



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

VALDIR FERREIRA DE PAULA JUNIOR

COPAIFERA RETICULATA E SEU COMPOSTO MAJORITARIO B-CARIOFILENO:
EFEITO ANTIPROLIFERATIVO IN VITRO SOBRE LEISHMANIA INFANTUM,
TOXICIDADE E MODELAGEM COMPUTACIONAL

FORTALEZA – CEARÁ

2018

VALDIR FERREIRA DE PAULA JUNIOR

COPAIFERA RETICULATA E SEU COMPOSTO MAJORITARIO B-CARIOFILENO:
EFEITO ANTIPROLIFERATIVO IN VITRO SOBRE LEISHMANIA INFANTUM,
TOXICIDADE E MODELAGEM COMPUTACIONAL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua.

FORTALEZA – CEARÁ

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Paula Junior, Valdir Ferreira de.

Copaifera reticulata e seu composto majoritario ?-cariofileno: efeito antiproliferativo in vitro sobre leishmania infantum, toxicidade e modelagem computacional [recurso eletrônico] / Valdir Ferreira de Paula Junior. - 2018 .

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 113 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2018 .

Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientação: Prof.ª Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua..

1. Promastigota. 2. Amastigota axênica. 3. Modelagem computacional. 4. Fármacoinformática. I. Título.

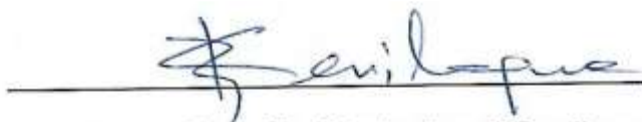
VALDIR FERREIRA DE PAULA JUNIOR

COPAIFERA RETICULATA E SEU COMPOSTO MAJORITARIO B-CARIOFILENO:
EFEITO ANTIPROLIFERATIVO IN VITRO SOBRE LEISHMANIA INFANTUM,
TOXICIDADE E MODELAGEM COMPUTACIONAL

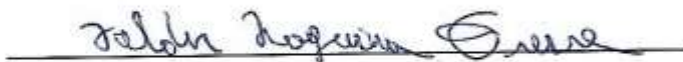
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Aprovado em: 07 de dezembro de 2018

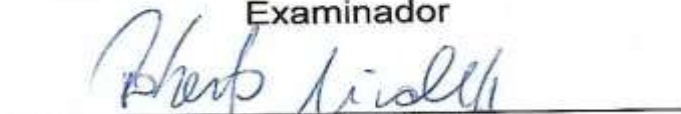
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua
Universidade Estadual do Ceará/ UECE
Orientadora



Prof. Dr. Valder Nogueira Freire
Universidade Federal do Ceará/UFC
Examinador



Prof. Dr. Roberto Nicoleti
Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz/CE

Examinador

Aos loucos desajustados, como Steve Jobs descreve “Isso é para os loucos. Os desajustados. Os rebeldes. Os desordeiros, para os peixes fora d'água. Para aqueles que vêem as coisas de forma diferente. Eles não gostam de regras. E não nutrem o menor respeito pelo *status quo*. Você pode citá-los, discordar deles, glorificá-los ou difamá-los. A única coisa que você não pode fazer é ignorá-los. Porque eles transformam as coisas. Eles impulsionam a raça humana para frente. Enquanto alguns podem ver como loucos, nós vemos o gênio. Porque as pessoas que são loucas o suficiente para achar que podem mudar o mundo são aquelas que o fazem”.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, minha rocha, escudo, minha luz em tempos sombrios, que sempre me abençoa ilumina meus pensamentos e está presente em cada passo e decisão tomada.

Aos meus avós, Raimundo Ribeiro Silva e Maria Zilmar Queros Silva, por serem meu maior exemplo de vida e minha grande dádiva por ensinarem valores reais, pelo amor incondicional que nunca envelhece, dedicação e força. A minha noiva, Ana Odilia, por ser flexível, anteciosa, amorosa, meiga, justa, elegante e maravilhosa comigo, lapidando-me para ser um grande homem. Aos meus pais, Valdir Ferreira de Paula e Raimunda Nonata da Silva Ferreira pelo amor eterno, incentivo e apoio em minhas decisões. Em especial meu querido amado gatinho "SALUZINHO" por tornar minha vida mais alegre e positiva.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida no período de realização do mestrado.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV/FAVET), aos ótimos professores e funcionários.

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias (LABODOPAR) do PPGCV/UECE, pelo acolhimento, suporte técnico e estrutural de qualidade durante toda a realização do curso.

