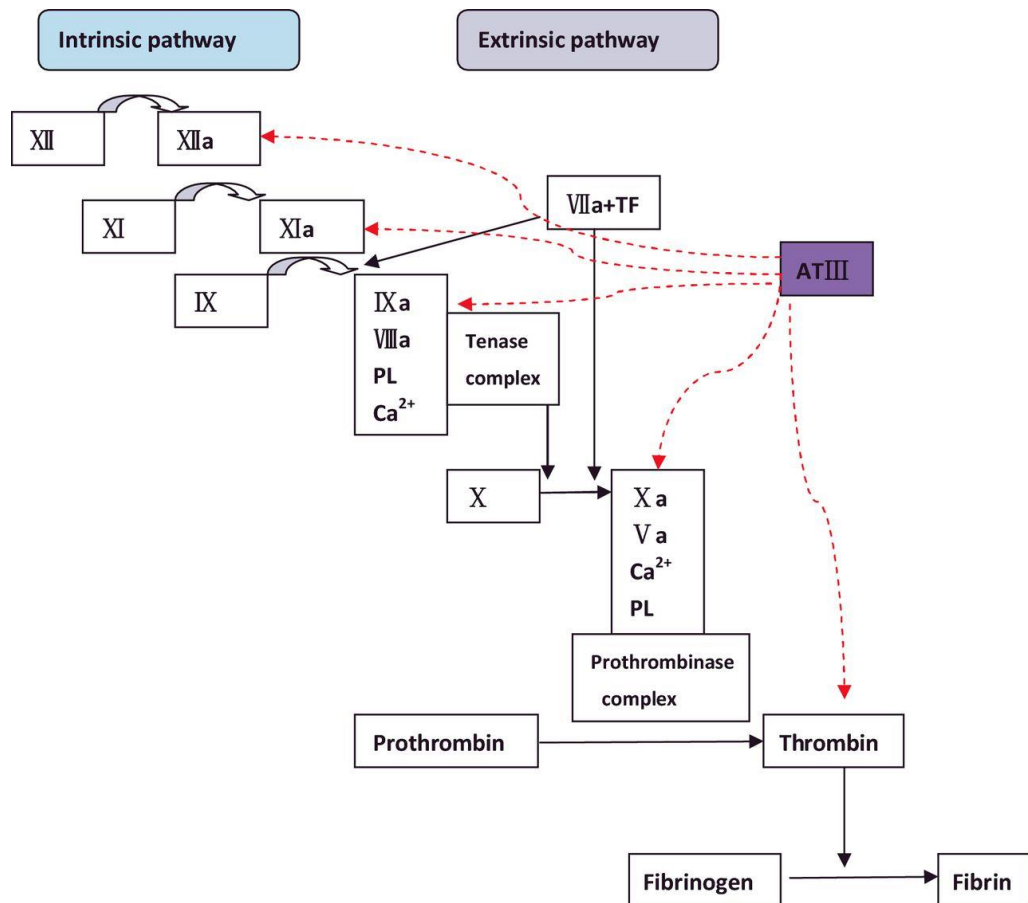


Fonte: Adaptado de Johnson *et al.*, 2006.

A regulação da coagulação sanguínea (figura 7) é fundamental para manter o fluxo sanguíneo, evitando sangramento excessivo ou trombose. Um dos principais mecanismos regulatórios envolve a ativação da serpina antitrombina pela heparina (Johnson *et al.*, 2006).

Antitrombina (AT), uma glicoproteína plasmática e um membro da superfamília de proteínas serpina, é um importante regulador da cascata de coagulação. Seus alvos primários são a trombina, o fator Xa (fXa) e o fator IXa (fIXa). A antitrombina isoladamente é um inibidor bastante pobre dos fatores IIa, Xa e IXa e requer a presença da heparina para exibir todo o seu potencial anticoagulante (Henry *et al.*, 2009).

Figura 7 – Bioefeitos da ATIII na cascata de coagulação.

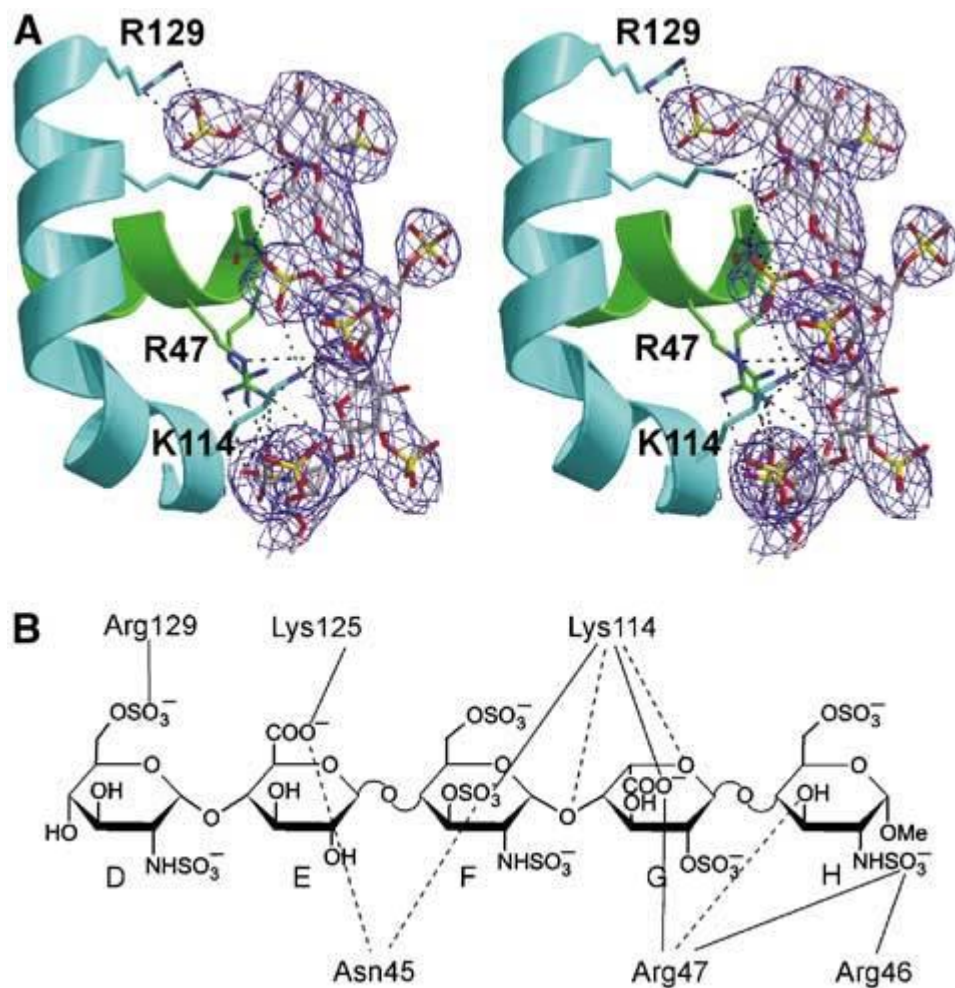


Fonte: Lu; Wang; Liang, 2017.

A conformação e interações do pentassacarídeo são muito semelhantes àsquelas observadas anteriormente para o idraparinax, e corroboram a conclusão dos

dados de mutagênese de que as interações críticas envolvem Arg46, Arg47, Lys114, Lys125 e Arg129, com Lys114 de importância principal (Johnson *et al.*, 2006). A figura 8, descreve as principais interações envolvendo os resíduos da antitrombina e o pentassacarídeo.

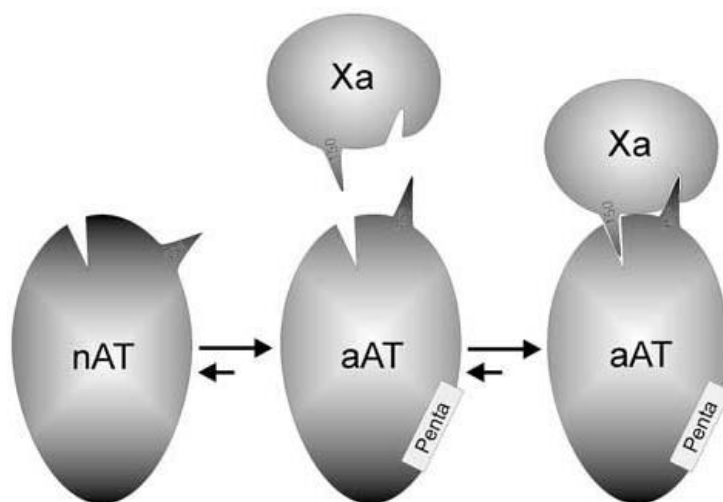
Figura 8 – Principais resíduos de interação entre o pentassacarídeo e a antitrombina.



Fonte: Johnson *et al.*, 2006.

De longe, o resíduo mais importante é Arg150, cuja substituição por Ala reduz a taxa de inibição por quase 10 vezes. Na estrutura do complexo, a Arg150 faz mais contatos com a AT do que qualquer outro resíduo único, com seis dos sete contatos envolvendo a cadeia lateral (Johnson *et al.*, 2006). A antitrombina III, juntamente com o pentassacarídeo, irá se ligar através da Arg 150 ao fator X, e assim formar o complexo, promovendo a atividade anticoagulante (figura 9).

Figura 9 – Ativação do complexo pelo pentassacarídeo.



Fonte: Adaptado de Johnson *et al.*, 2006.

3.5 DOCKING MOLECULAR

Técnicas computacionais têm sido aplicadas no pipeline de descoberta de fármacos desde 1980. Devido aos baixos recursos computacionais da época, as primeiras estratégias de modelagem molecular contaram com uma visão rígida do processo de ligação ligante-alvo. Durante os anos, a evolução das tecnologias de hardware tem permitido gradualmente simular a natureza dinâmica do evento vinculante (Salmaso; Moro, 2018).

O *docking* molecular é um método mestre na biologia molecular estrutural e no design de medicamentos assistidos por técnica computacional com o reconhecimento molecular concebido por meio da complementaridade das estruturas moleculares da superfície e da energia envolvida na ligação. Essa complementaridade pode assumir várias formas: ligação de hidrogênio, interação carga-carga, interação de Van der Waals, tamanho e forma das superfícies. Nesse método, tem-se a melhor predição da orientação da molécula e seu acoplamento ao alvo biológico para formação do complexo com atividade biológica (De Moura *et al.*, 2020).

A metodologia de acoplamento visa prever os modos experimentais de ligação e afinidades de pequenas moléculas dentro o local de ligação de alvos receptores

específicos e é atualmente usado como uma ferramenta computacional padrão no projeto de drogas para otimização de compostos de chumbo e em estudos de triagem virtual para encontrar novas moléculas biologicamente ativas. As ferramentas básicas de uma metodologia de acoplamento incluem um algoritmo de busca e uma função de pontuação de energia para gerar e avaliar as posições dos ligantes (Guedes; De Magalhães; Dardenne, 2014).

O cálculo de energia livre do sistema é calculado através da subtração da energia livre do complexo com as energias livres do ligante e da proteína (Equação 1) (Nascimento, 2023).

$$\Delta G = G_{COMPLEXO} - (G_{Proteína} - G_{Ligante}) \text{ Equação 1.}$$

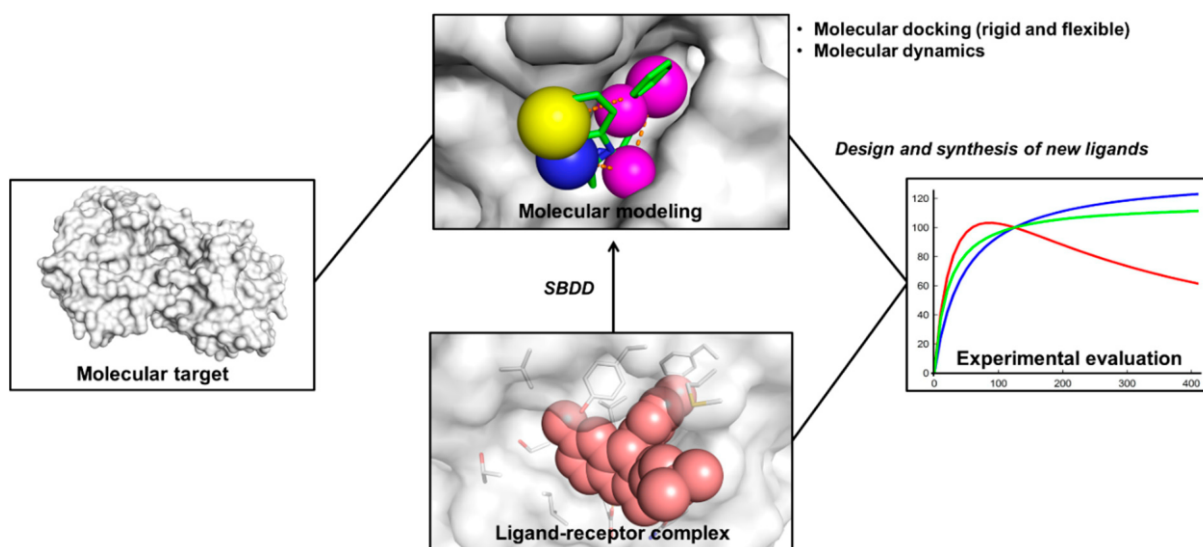
A contribuição da energia livre da proteína e do ligante (Equação 2) é apresentado pela diferença entre a energia interna da molécula (U) com o produto da temperatura absoluta do sistema (T) e a entropia da molécula estudada (S) (Nascimento, 2023).

$$G = U - TS \quad \text{Equação 2.}$$

A docagem molecular é um dos métodos mais utilizados no SBDD (Structure-Based Drug Design, SBDD) devido à sua capacidade de prever, com um grau substancial de precisão, a conformação de ligantes de moléculas pequenas dentro do sítio de ligação alvo apropriado (Ferreira *et al.*, 2015).

A flexibilidade do receptor alvo é um aspecto essencial que deve ser considerado ao longo da fase de modelagem, tendo em mente que mudanças conformacionais substanciais podem ocorrer após a ligação do ligante. O uso de técnicas como docking flexível e MD (Docking Molecular) são úteis para resolver a questão da flexibilidade (Ferreira *et al.*, 2015).

Figura 10 – Esboço de planejamento de medicamentos baseado em estrutura.



Fonte: Ferreira *et al.*, 2015.

Uma vez determinado um complexo ligante-receptor, os dados de atividade biológica são correlacionados com a informação estrutural. Desta forma, o processo SBDD recomeça com novas etapas para incorporar modificações moleculares com o potencial de aumentar a afinidade de novos ligantes pelo sítio de ligação (Ferreira *et al.*, 2015).

4 METODOLOGIA

4.1 PREPARAÇÃO DOS LIGANTES

4.1.1 ANÁLOGOS

As estruturas dos ligantes (catequinas) foram obtidas através da plataforma *ChemSpider* (www.chemspider.com), a adição do trióxido de enxofre (SO_3^-) foi realizada utilizando-se o software *Chemsketch*, logo em seguida, as moléculas foram convertidas em 3D, sendo salvas em formato .mol. No software *Avogrado*, foram adicionados os hidrogênios (pH 7.4), e obteve-se a melhor conformação para o ligante (a de menor energia), utilizando o campo de força MMFF94. Após isso, o ligante foi salvo no formato .pdb. No *AutodockTools*, o ligante foi preparado para o docking e salvo no formato .pdbqt.

4.1.2 LIGANTE CO-CRISTALIZADO (PENTASSACARÍDEO)

O pentassacarídeo obtido a partir da macromolécula, foi tratado no software *DiscoveryStudio 2021*, foram adicionados os hidrogênios e a carga zero, sendo salvo em formato .pdb. Em seguida, o ligante foi tratado no *AutodockTools*, nele, ajustou-se as torções para posição rígida, para que a molécula durante o processo de re-docking, mantivesse a sua posição original. Por último, a molécula foi salva em formato .pdbqt.

4.2 PREPARAÇÃO DO ALVO MOLECULAR

A macromolécula com código de identificação 2gd4 e resolução de 3,30 Å. foi obtida através da plataforma *ProteinDataBank* (www.rcsb.org), e salva em formato .pdb. Logo em seguida, ela foi tratada e protonada a pH 7.4 na plataforma *APBS-PDB2PQR* (www.server.poissonboltzmann.org), utilizando-se o campo de força PARSE. Após a obtenção da estrutura tratada, a mesma foi salva em formato .pqr. Para verificar se os resíduos foram protonados da maneira correta, foi utilizado o software *PyMol*, nele também foi possível converter o formato da macromolécula para o formato .pdb.

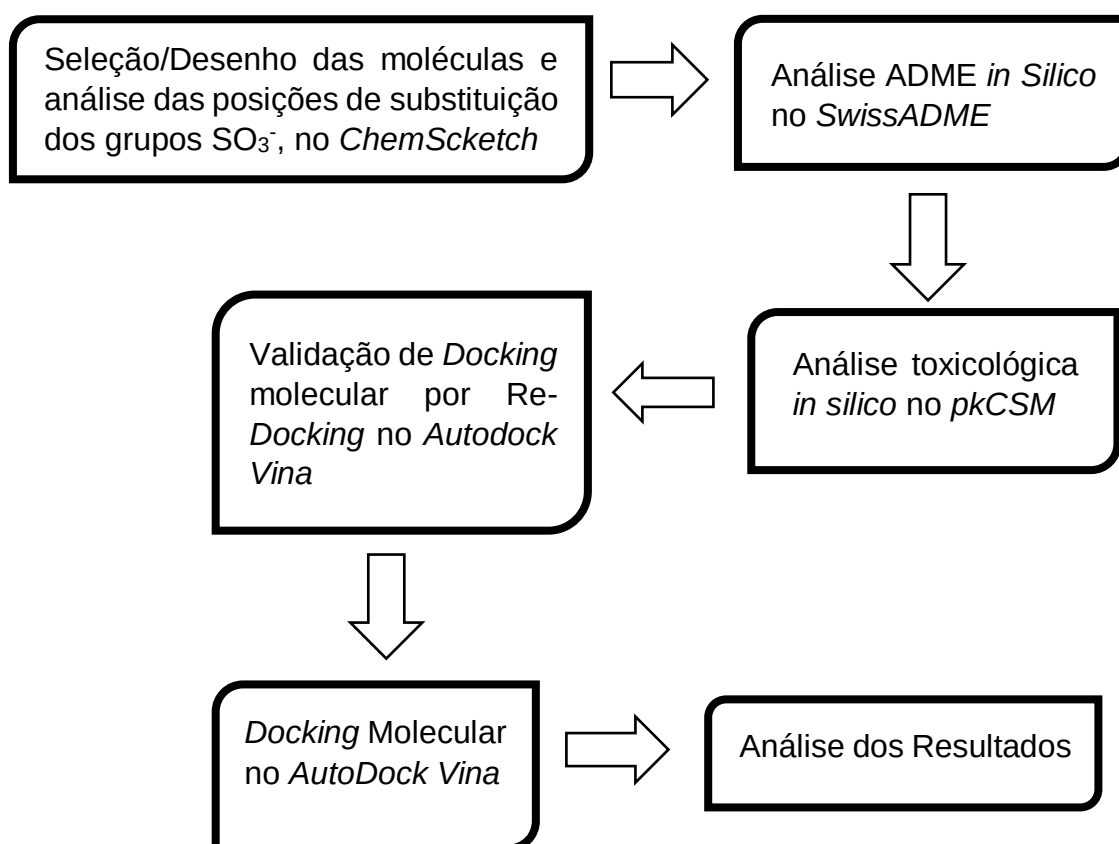
Para realizar o último tratamento, foi utilizado o software *AutodockTools*, nele foram removidas as águas de hidratação, e adicionados os hidrogênios polares e as

cargas de Kollmann, encerrado todos os procedimentos, a estrutura foi salva em formato .pdbqt.