À minha orientadora, prof. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua, pela confiança, acolhimento e oportunidade de compor a equipe LABODOPAR. Especialmente pela grande paciência prestada, por todos os ensinamentos via skype e presencialmente, grande exemplo de competência, zelo, amor e dedicação pelo ensino da pesquisa. À minha coorientadora, profa. Dra. Fernanda Cristina Macedo Rondon por confiar de olhos fechado na minha eterna paixão "Bioinformática", por participar de forma verdadeira auxiliando ou criticando as minhas ideias e planejamento para o bom desempenho do trabalho, pelos questionamentos na execução do projeto e os adendos na melhora da escrita da qualificação e do artigo.

À professora responsável pelo LABODOPAR, Dra. Lorena Mayana Beserra de Oliveira pelo apoio, orientação e auxílio nas práticas do laboratório.

Aos meus amigos do LABODOPAR/UECE, Vilemar, Weibson e Wesley, do laboratório de Virologia LABOVIR/UECE, Dra. Fátima, Maressa, do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LPQN/UECE), Dra. Selene, Alexandre, Claita, Eranildo, Max, Rafael, do Laboratorio de Física/UFC, Ito, Geancarlos, Manuela,

Aos queridos ICs de ambos os laboratórios por tornarem a caminhada mais leve cultivando pensamentos positivos, estimulando o otimismo e encorajando para enfrentar os meus desafios.

“Um talento sem ousadia é paralítico e está fadado ao obsoleto, o talento ousado é único, é uma arte.”

(Valdir Ferreira)

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença de impacto social causada pelo protozoário *Leishmania infantum* ou *L. donovani*. O tratamento da doença consiste no uso de drogas altamente tóxicas com efeitos colaterais graves. *Copaifera reticulata* e seu composto majoritário β -cariofileno destacam-se como promissores na luta contra algumas doenças. Entre as enzimas envolvidas na defesa do parasita intracelular, triparedoxina-I (TXN-I) é um alvo valioso para o planejamento de novas drogas. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação do óleo resina de *C. reticulata* e β -cariofileno sobre promastigotas e amastigotas axênicas de *L. infantum* determinando a concentração inibitória sobre 50% dos protozoários (IC50), assim como avaliar a toxicidade aguda em camundongos explorando de forma computacional o mecanismo de ação do β -cariofileno. Adicionalmente, foi realizada análise *in silico* utilizando a proteína triparedoxina-I de *L. infantum* (LiTXN-I) para melhor caracterizar o mecanismo de ação do β -cariofileno, além de sua toxicidade, farmacoinformática, caracterização do LiTXN-I como preditor da estrutura proteica (PSP), validação do modelo 3D e docking molecular. A CI50 do óleo resina de *C. reticulata* foi de 5,9 $\mu\text{g/mL}$ sobre promastigotas e de 2,19 $\mu\text{g/mL}$ sobre amastigotas axênicas, enquanto β -cariofileno obteve CI50 de 2,2 $\mu\text{g/mL}$ sobre promastigotas e de 2,18 $\mu\text{g/mL}$ sobre amastigotas axênicas. Estudos de toxicidade *in vivo* demonstraram que a DL50 foi de 5g, semelhante ao observado *in silico*. Este composto está em conformidade com a regra de Lipinski e foi sugerido como forte candidato para uso no tratamento de LV. Os resultados da absorção, metabolização, distribuição e excreção (ADME) do β -cariofileno demonstraram propriedades aceitáveis na farmacocinetica. A caracterização da TXN-I indicou que está envolvida em duas reações de LiTXN-I (KEGG 1.8.1.8 e KEGG - R03914) e na interação com 10 proteínas essenciais das reações enzimáticas do parasito. Na modelagem molecular do LiTXN-I, o modelo utilizado foi *L. major* (LmTXN-I) (PDB: 3s9f) devido a maior cobertura no alinhamento. O acoplamento molecular do β -cariofileno com LiTXN-I alcançou a energia de ΔG : -6,44 kcal/mol⁻¹ e as constantes de inibição K_i de 19,17 μM . Foi observado que as energias exercidas no complexo droga/proteína foram interações favoráveis do tipo hidrofóbico e de van der Waals, com 5 resíduos

correspondentes. O óleo-resina de Copaiba e β -cariofileno alcançaram desempenho *in vitro* satisfatório sobre *L. infantum* e um perfil tóxico seguro. Na modelagem computacional, β -cariofileno mostrou ser um forte candidato a fármaco contra *L. infantum* evidenciando uma atração seletiva pela enzima *L*ITXN-I.