4.3 PREPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS E TESTES ADMET

As estruturas foram modificadas no software *ChemSketch* e seu código SMILES (Simplified Molecular Input LineEntrySpecification) gerado foi transpassado para as duas plataformas utilizadas no estudo. A plataforma *SwissADME* (www.swissadme.ch), foi utilizada para os estudos físico-químicos e farmacocinéticos, enquanto que a plataforma *pkCSM* (www.biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction), foi utilizada para a análise dos parâmetros toxicológicos.

4.4 FLUXOGRAMA DAS ANÁLISES REALIZADAS

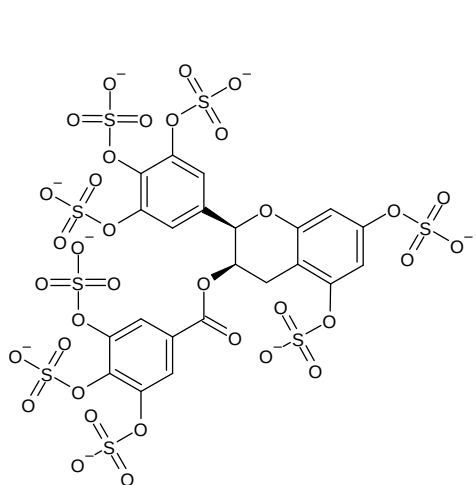


5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

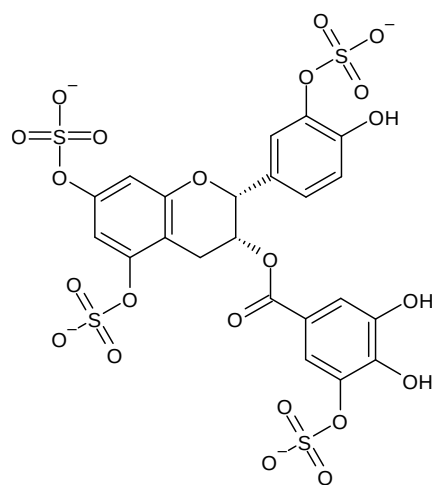
5.1 ESTRUTURA MOLECULAR DAS CATEQUINAS ESTUDADAS

As estruturas desenhadas através do software *ChemSketch*, adicionando-se os grupos de trióxido de enxofre (SO_3^-), em substituição as hidroxilas. Optou-se por não substituir totalmente as estruturas da epicatequina galato sulfatada e D. catequina sulfatada (figura 11), pois em vários dos testes de *docking* realizados, as estruturas totalmente substituídas, mantinham a energia de ligação similar às dos demais compostos estudados. A partir disso, resolveu-se modificar, as estruturas, afim de que elas tivessem uma energia de ligação menor (maior afinidade com o alvo), sem que ocorressem interações desfavoráveis. Por fim, conseguiu-se chegar as estruturas de melhor afinidade e interação com o alvo.

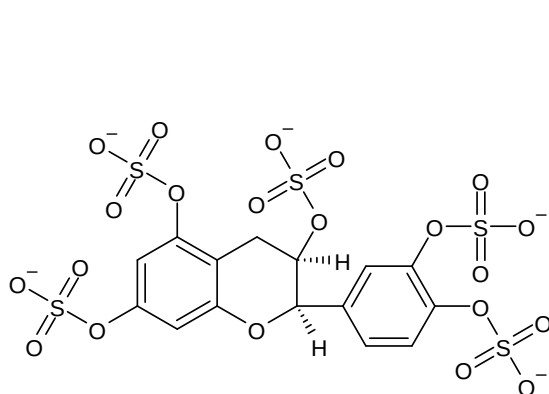
Figura 11 – Estruturas químicas estudadas.



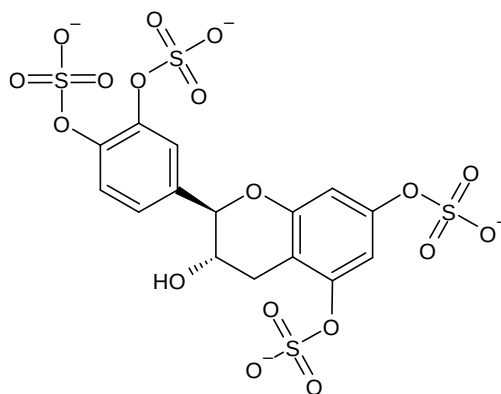
Epigallocatequina galato sulfatada



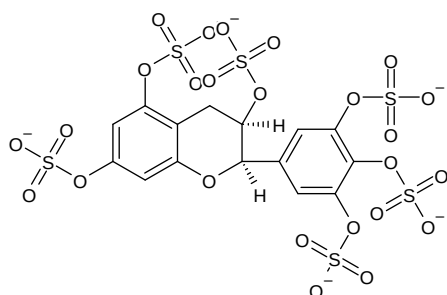
Epicatequina galato sulfatada



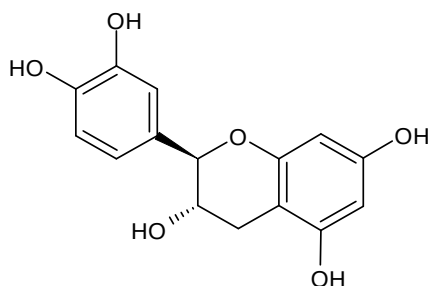
Epicatequina sulfatada



D. catequina sulfatada



Epicatequina galato sulfatada



D. catequina

A utilização das catequinas, juntamente com os grupamentos galato, serviram para aumentar o grau de substituição por sulfatação, aumentando a carga iônica das moléculas, bem como a interação com o receptor. A D. catequina, composto que não foi modificado, foi utilizada como uma estrutura comparativa, com o principal objetivo de verificar as diferenças nas interações e teste ADMET, antes e após a sulfatação da mesma.

5.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os indicadores físico-químicos são usados durante o início do desenvolvimento de fármacos por fornecerem informações que se relacionam com as principais propriedades que afetam as funções biológicas. A partir da plataforma *SwissADME* (www.swissadme.ch), foi possível obter os dados das análises das moléculas estudadas, eles encontram-se dispostos tabela 1.

Tabela 1 - Dados de parâmetros físico-químicos obtidos através do *SwissAdme*.

Propriedades	Epicatequina Sulfatada	ECG* Sulfatada	EGCG* sulfatada	EGC* Sulfatada	D. Catequina	D. Catequina sulfatada
HBA	21	22	35	25	6	18
HBD	0	0	0	0	5	5
MLogP	-1,55	-0,90	-1,99	-2,20	0,24	-1,29
MW (g/mol)	685,54	758,59	1090,81	780,60	290,27	610,52
n-ROTB	11	12	20	13	1	9
TPSA (Å²)	383,28	395,46	634,01	458,09	110,38	317,38

EGCG: Epigallocatequina Gallato

EGC: Epigallocatequina

ECG: Epicatequina gallato

O potencial do medicamento é ativo por via oral quando atende aos seguintes critérios: a) peso molecular ≤ 500 da; b) $\text{LogP} \leq 5$ (ou $\text{MLogP} \leq 4,15$); c) número de aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10 ; d) número de doadores de pontes de hidrogênio ≤ 5 (Lipinski *et al.*, 1997).

Moléculas que apresentam alto peso molecular podem não ser bem absorvidas pelo trato gastrointestinal, além disso compostos com peso molecular menor que 500 g/mol são facilmente transportados por proteínas (Da Silva; Holanda, 2020). Todos os compostos sulfatados modificados encontram-se fora da regra de Lipinski, quanto a esse parâmetro, isso se deve principalmente, que, após a adição dos grupos sulfatos, os compostos passaram a apresentar grande massa molar, bem acima do que a regra permite (≤ 500).

O aumento do número de possibilidades de ligações de hidrogênio contribui para a solubilidade em água, mas dificulta a passagem pelas membranas devido ao aumento do número de ligações de hidrogênio que devem ser quebradas para a passagem do fármaco do meio hidrofílico para o meio hidrofóbico representado pela bicamada de fosfolipídeos das membranas celulares e também das membranas das organelas (Xavier, 2012). As catequinas estudadas, estão dentro da regra de Lipinski no que diz respeito ao parâmetro número de doadores de pontes de hidrogênio, pois apresentaram número inferior ao que a regra propõe (≤ 5). Quanto ao parâmetro de aceptores de ligações de hidrogênio, todas as catequinas sulfatadas encontram-se fora da regra.

Veber *et al.* (2002) propôs em seu estudo que para uma boa disponibilidade favorável por via oral o número de ligações rotacionais deve ser menor ou igual a 10, apenas a D. Catequina e a D. Catequina Sulfatada, encontram-se dentro do padrão proposto (tabela 1).

A área de superfície polar (TPSA) e número de ligações rotacionais de fármacos também são bons indicadores de uma boa biodisponibilidade oral. O TPSA está correlacionado com o número de ligações de hidrogênio de uma molécula. E os valores da maioria dos medicamentos comerciais com boa biodisponibilidade oral apresentam TPSA menor que 140 Å (Da Mata Rodrigues; Costa, 2021). Verifica-se

que todas as Catequinas Sulfatadas se encontram fora deste parâmetro. Sendo a D. catequina, a única dentro do parâmetro.

De acordo com os critérios de *druglikeness* estabelecidos por Lipinski, Ghose e Egan, valores de M Log P devem ser menores ou iguais a 4,15 (Silva, 2023). Os valores de MLogP (lipofilicidade) baixos, indicam que os compostos são bem polares e pouco lipofílicos, a consequência disso é que não são absorvidos e rapidamente excretados, apesar de serem metabolicamente estáveis. Essas características são comuns a pequenas moléculas sulfatadas.

5.3 PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

Na tabela 2, encontram-se os resultados obtidos para parâmetros farmacocinéticos no estudo, utilizando o *SwissADME*.

Tabela 2 - Dados de parâmetros farmacocinéticos obtidos através do *SwissAdme*.

Propriedades	Epicatequina Sulfatada	EGC* Sulfatada	EGCG* Sulfatada	EGC* Sulfatada	D.Catequina	D. Catequina Sulfatada
Absorção GI	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Alta	Baixa
Permeabilidade (BHE)	Não	Não	Não	Não	Não	Não
P-gp Substrato	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Inibidor CYP3A4	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não
Permeabilidade na pele (cm/s)	-11,43	-10,78	-14,74	-12,69	-7,82	-10,56
Pontuação de biodisponibilidade	0,11	0,11	0,11	0,11	0,55	0,11

EGCG: Epigallocatequina Gallato

EGC: Epigallocatequina

EGC: Epicatequina gallato

Devido a sua alta massa molecular, os compostos sulfatados têm baixa absorção gastrointestinal, já o composto que não foi modificado, a D.Catequina, possui alta absorção gastrointestinal. Todos os compostos não apresentaram capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE), não podendo ser distribuídos no sistema nervoso central.

A P-gp é responsável por dificultar a permeabilidade às membranas biológicas, protegendo o sistema nervoso central (SNC) de xenobióticos, isso implica que a absorção e atividade dos compostos que não são substrato desta proteína influenciam na farmacocinética das moléculas. Ademais, as P-gp são bombas de efluxo comuns em bactérias de tal modo que este seja um bom indicativo de não excreção das moléculas nas bactérias (Silva, 2023). Todos os compostos apresentaram boa capacidade de atuar como substrato da P-gp.

Apenas a Epicatequina e a Epigallocatequina (EGC), sulfatadas, apresentaram capacidade de inibir a CYP3A4. A inibição enzimática é caracterizada pela diminuição da atividade catalítica de enzimas metabolizadoras, com consequente aumento da meia-vida e da concentração plasmática do fármaco. Frequentemente resulta no aumento da incidência de efeitos adversos e/ou tóxicos, que dependerão da capacidade de ativação de vias metabólicas alternativas aquela inibida e do índice terapêutico (Barreiro; Fraga, 2014).

O valor $\log K_p$ de uma molécula descreve a permeação cutânea. Se o valor de $\log K_p$ é mais negativo, é dito que uma molécula é menos permeável à pele (Sherashiya *et al.*, 2024). Os valores de permeabilidade variaram de -7,82 a -14,74 cm/s (tabela 2), considerando que os compostos sulfatados, possuem baixa permeabilidade, principalmente devido a alta massa molecular, isso faz com que com que essas moléculas não consigam penetrar membranas lipofílicas. Devido a essas características desses compostos, pode ser considerado o uso deles em uma formulação como um creme/gel sobre a pele.

Predições *in silico* da Biodisponibilidade Oral Humana (BOH) é uma importante ferramenta para selecionar um potencial candidato a fármaco, esta característica refere-se à quantidade do fármaco que alcançará a circulação sistêmica para atingir o seu alvo (Falcón-Cano *et al.*, 2020). Com exceção da D. catequina, todos os compostos que tiveram sua estrutura modificada, apresentaram valores de

biodisponibilidade oral baixos. Isso se deve a presenças dos grupos sulfatos, que apresentam alta massa molecular, fazendo com que possuam dificuldade de penetrar as membranas e alcançar a circulação sistêmica. Compostos como D. catequina e epicatequina (Olaokun; Zubair, 2023), possuem boa capacidade de penetrar as membranas, pois possuem baixa massa molar, facilitando assim as suas inserções na circulação sistêmica.

5.4 PARÂMETROS DE TOXICIDADE

A previsão da toxicidade química é um passo fundamental no processo de desenvolvimento de medicamentos. Os cálculos de toxicidade computacional não são apenas mais rápidos do que as determinações de dosagem tóxica animal, mas também podem ajudar a reduzir o número de ensaios em animais (Sherashiya *et al.*, 2024). A tabela exhibe os resultados obtidos dos parâmetros toxicológicos para as catequinas estudadas.

Tabela 3 - Dados de parâmetros toxicológicos obtidos através do *pkCSM*.

Propriedades	Epicatequina Sulfatada	ECG* Sulfatada	EGCG* sulfatada	EGC* Sulfatada	D. Catequina	D. Catequina Sulfatada
AMES	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Toxicidade						
Dose máxima tolerada (log mg/kg/dia)	0,439	0,447	0,438	0,438	0,242	0,445
hERG I inibidor	Não	Não	Não	Não	Não	Não
hERG II inibidor	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim
Toxicidade aguda oral (LD50) (mg/kg)	10222,4	10222,4	10222,4	10222,4	8677,9	10222,4

Toxicidade aguda oral	-1133,0	-2389,0	-3517,0	-1383,0	1953,0	4048,0
crônica (log mg/kg/dia)						
Hepatotoxicidade	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Sensibilidade na pele	Não	Não	Não	Não	Não	Não
<i>T. Pyriformis</i> toxicidade (log ug/L)	0,285	0,285	0,285	0,285	0,405	0,285
<i>Minnow</i> toxicidade (log mM)	6538,0	5658,0	7670,0	7618,0	1700,0	6844,0

EGCG: Epigallocatequina Gallato

EGC: Epigallocatequina

ECG: Epicatequina gallato

hERG = human ether-go-go-related gene.

A toxicidade do AMES é uma metodologia amplamente empregada e considerada para verificar o potencial mutagênico de um determinado fármaco utilizando bactérias, indicando assim que quando os resultados são positivos, o estudo composto será mutagênico e pode se comportar como um carcinógeno (Flores-Holguín; Frau; Glossman-Mitnik, 2021). Segundo a tabela, os compostos estudados não apresentaram capacidade de serem mutagênicos (AMES).

As doses máximas toleradas para os compostos estudados, encontram-se na faixa de 0,242 a 0,447 mg/kg/dia (tabela). Intervalos abaixo de ($\leq 0,477$), revelam que as moléculas são pouco tóxicas (Lanka *et al.*, 2023).

Os compostos estudados não apresentaram a capacidade de atuar como inibidor do gene hERG I. Apenas a Epigallocatequina, Epicatequina e D. Catequina, apresentaram a capacidade de inibir o gene hERG II. Sabe-se, que o hERG codifica a subunidade α do canal de potássio que é responsável pela corrente subjacente à repolarização do miócito. Logo, o bloqueio farmacológico do canal hERG gera uma repolarização lenta, e, portanto, um prolongamento do potencial de ação e aumento no intervalo QT que pode ocasionar arritmias e insuficiência cardíaca (De Moura; DE Araújo; De Sousa, 2019).

A DL50 é a dose mediana letal, ou seja, a dose a que 50 % dos indivíduos em estudo morrem após a exposição a um composto. As classes de toxicidade são definidas de acordo com o sistema globalmente harmonizado de classificação de rotulagem de produtos químicos (Sherashiya *et al.*, 2024). As classes de toxicidade (I–VI) são descritas abaixo:

- Classe I: Fatal se ingerido ($LD50 \leq 5$);
- Classe II: Fatal se ingerido ($5 < LD50 \leq 50$);
- Classe III: Tóxico se ingerido ($50 < LD50 \leq 300$);
- Classe IV: Nocivo se ingerido ($300 < LD50 \leq 2000$);
- Classe V: Pode ser prejudicial se ingerido ($2000 < LD50 \leq 5000$);
- Classe VI: Não tóxico ($LD50 > 5000$).

Os compostos estudados se encaixam na classe VI, como não tóxicos. E observando os valores da tabela 3, percebe-se que a toxicidade, nesse parâmetro, diminuiu ainda mais com a adição dos grupos sulfatos as estruturas.

Já no que diz respeito ao teste de toxicidade aguda oral crônica, com exceção da D. Catequina sulfatada e D. Catequina, os outros compostos apresentaram valores baixos de doses que podem ser administradas, sendo esses compostos com baixa toxicidade, quanto a esse parâmetro.

Danos no fígado causados por medicamentos é uma grande preocupação durante o desenvolvimento de novas drogas. O modelo preditivo de hepatotoxicidade do pkCSM utiliza os efeitos colaterais associados ao fígado de 531 compostos avaliados em humanos. Um composto é considerado hepatotóxico quando é predito pelos mesmos eventos patológico ou fisiológico associados ao funcionamento do fígado (Silva; De Melo, 2023). As catequinas estudadas, de maneira geral, não apresentaram a capacidade de serem hepatóxicas, bem como não causar nenhuma irritação a pele, podendo ser possível a sua administração intradérmica.

Foram avaliados impactos ecológicos, como *Minnow* toxicidade e de larvas *T. pyriformis*. *T. Pyriformis* é uma bactéria protozoária, com sua toxicidade frequentemente utilizada como desfecho tóxico, para inibir 50% do crescimento (IGC50) (Do Nascimento *et al.*, 2022). É considerado tóxico, com um valor maior que $> -0,5 \log \mu\text{g/L}$. Os compostos apresentaram valores de toxicidade para *T. pyriformis*,

variando de 0,285 a 0,405 ug/L, sendo a D. catequina, composto que não foi modificado, a apresentar maior toxicidade.

A predição da toxicidade de peixinhos, avalia quanto menor a concentração da molécula, maior o potencial toxico. É considerado com alta toxicidade aguda valores de LC50 abaixo de 0,5mM ($\log LC < -0,3$) (Do Nascimento *et al.*, 2022). Os compostos apresentaram valores que variaram de 1700,0 a 7670,0 mM, sendo assim, os compostos não são considerados tóxicos para esse parâmetro.

5.5 VALIDAÇÃO POR REDOCKING

A validação do método de *docking*, ocorreu por redocking. Esta metodologia consiste na submissão do mesmo ligante co-cristalizado com o bioreceptor e observadas se as interações com os resíduos de aminoácidos e a orientação espacial do ligante são preservadas. Desta forma o RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*) entre o ligante cristalográfico e a proteína devem ser o menor possível, de modo a comprovar a capacidade de predizer os resultados do modelo *in silico* (Nascimento *et al.*, 2020).