Palavras-chave: Promastigota. Amastigota axênica. Modelagem computacional. Fármacoinformática

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a disease of social impact caused by the protozoan *Leishmania infantum* or *L. donovani*. The treatment of the disease consists in the use of highly toxic drugs with serious side effects. *Copaifera reticulata* and its major composite, β -caryophyllene stands out as promising in the fight against some diseases. Among the enzymes involved in the defense of the intracellular parasite, tryparedoxin-I (TXN-I) is a valuable target for drugs. The objective of this study was to evaluate the action of the resin oil of *C. reticulata* and β -caryophyllene on promastigotes and axenic amastigotes of *L. infantum*, determining the inhibitory concentration on 50% of the protozoa (IC₅₀), as well as to evaluate the acute toxicity in mice, exploring in a computational way the mechanism of β -caryophyllene action. The aim of this study was to determine the viability of *C. reticulata* resin oil and β -caryophyllene on 50% parasites (IC₅₀) and to evaluate the acute toxicity in mice and computationally evaluate the mechanism of action of β -caryophyllene to combat the parasite. Additionally, *in silico* analysis was performed using tryparedoxin protein from *L. infantum* (LiTXN-I) to better characterize the mechanism of action of β -caryophyllene, besides its toxicity, pharmacoinformatics, characterization of LiTXN-I as a predictor of protein structure (PSP), 3D model validation and molecular docking. The IC₅₀ of the resin oil of *C. reticulata* was 5.9 μ g/mL on promastigotes and 2.19 μ g/mL on axenic amastigotes, whereas β -caryophyllene obtained IC₅₀ of 2.2 μ g/mL on promastigotes and 2,18 μ g/mL on axenic amastigotes. *In vivo* toxicity studies demonstrated that the LD₅₀ was 5g, similar to that observed *in silico*. This compound is in compliance with the Lipinski rule and has been suggested as a strong candidate for use in the treatment of VL. The results of absorption, metabolism, distribution and excretion (ADME) of β -caryophyllene showed acceptable properties in pharmacokinetic. The characterization of TXN-I indicated that it is involved in two reactions of LiTXN-I (KEGG 1.8.1.8 and KEGG-R03914) and in the interaction with 10 essential proteins of the enzymatic reactions of the parasite. In the molecular modeling of LiTXN-I, the model used was *L. major* (LmTXN-I) (PDB: 3s9f) due to the greater coverage in the alignment. The molecular coupling of β -caryophyllene with LiTXN-I reached energy of ΔG : -6.44 kcal/ mol⁻¹ and the inhibition constants K_i of

19.17 μ M. It was observed that the energies exerted on the drug/protein complex were favorable interactions of the hydrophobic and van der Waals type, with 5 corresponding residues. The resin oil of *C. reticulata* and β -caryophyllene achieved satisfactory *in vitro* performance on *L. infantum* and a safe toxic profile. In computational modeling, β -caryophyllene showed to be a strong drug candidate against *L. infantum* evidencing a selective attraction by the enzyme LITXN-I.

Keywords: Promastigote. Axenic amastigote. Computational modeling. Farmacoinformatics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i> spp.....	24
Figura 2-	Estrutura de um lipossoma utilizado no encapsulamento de princípios ativos.....	27
Figura 3-	Copaibeira produtora do óleo resina de copaíba.....	31
Figura 4-	Formas moleculares do cariofileno encontrado na natureza.....	32

CAPÍTULO I

Figura 1-	¹ HNMR spectra (300 MHz, solvente, CDCl ₃) of <i>C. reticulata</i>	57
Figura 2-	¹ HNMR spectra (300 MHz, solvent residual signals CDCl ₃) of <i>C. reticulata</i>	58
Figura 3-	¹³ CNMR spectra (300 MHz, solvent residual signals CDCl ₃) of <i>C. reticulata</i>	58
Figura 4-	Identification of the compounds kaurenoic acid, polyalthic acid and β-caryophyllene by NMR analysis	59
Figura 5-	Metabolic reaction schematizing the participation of the enzyme <i>LtTXN-I</i>	63
Figura 6-	Metabolic reaction characterizing the second activity of the enzyme <i>LtTXN-I</i>	63
Figura 7-	Network of protein interact presented with protuberance on the surface of the proteins <i>LtTXN-I</i> and mesh analysis for visual inspection of the model.....	64
Figura 8-	Problematic residues are presented with protuberance on the surface of the proteins <i>LtTXN-I</i> and mesh analysis for visual inspection of the model.....	66
Figura 9-	<i>LmTXN-I</i> complexed with β-caryophyllene characterizing the favorable interactions, as well as the hydrophobic fields in blue and ionization in red.....	70
Figura 10-	<i>LtTXN-I</i> complexed with β-caryophyllene	

characterizing the favorable interactions, as well as the
fields of hydrophobicity in blue and ionization in red..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Fármacos utilizados no tratamento da Leishmaniose Visceral, conforme orientação do Guia de Vigilância em Saúde.....	60
CAPÍTULO I		
Tabela 1-	Percent volatile compounds of <i>Copaifera reticulata</i> Ducke oil resin.....	61
Tabela 2-	Inhibitory concentration values (IC ₅₀) of <i>Copaifera reticulata</i> and β -caryophyllene on promastigotes and axenic amastigotes of <i>Leishmania infantum</i>	69
Tabela 3-	Free energy estimation and inhibition constant generated during the molecular fit of β -caryophyllene with proteins <i>L</i> iTXN-I and <i>L</i> mTXN-I	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
AIH	Absorção intestinal humana
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASH	Albumina de soro humano
ATP	Trisfosfato de adenosina
CRE	Classificação, rotulagem e embalagem
Cys	Cisteína
Cys-Gly	Cisteínaglicina
DL50	Dose letal para matar 50% dos indivíduos
EUA	Estados Unidos da América
EV	Endovenosa
GSH	Glutathione
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Trisfosfato de guanosina
IC50	Concentração inibitória para eliminar 50% dos indivíduos
IM	Intramuscular
<i>LiTXN-I</i>	Triparedoxina-I de <i>L. infantum</i>
logP	Coeficiente de partição
logPS	Logaritmo do produto da área de superfície permeável
LPP	Ligação às proteínas plasmáticas
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligramas
mL	Mililitro
NAT	N-acetil transferase
OMS	Organização Mundial de Saúde
P450	Citocromo
PBH	Penetração na barreira hematoencefálica

P-gp	Glicoproteína P
pH	Potencial hidrogeniônico
QSAR	Quantitativos de relação estrutura/atividade
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Sb ^{III}	Antimônio trivalente
Sb ^V	Antimônios pentavalentes
ST	Sulfotransferase
SVM	Máquina de vetores de suporte
TDR1	Enzima redutase dependente de tiol
Tg-rasH ₂	Camundongo transgênico
TryR	Tripanotionina redutase
TXN	Triparedoxina
TXNPx	Triparedoxina peroxidase
UGT	Difosfato glucosfato de uridina
µg	Micrograma
[T(SH) ₂]	Via enzimática redox tripanotiona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	LEISHMANIOSE VISCERAL E SEU AGENTE ETIOLÓGICO.....	22
2.2	CICLO DE TRANSMISSÃO.....	23
2.3	DROGAS AUTORIZADAS PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	24
2.3.1	Droga de 1ª escolha (antimonio pentavalente sb^v).....	25
2.3.2	Drogas de 2ª escolha: anfotericina b e sua forma lipossomal....	26
2.4	TRATAMENTO CANINO.....	27
2.5	PLANTAS COM AÇÃO LEISHMANICIDA.....	29
2.5.1	Ação do fitoterápico in vitro.....	29
2.6	AÇÃO IN VIVO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	30
2.7	COPAIFERA RETICULATA.....	31
2.8	COMPOSTO QUÍMICO B-CARIOFILENO.....	32
2.9	ENZIMA TRIPAREDOXINA - I (TXN-I).....	33
2.10	BIOINFORMÁTICA.....	34
2.11	TOXICIDADE E CÁLCULO DA DL50 IN SILICO.....	35
	FARMACOAQUINFORMÁTICA (ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLIZAÇÃO E EXCREÇÃO - ADME).....	36
2.12	MÉTODOS COMPUTACIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DA ESTRUTURA 3D.....	38
2.13	DOCKING MOLECULAR.....	39
3	JUSTIFICATIVA	42
4	HIPÓTESES CIENTÍFICAS	43
5	OBJETIVOS	44
5.1	GERAL.....	44
5.2	ESPECÍFICOS.....	44
6	ARTIGO.....	45
6.1	ARTIGO SUBMETIDO: JOURNAL OF	45

	ETHNOPHARMACOLOGY.....	
7	CONCLUSÃO	84
8	PERSPECTIVAS	85
	REFERÊNCIAS	86
	ANEXOS	101
	ANEXO A - CERTIFICADO CEUA/UECE.....	102
	ANEXO B - MATERIAL SUPLEMENTAR - ARTIGO.....	103

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é um problema de saúde pública recorrente e expansível, sendo endêmica em 97 países e territórios, com 616 milhões de pessoas residindo em áreas de risco de infecção. Em 2015 foi relatado que 90% dos casos ocorrem em apenas 6 países, sendo eles, Brasil, Índia, Somália, Etiópia, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2017). No Brasil o agente etiológico da LV é *Leishmania infantum* (sinonímia *Leishmania chagasi*) que é transmitida por meio da picada do inseto vetor, o flebotomíneo fêmea, da ordem díptera, família Psychodidae, *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON; RANGEL, 2005). Caracteriza-se como doença crônica cuja letalidade é alta quando associada a má nutrição e coinfeções, bem como quando o tratamento adequado não é estabelecido (SUNDAR, 2015).

Os órgãos de saúde no Brasil preconizam para o controle dessa enfermidade medidas profiláticas visando o hospedeiro humano, o reservatório canino e o vetor. Com relação ao hospedeiro humano suscetível, o tratamento da LV consiste no uso de drogas sintéticas baseado no protocolo terapêutico com o uso de antimoníato de N-metil glucamina (Glucantime®) e não antimoniais, como a anfotericina B e sua forma lipossômica (SHARIEF *et al.*, 2006). No entanto, a eficácia de tais terapias é limitada por causa da alta toxicidade e efeitos colaterais adversos, bem como o aparecimento de cepas de protozoários resistentes (CROFT *et al.*, 2006).