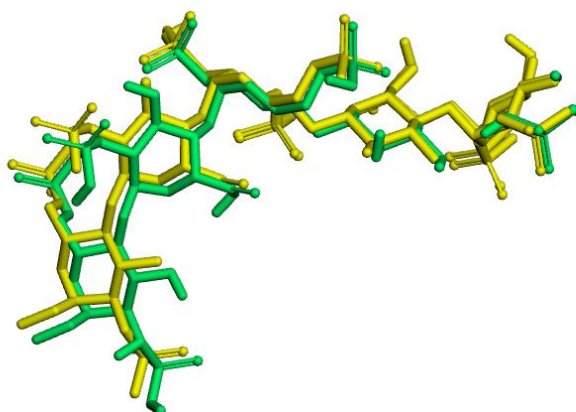
Portanto, foram comparadas as orientações espaciais do nosso ligante co-cristalizado (pentassacarídeo), pré e pós-*docking*. A energia livre de ligação obtida foi de -16,9 kcal/mol, comprovando a alta afinidade biológica entre o ligante pentassacarídeo e a macromolécula, antitrombina III (2gd4). Frequentemente medidas de RMSD abaixo de 2 Å são usadas como critério para a previsão correta da estrutura ligada (Silva, 2023). O RMSD obtido para o nosso ligante no processo de redocking, foi de 0,565 (quadro 1), concluindo que, a metodologia do vina utilizada foi adequada.

Quadro 1 – Informações referentes ao redocking molecular

Ligante	Proteína (PDB)	RMSD	Energia Livre
Pentassacarídeo (Fondaparinux)	Antitrombina III S195A (2gd4)	0,5651	-16,9 kcal/mol

Através da avaliação da pose dos ligantes no redocking (Figura 13), foi possível verificar a sobreposição entre eles, além disso, também foi possível analisar as interações com os resíduos da antitrombina III, que apresentaram grande similaridade, concluindo ser possível a utilização do mesmo procedimento metodológico para outros ligantes com a antitrombina III.

Figura 12 – Sobreposição entre a heparina cocristalizada (amarela) com a redocada (verde).



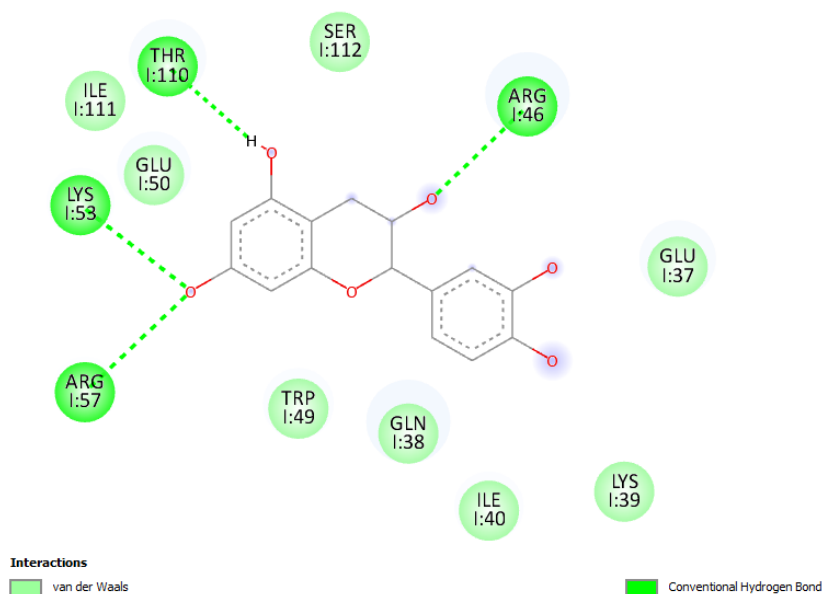
Fonte: Elaboração própria através do software AutodockTools (2024).

5.6 DOCKING MOLECULAR E ANÁLISE DAS INTERAÇÕES

5.6.1 Interações entre a *D. Catequina* e a *Antitrombina III* (fator X)

O resultado de docking obtido entre a *D. catequina* e Antitrombina III (fator X), apresentou energia de ligação de -6,4 kcal/mol. As principais interações (figura 14), foram do tipo ligação de hidrogênio, entre os aminoácidos Arg 46, Lys 53, Arg 57, Thr 110 e *D. catequina*, sendo o resíduo Arg 46, de principal importância, para o complexo de Michaelis, entre a serpina antitrombina III e fator X. Ocorreram também interações fracas, que são de pouca importância na realização de formação e estabilização do complexo.

Figura 13 – Interações entre D. Catequina e Antitrombina III

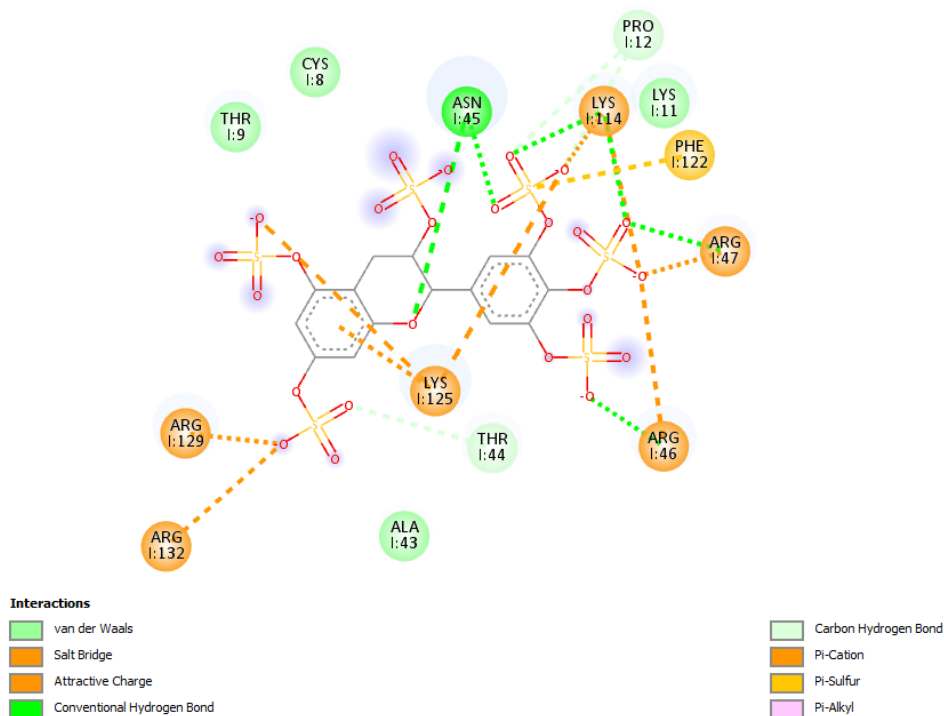


5.6.2 Interações entre a Epigallocatequina sulfatada e a Antitrombina III (fator X)

O resultado obtido a partir do docking realizado, para a interação entre a epigallocatequina sulfatada e antitrombina III (complexo), indicou que a energia livre foi de -6,2 kcal/mol. As principais interações ocorridas, foram as de ligação de hidrogênio e algumas interações iônicas (figura 15). De acordo com Jairajpuri (2003), as interações da heparina com os resíduos Phe 122 e Lys 114 desempenham um papel fundamental na organização de uma extensa rede de interações iônicas e não-iônicas entre resíduos de AT III carregados positivamente e heparina.

Dentre as interações iônicas ocorridas, temos as pontes salinas, carga atrativa, Pi-sulfur, Pi-cátion. Ocorreram também, algumas interações fracas (Cys 8, Thr 9, Lys 11, Pro 12, Ala 43, Thr 44) e ligações de hidrogênio (Asn 45, Arg 46, Arg 47, Lys 114).

Figura 14 – Interações entre a Epigallocatequina sulfatada e Antitrombina III.



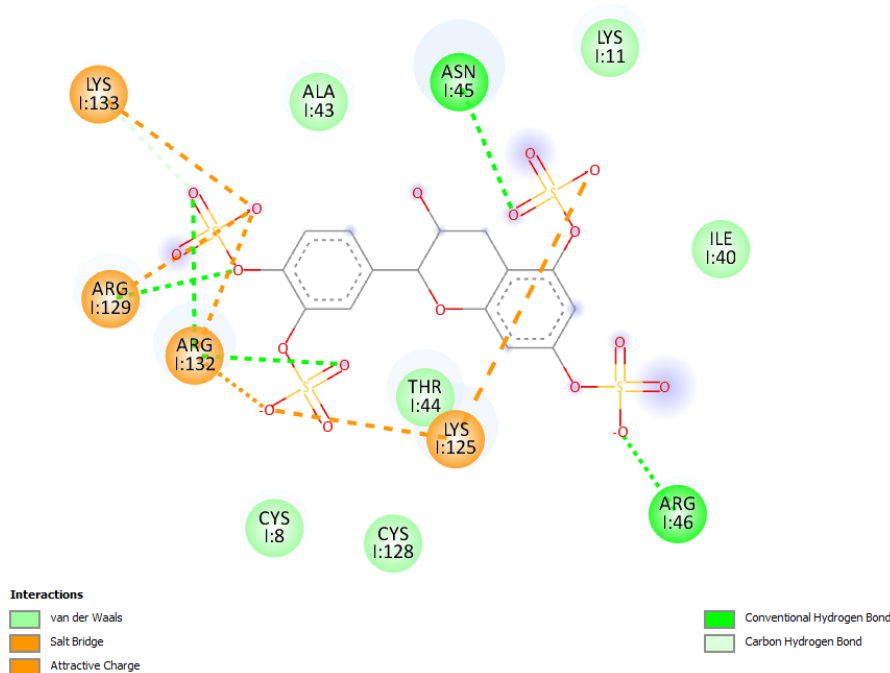
Todos os resíduos que realizam ligação de hidrogênio, são os resíduos principais na interação com a serpina antitrombina, ou seja, são os mesmos resíduos que o pentassacarídeo faz interação com a antitrombina III, formando o complexo estável. Essa similaridade também é observada, quando comparamos os resíduos que realizam interações iônicas, a exemplo de Arg 46, Arg 47, Lys 114, Lys 125, Arg 129, resíduos principais da serpina antitrombina a fazer interação com o pentassacarídeo e que de maneira similar, realizam interação com a epigallocatequina sulfatada.