Uma alternativa promissora é o uso de plantas e seus constituintes metabólicos, para os quais vários estudos científicos mostraram efeitos sobre promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp (ULLAH *et al.*, 2016; VILA-NOVA *et al.*, 2013). Das plantas com atividade antimicrobiana, destaca-se o gênero *Copaifera*. Essa árvore, popularmente conhecida como copaíba, é uma planta amplamente distribuída no Brasil. Atinge cerca de 36 m de altura e diâmetro de 3 m. O óleo resina obtido do tronco dessas árvores é amplamente comercializado em todo o Brasil devido às suas propriedades antiinflamatórias (BASILE *et al.*, 1988; VEIGA E PINTO, 2002). É também usado contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (FERNANDES *et al.*, 2007; GERIS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2003).

Além disso, atividades anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* foram descritas (MACIEL *et al.*, 2002; RONDON *et al.*, 2012).

Um estudo envolvendo a triagem de oito óleos resina de *Copaifera* spp. mostraram que *C. reticulata* exibiu melhor atividade contra promastigotas, amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* (SANTOS *et al.*, 2008). O principal constituinte químico encontrado nos óleos resinosos do gênero *Copaifera* é o β -cariofileno, composto presente no grupo sesquiterpênico devido às suas propriedades físico-químicas. Na natureza, ocorre em isômeros, trans-cariofileno, β -cariofileno, α -humuleno, óxido de β -cariofileno e emite um odor de madeira (FIDYT *et al.*, 2016). O β -cariofileno possui atividade anti-inflamatória (Shimizu *et al.*, 1990), antimicrobiana e antioxidante (SAHIN *et al.*, 2004). No entanto, o mecanismo de ação do β -cariofileno ainda é desconhecido.

Nos tripanossomatídeos, uma das vias metabólicas de escolha para a ação de produtos sintéticos e naturais é a via antioxidante (FAIRLAMB; CERAMI, 1985). A via enzimática redox tripanotiona $[T(SH)_2]$ que contém duas moléculas de glutathione em conjunto com a tripanotionina redutase (TryR), triparedoxina (TXN) e proteínas da triparedoxina peroxidase (TXNPx) está envolvida na defesa intracelular do parasita contra o estresse causado por espécies reativas de oxigênio (ROS) (SINGH *et al.*, 2017) e drogas (MUKHOPADHYAY *et al.*, 1996). Estudos relataram que drogas antimonial interferem diretamente no metabolismo tiol induzindo efluxo de intracelular $[SH_2]$. A falta dessas enzimas no hospedeiro torna possível formular estratégias baseadas em alvos pela abordagem computacional (KRAUTH-SIEGEL ; COOMBS, 1999). Das proteínas envolvidas no balanço redox do parasita, TXN e TXNPx também atuam na biossíntese de DNA (FIORILLO *et al.*, 2012). TXN tem duas formas homólogas, TXN-I, que é encontrado no citosol e é considerado essencial para o equilíbrio oxidativo e TXN-II encontrado nas mitocôndrias (WILKINSON *et al.*, 2003). TXN-I é um bom alvo para ação de novas drogas contra *Leishmania* spp. Embora essa via de desintoxicação não seja a única utilizada pelo parasita, é essencial para sua sobrevivência, tornando seus constituintes mais atrativos como alvos potenciais de drogas (FIORILLO *et al.*, 2012).

A associação funcional de proteínas é crucial no fluxo de informação de energia celular. O *cluster* de associação funcional de proteínas de um organismo caracteriza as proteínas envolvidas em uma função celular, permitindo a adaptação de drogas a outro alvo proteico participante da cascata metabólica de interesse (SZKLARCZYK *et al.*, 2017).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL E SEU AGENTE ETIOLÓGICO

A Leishmaniose Visceral (LV) é considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Esta doença quando não tratada, pode agravar, levando o hospedeiro a óbito em até 90% dos casos (MIRÓ *et al.*, 2008). No Ceará, foram notificados 9.228 casos de Leishmaniose visceral, e destes 5.657 (61,3%) foram confirmados entre os anos de 2007 a 2016. Vários fatores estão associados a estes acontecimentos como: transformações ambientais, movimento migratório e o processo de urbanização que favorecem em parte a ocorrência da LV, a qual até a década de 1970 era restrita a área rural.