5.6.3 Interações entre a *D. catequina sulfatada* e a *Antitrombina III* (fator X)

O resultado de docking obtido para *D. catequina sulfatada*, indicou um valor de energia de ligação de -6,9 kcal/mol. As principais interações (figura 16) ocorridas entre o composto e a serpina antitrombina III, foram de ligações de hidrogênio e interações iônicas, a exemplo das pontes salinas e carga atrativa. Também houveram algumas interações fracas, a exemplo das forças de Van Der Waals e carbono-hidrogênio-carbono. Dos principais resíduos da serpina antitrombina III (Arg 46, Arg 47, Lys 114, Lys 125, Arg 129) que fazem interação com o pentassacarídeo para formar o

complexo, apenas Asn 45, Arg 46, Lys 125 e Arg 129, fizeram interação com a D. catequina sulfatada. Sendo os resíduos Asn 45, Arg 46, Arg 129, Arg 132 por ligação de hidrogênio.

Figura 15 - Interações entre a D. Catequina sulfatada e Antitrombina III.

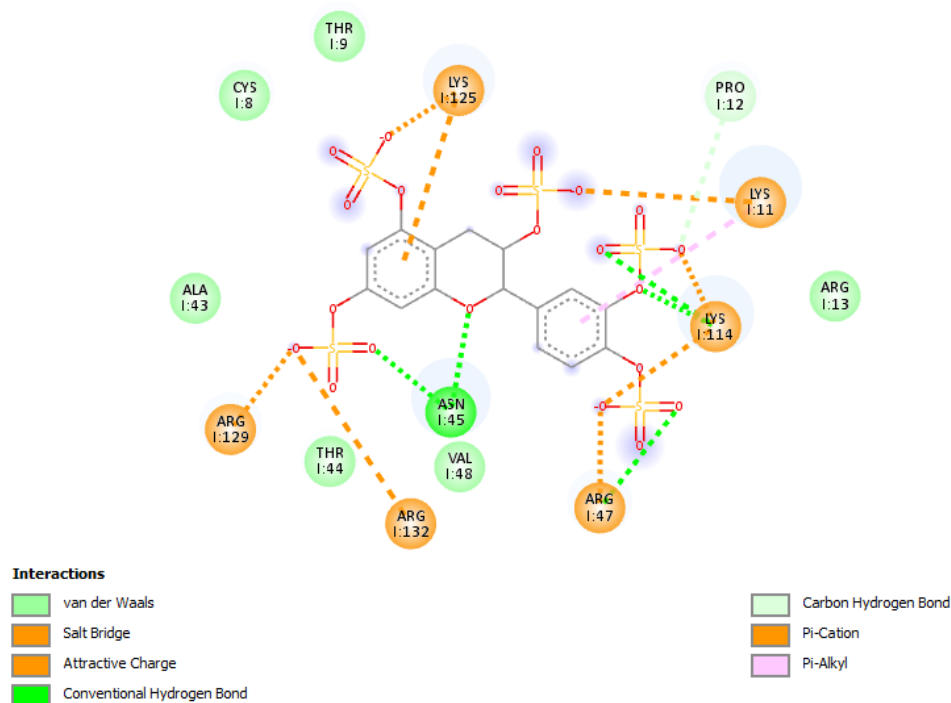


Alguns resíduos realizaram interações fracas, a exemplo de Cys 8, Lys 11, Ala 43, Thr 44, Ile 40, Thr 40. Também houveram interações do tipo ponte salina e carga atrativa entre os resíduos Lys 125, Arg 129, Arg 132 Lys 133 e a D. catequina sulfatada.

5.6.4 Interações entre a Epicatequina sulfatada e a Antitrombina III (fator X)

Os resultados do docking, indicaram que a energia de ligação obtida da interação da epicatequina sulfatada com a serpina antitrombina III, foi de -6,3 kcal/mol. A epicatequina sulfatada, de maneira semelhante às outras catequinas modificadas, realizou várias interações com os principais resíduos da serpina antitrombina III para a formação do complexo estável. Dentre as principais interações (figura 17), temos as ligações de hidrogênio, através dos resíduos Asn 45, Arg 47 e Lys 114. Também houveram interações iônicas, a exemplo dos resíduos Lys 11, Arg 47, Lys 114, Arg 129, Arg 132, sendo os resíduos Arg 47, Lys 114 e Arg 129 de principal importância.

Figura 16 - Interações entre Epicatequina Sulfatada e Antitrombina III.

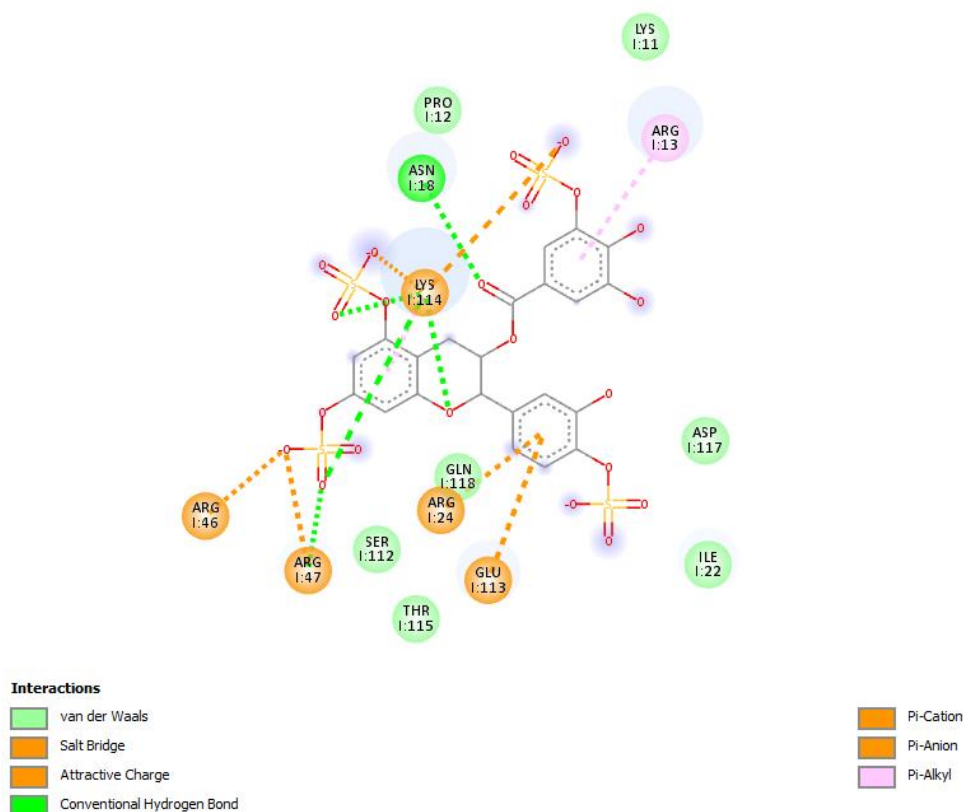


De acordo com a figura 17, também houveram outras interações, a exemplo das fracas forças de Van der Waals entre os resíduos Cys 8, Thr 9, Arg 13, Ala 43, Thr 44, Val 48, e a epicatequina sulfatada. Apenas a Pro 12, realizou interação do tipo carbono-hidrogênio-carbono. Também ocorreu uma interação do tipo Pi-alkyl, hidrofóbica, através da Lys 11, esse tipo de interação tem sua importância, pois ajuda na estabilização e conformação da proteína em seu estado natural.

5.6.5 Interações entre a Epicatequina gallato sulfatada e a Antitrombina III (fator X)

A partir do docking realizado, foi possível obter o valor de energia de ligação entre a epicatequina gallato sulfatada e a antitrombina III, os resultados indicaram haver uma energia de ligação de -7,3 kcal/mol, sendo o composto modificado a possuir maior afinidade com a serpina antitrombina III. Também houveram algumas interações fortes (figura 18), a exemplo das ligações de hidrogênio, entre os resíduos da serpina antitrombina III, Asn 18, Arg 47 e Lys 114, e a epicatequina gallato sulfatada.

Figura 17 - Interações entre a Epicatequina Gallato sulfatada e Antitrombina III.



De acordo com a figura 18, também é possível perceber algumas interações iônicas, dos tipos, ponte salina, carga atrativa, Pi-Cátion, Pi-Ânion, entre os resíduos Arg 24, Arg 46, Arg 47, Glu 113, Lys 114, da serpina antitrombina III e a epicatequina gallato sulfatada. É importante notar que só há quatro grupos sulfatos substituídos na estrutura, e apenas três deles fazem interações com os principais resíduos do alvo molecular, isso significa que, apesar do grau de substituição, isto é, a quantidade de grupos sulfatos na estrutura ser menor, ela realiza as interações necessárias com um grau de afinidade melhor que as outras estruturas. Algo semelhante Chandika *et al.* 2020, observou em seu trabalho, ao avaliar a atividade anticoagulante de quitosanas sulfatadas, quimicamente modificadas, através de docking molecular.