As influências desses fatores contribuíram para a disseminação para outros estados do Brasil, o que comprova o aumento de casos nas regiões Sudeste e Centro-Oeste e o aparecimento de casos autóctones na Região Sul, tanto de casos humanos quanto caninos (BRASIL, 2014). Vale ressaltar que o cão é o principal reservatório do protozoário na área urbana e de acordo com alguns estudos a presença de casos caninos antecede a ocorrência de casos humanos (MELO, 2004). Já na área rural e no ambiente silvestre, as principais fontes de infecção são as raposas, marsupiais e roedores (ABRANTES *et al.*, 2018).

A LV é uma doença considerada zoonótica podendo acometer o homem, (BRASIL, 2014). Esta doença é causada por um parasito intracelular obrigatório, do gênero *Leishmania*, que apresenta duas formas: amastigotas, que são ovóides com flagelo rudimentar em seu interior, considerada a primeira etapa da infecção parasita o sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro definitivo (LAINSON; RANGEL, 2005). A segunda forma conhecida como promastigota, flagelada que ocorre apenas no vetor flebotomíneos, pertencentes a ordem díptera, família Psychodidae, com as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* responsáveis pela disseminação da doença (BRASIL, 2014). No Brasil, as fêmeas de *L. longipalpis* são consideradas o principal vetor, no entanto outras espécies vem sendo investigadas quanto sua participação no

ciclo de transmissão (BRASIL, 2014; LUKES *et al.*, 2007 MAGILL, 1995; RODRIGUES *et al.* 2016).

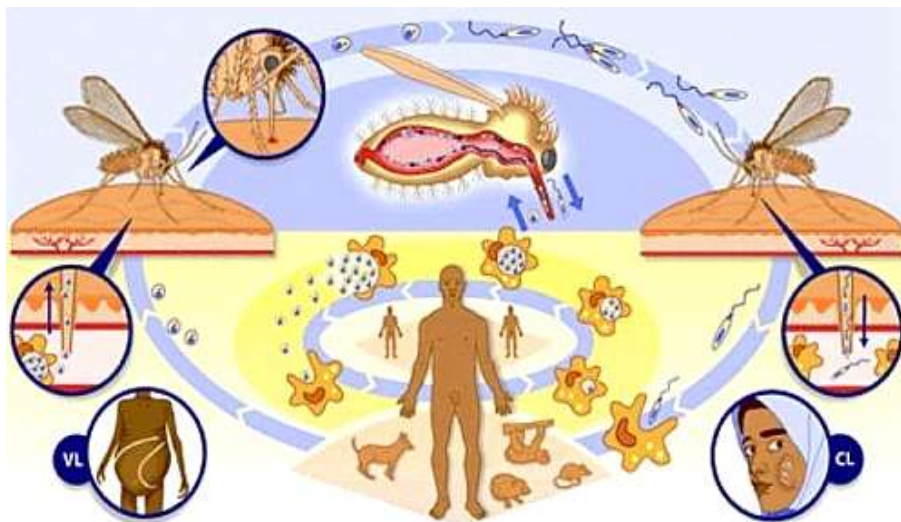
2.2 CICLO DE TRANSMISSÃO

O tempo médio para o parasito completar seu ciclo no vetor, está entre 6 a 9 dias e nos hospedeiros principais: humano de 10 dias a 2 anos, com média entre 2 e 6 meses, e no cão, varia de 90 dias a vários anos, com média de 3 a 7 meses (BRASIL, 2014; ROGERS; BATES, 2007).

O ciclo inicia quando o flebotomíneo faz seu repasto sanguíneo e ingere a forma amastigota de um hospedeiro infectado (BRYCESON, 1996). As diversas etapas do ciclo são denominadas metaciclogênese. As amastigotas sofrem várias transformações no tubo digestivo médio do vetor, atingindo a forma infectante, as promastigotas metacíclicas. Após sucessivas divisões binárias as promastigotas retornam à porção anterior e localizam-se na probóscide do inseto vetor, assim durante o próximo repasto sanguíneo no hospedeiro suscetível as formas infectantes serão regurgitadas na corrente sanguínea (SCHLEIN ; WARBURG, 1986; SCHLEIN *et al.*, 1992).

No hospedeiro suscetível recém infectado, a promastigota é rapidamente fagocitada por células do sistema fagocítico mononuclear. Após a sua instalação no macrófago, o parasito protegido no vacúolo parasitóforo, quando ocorrerá nova transformação de promastigota para amastigota devido a mudança de pH que se torna mais ácido e ao aumento da temperatura do hospedeiro mamífero. As amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo se multiplicam por fissão binária provocam a ruptura da célula infectada, ganham a circulação e se disseminam para órgãos de predileção (Figura 1) (PIMENTA *et al.*, 1994; ROGERS; BATES, 2004).

Figura 1 - Ciclo de vida do protozoário *Leishmania* spp.



Fonte: <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/>

2.3 DROGAS AUTORIZADAS PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

O tratamento da leishmaniose visceral (LV) teve início em 1912 quando o médico Gaspar de Oliveira Vianna, observou que o tártaro emético era eficaz no tratamento da leishmaniose tegumentar americana e LV. Entretanto, por apresentar altos índices de toxicidade, e alto grau de efeitos colaterais em pacientes submetidos a esse tratamento, o tártaro emético, foi substituído por outro grupo de fármaco, os antimoniais pentavalentes, Sb^V (RATH *et al.*, 2003).

No Brasil utiliza-se o antiomoniato de meglumina comercialmente denominado Glucantime®. Contudo, apesar desse medicamento ser menos tóxico que o antimônio trivalente (tártaro emético), ainda apresentava efeitos adversos que tornaram inviável o seu uso em certos pacientes. Assim outros princípios ativos foram sendo descobertos e os mais utilizados para o tratamento segundo recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016) e seus respectivos protocolos terapêuticos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Fármacos utilizados no tratamento da Leishmaniose Visceral, conforme orientação do Guia de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2016).

Fármaco	Apresentação	Terapêutica
Antimoniato de N-metil Glucamina (Glucantime®)	Ampolas de 5mL contendo 1.500mg (300mg/mL) os quais 405mg (81mg/mL) são SbV.	20mg/SbV/kg/dia, EV ou IM, 20 a 40 dias
Desoxicolato de anfotericina B	Frasco com 50mg de desoxicolato sódico de anfotericina B liofilizada	1mg/kg/dia EV, 14 a 20 dias
Anfotericina B lipossomal	Frasco/ampola com 50mg de anfotericina B lipossomal liofilizada	1mg/kg/dia EV, 14 a 20 dias

Fonte: elaborado pelo autor

2.3.1 Droga de 1ª escolha (antimônio pentavalente Sb^V)

Os fármacos pentavalentes são os mais utilizados no combate a leishmaniose visceral, empregado há mais de 8 décadas. (BRASIL, 2014; CHAPPUIS *et al.*, 2007; MONGE-MAILLO *et al.*, 2013). Possuindo duas bases de formulação: SbV com N-metil-D-glucamina (Glucantime®), e o gluconato de sódio (Pentostam®) (FRÉZARD *et al.*, 2009).

O tratamento da LV com o uso do antimônio pentavalente, é considerado um tratamento estafante. Sua administração é diária e por via parenteral, em um longo período de dias, conforme tabela acima. Vale ressaltar, que nesse intervalo de tempo, o paciente acaba expressando diversos efeitos colaterais, como arritmia, pancreatite aguda (CHAPPUIS *et al.*, 2007, SUNDAR *et al.*, 2013). Ademais pacientes com doenças graves nos rins, fígado, coração, pulmões ou desnutrição protéica são inválidos para o tratamento com antimoniais pentavalentes. (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

O antimônio pentavalente utilizado no Brasil é conhecido comercialmente como Glucantime® com a forma molecular C₇H₁₈NO₈SB. Esse princípio ativo é obtido a partir da síntese do ácido antimônico do N-metil-glucamina e possui solubilidade alta em água e baixa em solvente orgânico (RATH *et al.*, 2003).

Algumas hipóteses acerca dos mecanismos de ação dos antimoniais pentavalentes já foram descritas. Uma delas trabalha com a hipótese de que o antimônio pentavalente ao entrar no vacúolo parasitóforo do macrófago, é convertido em antimônio trivalente, induzindo o efluxo de grupo tiol intracelular, resultando na inibição da tripanotona redutase presente na *Leishmania* spp., ocasionando a morte do parasito (SINGH *et al.*, 2014). Sugere-se também que a transformação do Sb^V para Sb^{III} é feita com a participação da enzima redutase dependente de tiol (TDR1) que utiliza a glutatona (GSH) como redutor (DENTON *et al.*, 2004). Existem outras hipóteses como a mudança do Sb^V para o Sb^{III} sendo realizada por tióis cisteína (Cys) e cisteínaglicina (Cys-Gly) além da tripanotona (T[(SH)]₂) (FAIRLAMB; CERAMI, 1992). Outro mecanismo de ação proposto seria o aumento de citocinas, induzindo mutações no DNA do parasito alterando a cascata metabólica (SINGH *et al.*, 2012). Uma outra hipótese seria a interferência no processo de β -oxidação dos ácidos graxos e na glicólise do parasito levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular (BERMAN, 1988).