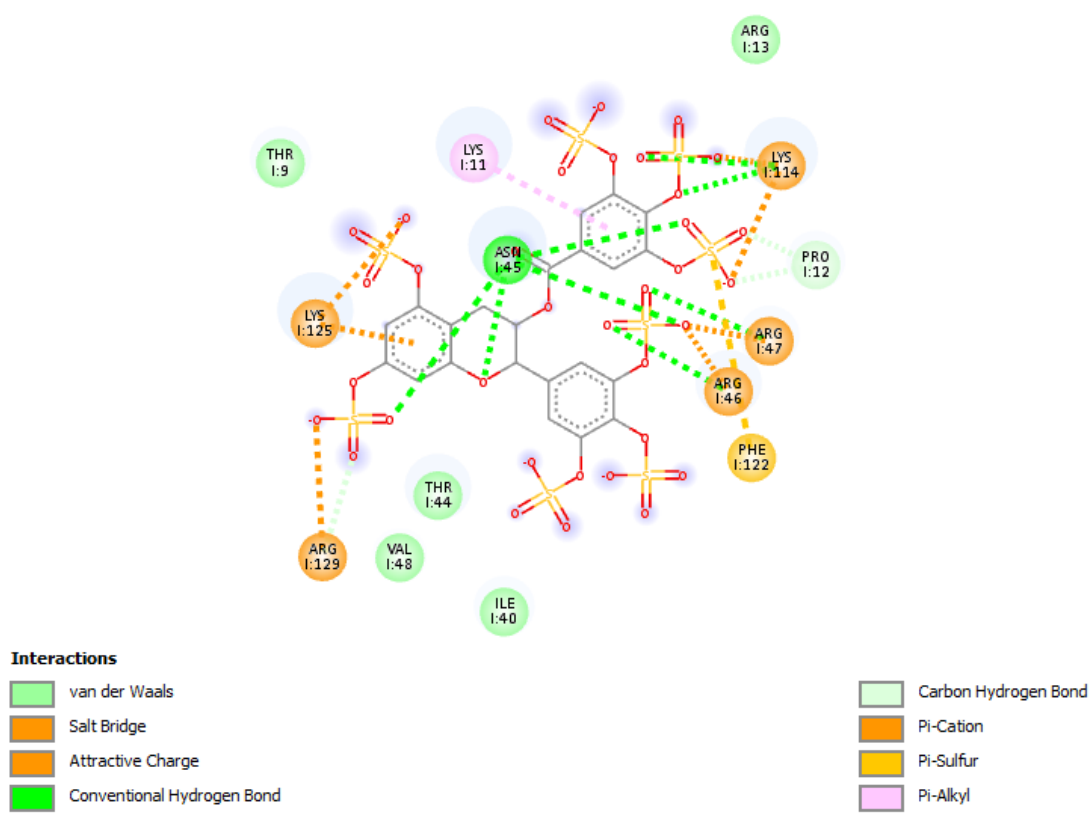
Há também a presença de uma interação do tipo hidrofóbica, Pi-alkyl, entre o resíduo Arg 13 e o anel aromático da epicatequina gallato sulfatada. Houveram também algumas interações fracas, de Van Der Walls, entre os resíduos Lys 11, Pro 12, Ile 22, Ser 112, Thr 115, Asp 117, Gln 118 da Serpina antitrombina III e a Epicatequina gallato sulfatada.

5.6.6 Interações entre a Epigallocatequina gallato sulfatada e a Antitrombina III (fator X)

O valor da energia de ligação obtido a partir do docking realizado, entre a epigallocatequina gallato sulfatada (ECGC) e antitrombina III, foi de -6,2 kcal/mol. A partir da figura 19, é possível visualizar algumas das interações realizadas entre a ECGC e a serpina antitrombina. Dentre as principais, temos as ligações de hidrogênio, entre os resíduos Asn 45, Arg 46, Arg 47 e Lys 114 e ECGC, sendo todos de principal importância, já que são os principais resíduos para a formação do complexo estável ECGC sulfatada-Antitrombina III-Fator X.

Também temos as interações iônicas, dos tipos: ponte salina, carga atrativa, Pi-cátion, Pi-sulfur, a interagirem através dos resíduos Arg 46, Arg 47, Lys 114, Phe 122, Lys 125, Arg 129 com a ECGC. É importante notar que todos os resíduos realizam os mesmos tipos de interação que o pentassacarídeo realiza com a serpina antitrombina III, o que evidencia que, mesmo a molécula possuindo energia de ligação superior, ou seja, menor afinidade com o alvo, ela vai realizar as mesmas interações com o mesmo.

Figura 18 - Interações entre a Epigallocatequina Gallato Sulfatada e Antitrombina III.



5.6.7 Comparação dos resultados

Quando se compara as interações das catequinas (quadro 2), com as do pentassacarídeo, observa-se que a medida que se adicionam mais grupos sulfatados a estrutura, maior será a interação com o alvo proteico, promovendo assim, a atividade anticoagulante. É importante observar que quanto mais grupos sulfatos a estrutura tiver, mais interações similares com as do pentassacarídeo, ela irá realizar. Isso pode ser observado, nas interações realizadas pela epigallocatequina gallato, epigallocatequina, epicatequina, sulfatadas.

Quadro 2 – Interações entre os compostos estudados e a Antitrombina III (fator X)

Moléculas	Energia (kcal/mol)	Interações	
		Tipos	Resíduos
Epicatequina Gallato sulfatada	-7,3	Hidrogênio	LYS 114, ARG 47, ASN 18
		Hidrofóbica-Pi-Cátion, Ânion, Sufur	LYS 11, ARG 132, LYS 114, ARG 13
		Van Der Waals	PRO 12, LYS 11, ASP 117, ILE 22, GLN 118, SER 112, THR 115
		Desvaforável	---
D. catequina sulfatada	-6,9	Hidrogênio	ASN 45, ARG 129, ARG 132, ARG 46
		Hidrofóbica/Pi-Cátion, Ânion, Sufur	ARG 129, LYS 125, LYS 133, ARG 132,

		Van Der Waals	ALA 43, PRO 12, LYS 11, CYS 8, THR 44, CYS 125, ILE 40
		Desfavorável	---
D. Catequina Hidroxilada	-6,4	Hidrogênio	THR 110, LYS 53, ARG 57, ARG 46
		Hidrofóbica/Pi Cation, Ânion, Sufur	---
		Van Der Waals	ILE 111, SER 112, GLU 50, GLU 37, TRP 49, GLN 38, ILE 40, LYS 39
		Desfavorável	---
Epicatequina sulfatada	-6,3	Hidrogênio	THR 44, ASN 45, LYS 125, LYS 114, ARG 129
		Hidrofóbica/Pi-Cation, Ânion, Sufur	LYS 125, ARG 129, ARG 132, LYS 11, LYS 114, ARG 47
		Van Der Waals	ALA 43, THR 9, CYS 8, THR 44, VAL 48, PRO 12
		Desfavorável	---
Epigallocatequina sulfatada	-6,2	Hidrogênio	ASN 45, LYS 114, ARG 46, ARG 47
		Hidrofóbica/Pi-Cation, Ânion, Sufur	LYS 114, PHE 122, ARG 47, ARG 46, LYS 125, ARG 129, ARG 132
		Van Der Waals	THR 9, CYS 8, PRO 12, LYS 11, THR 44, ALA 43
		Desfavorável	---

Epigallocatequina Gallato sulfatada	-6,2	Hidrogênio	ASN 45, ARG 47, ARG 46, LYS 114
		Hidrofóbica/Pi- Cátion, Ânion, Sufur	LYS 125, ARG 129, ARG 46, ARG 47, PHE 122, LYS 114
		Van Der Waals	LYS 11, THR 9, VAL 48, THR 44, ILE 40, ARG 13, PRO 12
		Desfavorável	---

*Resíduos em verde: Fazem interações semelhantes às do ligante co-cristalizado (heparina) com ATIII.

*Resíduos em verde piscina: Principais resíduos da serpina antitrombina III.

É importante observar no quadro 2, que três dos compostos estudados, epigallocatequina, epigallocatequina gallato e epicatequina, sulfatadas, realizam todas as principais interações que o pentassacarídeo realiza com a antitrombina III, sendo que, quatro desses resíduos interagem através de ligações de hidrogênio. Isso significa que esses compostos irão interagir com a antitrombina por mais tempo.

Analisando-se as interações e afinidade da D. catequina e epicatequina, persulfatadas (todos os grupos sulfatos substituídos) com a antitrombina III (fator X), em mesmo pH (7,4), Gunnarson e Desai (2002) obtiveram energias de ligação superiores (-6,5 e -6,2 kcal/mol) às obtidas nesse trabalho, ou seja, com menor afinidade, para ambos os compostos, mesmo assim, ele ainda obteve interações similares, com a antitrombina III. As demais catequinas sulfatadas estudadas, não foram encontrados estudos acerca de suas interações com a antitrombina III (fator X).

Em um estudo com a quitosana sulfatada, dissubstituída, avaliando-se a sua interação com a antitrombina III, Chandika *et al.* (2020) observou em seu trabalho, que mesmo a quitosana possuindo menos grupos sulfatos, ela realizou várias interações com os resíduos principais da antitrombina III, apresentando também, mais afinidade com o alvo (menor energia de ligação), fato também observado nesse trabalho, com a D. catequina e epicatequina gallato, sulfatadas.

É importante observar, a partir do quadro 2, que a ASN 45 (asparagina), realiza ligações de hidrogênio com quase todas as catequinas estudadas, além de é claro, também realizar esse tipo de interação exceção da epicatequina gallato

sulfatada (catequina com maior afinidade com o alvo) e D. catequina. Chandika *et al.* (2020) também observou isso em seu trabalho, avaliando a interação da quitosana sulfatada com a antitrombina III. É interessante destacar que, a se observar, há uma interação envolvendo a epicatequina gallato sulfatada com outra asparagina (ASN 18), também realizando ligação de hidrogênio, compensando a não interação com esse resíduo de certa importância.

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos para os estudos ADMET, é possível concluir que, após as modificações em suas estruturas, todas as moléculas sulfatadas passaram a infringir a regra de Lipinski, passando a ter as características físico-químicas de alta massa molecular, alta polaridade, baixa capacidade de penetrar membranas lipossolúveis, baixa biodisponibilidade oral e capacidade de atuar como substratos da pg-p.

Apenas a Epicatequina e a Epigallocatequina (EGC), sulfatadas, apresentaram capacidade de inibir a CYP3A4. Podendo vir a permanecer mais tempo no corpo, a depender das vias metabólicas utilizadas.

Os compostos estudados apresentaram baixa toxicidade, não possuem a capacidade de serem carcinogênicos, hepatóxicos, ou de causarem sensibilidade a pele. Porém, a epigallocatequina, epicatequina e D. catequina, sulfatadas, apresentaram a capacidade de inibir o gene hERG II, podendo vir a causar problemas cardíacos.

Todos os compostos, através da LD50, apresentaram a característica de não serem tóxicos, a destacar que a adição dos grupos sulfatos, diminuiu ainda mais essa toxicidade.

Além disso, todos os compostos, apresentaram a capacidade de serem tóxicos para larvas *T.piryformis*. Já no que diz respeito ao teste de toxicidade com peixinhos (*Minnow*), todos os compostos apresentaram baixos valores de toxicidade.

Através do método de redocking, foi possível validar a metodologia desse trabalho, o RMSD obtido foi de 0,5651 Å, ficando dentro do que a literatura exige para validação, que é abaixo de 2 Å.

A partir das análises das interações, entre os ligantes estudados e a serpina antitrombina III, foi possível inferir que todos os ligantes sulfatados, realizaram algumas ou todas as principais interações realizadas pelo pentassacarídeo com a antitrombina III (Asn 45, Arg 46, Arg 47, Lys 114, Lys 125, Arg 129), enquanto que a D. catequina, realizou pouquíssimas interações. Dentre todos os compostos

estudados, a Epicatequina gallato e D. catequina sulfatada, foram os que apresentaram maior afinidade com o alvo (menor energia de ligação).

Nenhum dos compostos estudados, apresentaram melhor afinidade com o alvo, que o pentassacarídeo natural (heparina) co-cristalizado. Porém, todas moléculas sulfatadas, realizaram a maior parte das interações que o pentassacarídeo realiza com a antitrombina III, concluindo ser possível, o uso no tratamento de trombose.

Todos os compostos sulfatados estudados, a exceção das epigallocatequina, epicatequina e D. catequina, sulfatadas (que inibem o gene hERG II e podem causar dano cardíaco), por possuírem alta polaridade e baixa lipofilicidade, podem ser administrados pelas vias intravenosa, transdérmica e intramuscular.

REFERÊNCIAS

AGU, P. C. et al. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 13398, 2023.

ALVES, Marcelo S.; STREIT, Livia; PIZZOLATO, Tânia Mara. UTILIZAÇÃO DE MODELOS IN SILICO PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS, FÁRMACOS E METABÓLITOS EM ÁGUAS NATURAIS. **Química Nova**, v. 46, p. 881-889, 2023.

AL-SHABIB, Nasser Abdulatif et al. Molecular interaction of tea catechin with bovine β -lactoglobulin: A spectroscopic and in silico studies. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 3, p. 238-245, 2020.

AREPALLY, Gowthami M. Heparin-induced thrombocytopenia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 129, n. 21, p. 2864-2872, 2017.

BANO, Shadabi et al. Mannose 2, 3, 4, 5, 6-O-pentasulfate (MPS): a partial activator of human heparin cofactor II with anticoagulation potential. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 9, p. 3717-3727, 2023.

BOARON, Carina. OTIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DA PECTINA CÍTRICA QUIMICAMENTE SULFATADA. 2021. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2021. Cap. 2.

BRAIBANTE, Mara Elisa Fortes et al. A química dos chás. **Química Nova na escola**, v. 36, n. 3, p. 168-175, 2014.

CHANDIKA, Pathum et al. Antithrombin III-mediated blood coagulation inhibitory activity of chitosan sulfate derivatized with different functional groups. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1552-1558, 2020.

CHAVES, Douglas Siqueira de Almeida et al. Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. **Química Nova**, v. 33, p. 172-180, 2010.

CORREIA-DA-SILVA, Marta; SOUSA, Emilia; PINTO, Madalena MM. Emerging sulfated flavonoids and other polyphenols as drugs: Nature as an inspiration. **Medicinal research reviews**, v. 34, n. 2, p. 223-279, 2014.

DA SILVA, Welson Vicente; DA SILVA, Wesley Vicente; HOLANDA, Vanderlan Nogueira. ESTUDO IN SILICO DO POTENCIAL DE FÁRMACOS AZÓLICOS SOBRE SARS-CoV-2: UMA ABORDAGEM QUÍMICA-MEDICINAL. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 8, n. 3, p. 636-648, 2020.

DE BRITO, Monique Araujo. Avaliação de propriedades toxicológicas de fármacos in silico no curso experimental de química medicinal. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 4, p. 8-8, 2010.

DE MOURA, Maria Camila Leal; DE ARAÚJO, Verônica Lorranny Lima; DE SOUSA, Joubert Aires. Análise farmacocinética, toxicológica e farmacodinâmica in silico do flavonoide quercetina isolado das sementes de Bixa orellana L. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 3, p. e170932242-e170932242, 2020.

DO NASCIMENTO, Pamela Inácio et al. Análise in silico da toxicidade de metabólitos da espécie *Melissa Officinalis* L. visando obtenção de novos fármacos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 16, p. e114111637606-e114111637606, 2022.

FALCÓN-CANO, Gabriela; MOLINA, Christophe; CABRERA-PÉREZ, Miguel Ángel. ADME prediction with KNIME: development and validation of a publicly available workflow for the prediction of human oral bioavailability. **Journal of chemical information and modeling**, v. 60, n. 6, p. 2660-2667, 2020.

FERREIRA, Leonardo G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

FLORES-HOLGUÍN, Norma; FRAU, Juan; GLOSSMAN-MITNIK, Daniel. In silico pharmacokinetics, ADMET study and conceptual DFT analysis of two plant cyclopeptides isolated from rosaceae as a computational Peptidology approach. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 708364, 2021.

HENRY, Brian L. et al. Interaction of antithrombin with sulfated, low molecular weight lignins: opportunities for potent, selective modulation of antithrombin function. **Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 31, p. 20897-20908, 2009.

ISEMURA, Mamoru. Catechin in human health and disease. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 528, 2019.

GUEDES, Isabella A.; DE MAGALHÃES, Camila S.; DARDENNE, Laurent E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophysical reviews**, v. 6, p. 75-87, 2014.

GUNNARSSON, Gunnar T.; DESAI, Umesh R. Interaction of designed sulfated flavanoids with antithrombin: lessons on the design of organic activators. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 20, p. 4460-4470, 2002.

HASAN, Md Mahmudul et al. In silico molecular docking and ADME/T analysis of Quercetin compound with its evaluation of broad-spectrum therapeutic potential against particular diseases. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 29, p. 100894, 2022.

JAIRAJPURI, Mohamad Aman et al. Antithrombin III phenylalanines 122 and 121 contribute to its high affinity for heparin and its conformational activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 18, p. 15941-15950, 2003.

LAMARÃO, Renata da Costa; FIALHO, Eliane. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Revista de Nutrição**, v. 22, p. 257-269, 2009.

LANKA, Goverdhan et al. Pharmacophore-based virtual screening, 3D QSAR, Docking, ADMET, and MD simulation studies: An in silico perspective for the identification of new potential HDAC3 inhibitors. **Computers in Biology and Medicine**, v. 166, p. 107481, 2023.

LINDAHL, Ulf; LI, Jin-Ping. Heparin—an old drug with multiple potential targets in Covid-19 therapy. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 9, p. 2422-2424, 2020.

LU, Zeyuan; WANG, Feng; LIANG, Mingyu. SerpinC1/Antithrombin III in kidney-related diseases. **Clinical Science**, v. 131, n. 9, p. 823-831, 2017.

JOHNSON, Daniel JD et al. Antithrombin–S195A factor Xa-heparin structure reveals the allosteric mechanism of antithrombin activation. **The EMBO journal**, v. 25, n. 9, p. 2029-2037, 2006.

- MAGGIORA, Gerald et al. Molecular similarity in medicinal chemistry: miniperspective. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 8, p. 3186-3204, 2014.
- MANITHODY, Chandrashekhara; YANG, Likui; REZAIE, Alireza R. Role of basic residues of the autolysis loop in the catalytic function of factor Xa. **Biochemistry**, v. 41, n. 21, p. 6780-6788, 2002.
- NASCIMENTO, Agnis Pâmela Simões do et al. Planejamento, síntese e avaliação in silico de compostos α , β -insaturados atuarem como possíveis antibacteriano e inibidores de β -lactamases. 2020.
- NGUYEN, Khanh; RABENSTEIN, Dallas L. Interaction of the heparin-binding consensus sequence of β -amyloid peptides with heparin and heparin-derived oligosaccharides. **The journal of physical chemistry B**, v. 120, n. 9, p. 2187-2197, 2016.
- OLAOKUN, Oyinlola O.; ZUBAIR, Muhammad S. Antidiabetic Activity, Molecular Docking, and ADMET Properties of Compounds Isolated from Bioactive Ethyl Acetate Fraction of Ficus lutea Leaf Extract. **Molecules**, v. 28, n. 23, p. 7717, 2023.
- RODRIGUES, Laíza Neves et al. Ação inibitória de flavonóides frente a enzima Mpro do SARSCOV2: estudo de docagem e dinâmica molecular. 2022.
- SANTOS, Victória Laysna dos Anjos; GONSALVES, Arlan de Assis; ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo. Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de Lipinski e preparação de heterociclo 1, 3, 4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. **Química Nova**, v. 41, p. 110-115, 2018.
- SALMASO, Veronica; MORO, Stefano. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 393738, 2018.
- SILVA, Beatriz RMG DA et al. In silico ADMET prediction, evaluation of cytotoxicity in mouse splenocytes and preliminary evaluation of in vitro antimalarial activity of 4-(4-chlorophenyl) thiazole compounds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, p. e20230566, 2023.

SILVA, Daniella Felix; DE MELLO PADILHA, Itácio Queiroz. Avaliação in silico de propriedades farmacocinéticas de compostos antileucêmicos publicados por periódicos científicos. **Archives of Health Sciences**, v. 30, 2023.

SILVA, Jhonanta do Nascimento. Avaliação in silico de flavonoides da passiflora incarnata L. com potencial ansiolítico e antidepressivo. 2023.

SHERASHIYA, Meet J. et al. Greener and Highly Efficient Synthesis, In Silico ADMET and Molecular Docking Studies of Potent Antimicrobial Thiophene Clubbed Pyrazole-1, 2, 3-Triazole Hybrids. **ChemistrySelect**, v. 9, n. 2, p. e202304017, 2024.

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.

TELES, Yanna CF; SOUZA, Maria Sallett R.; SOUZA, Maria de Fátima Vanderlei de. Sulphated flavonoids: biosynthesis, structures, and biological activities. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 480, 2018.

WU, Fengxu et al. Computational approaches in preclinical studies on drug discovery and development. **Frontiers in chemistry**, v. 8, p. 726, 2020.