2.3.2 Drogas de 2ª escolha: anfotericina b e sua forma lipossomal

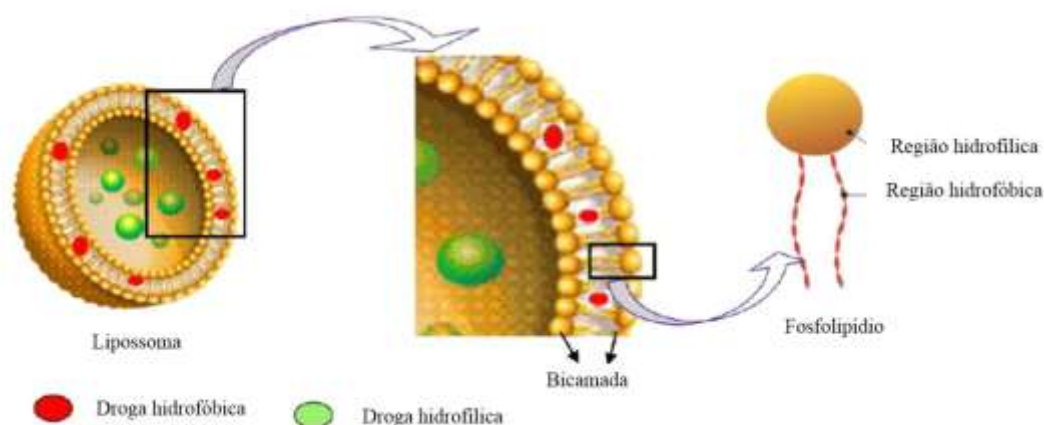
A anfotericina B, é um antibiótico poliênico, sistêmico com propriedade leishmanicida tanto sobre promastigotas quanto sobre amastigotas. Atualmente apresenta duas formas comerciais: o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; SUNDAR *et al.*, 2013).

Esse composto possui alto grau de toxicidade, provocando disfunção renal, nefrotoxicidade, hipocalemia, miocardite, dor, febre, entre outras reações adversas (CHAPPUIS *et al.*, 2007; SUNDAR *et al.*, 2013). Seu mecanismo de ação está relacionado com a ligação aos esteróides das membranas biológicas, ocasionando a

aberturas de poros na membrana, afetando a fluidez e a permeabilidade seletiva, levando a lise celular (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2012).

A anfotericina lipossomal tem como diferença da forma do desoxicolato de anfotericina B a sua associação com o lipossoma, sendo esta uma nanotecnologia de alta especificidade, formada por várias camadas lipídicas, isolando o meio interno aquoso do externo (FREZARD, 1999). Esta ferramenta, nanotecnológica tem a capacidade de encapsular substâncias hidrofílicas, protegendo a absorção rápida do princípio ativo e minimizando os efeitos tóxicos criados pelo medicamento, ou a agregação de substâncias lipofílicas na bicamada lipídica do lipossoma (Figura 2) (BAROLI, 2010; CHORILLI *et al.*, 2004).

Figura 2 - Estrutura de um lipossoma, utilizado no encapsulamento de princípios ativos



Fonte: Sandeep *et al.* (2013).

2.4 TRATAMENTO CANINO

Até o primeiro semestre 2016, o tratamento canino no Brasil era proibido de acordo com a portaria 1426/2008 (BRASIL, 2016). Os casos caninos confirmados por meio do diagnóstico sorológico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) eram eutanasiados como medida de controle da disseminação da doença, de acordo com o Ministério da Saúde e Organização mundial da Saúde (BRASIL, 2016; OLIVEIRA *et al.*,

2005). Entretanto, a disseminação da doença ainda é evidente apesar dos esforços empregados para controle dessa zoonose. Sugerindo assim que a eutanásia dos casos caninos não tem surtido o efeito desejado a redução dos casos humanos (BRASIL, 2016). Em 2016 a comercialização do primeiro fármaco para o tratamento canino, Milteforan®, foi aprovada. Seu princípio ativo é a miltefosina. A via de administração é menos agressiva ao hospedeiro, pois é via oral. A miltefosina é utilizada no tratamento humano do calazar indiano cujo agente etiológico é o protozoário *Leishmania donovani* que causa a doença antroponótica (SUNDAR *et al.*, 2002).

No Brasil, milteforan é o único fármaco autorizado pelo MAPA para tratamento da LVC, de acordo com a Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 – MAPA/MS, cuja comercialização é feita pela Virbac. O medicamento já demonstra altas taxas de recaída na Índia, devido a diminuição da eficácia do tratamento da LV (SUNDAR *et al.*, 2012). Seu mecanismo de ação não está bem definido, mas sugere-se que miltefosina interfere principalmente, na membrana plasmática do parasito, afetando a fluidez e a permeabilidade seletiva, o balanço iônico e o metabolismo de fosfolípido e assim ocasionando sua destruição (SUNDAR *et al.*, 2002).

Apesar da existência de drogas sintéticas a LV em humanos e cães tem demonstrado uma grande expansão geográfica e cada vez mais aumentado os valores de incidência e óbito (BRASIL, 2014). Portanto, a pesquisa científica para obtenção de novos princípios ativos se torna essencial, visto que o aumento de casos em áreas consideradas anteriormente indenes, como a região Sul do Brasil (RIO GRANDE DO SUL, 2009) bem como, o aumento de número de óbitos (BRASIL, 2014) sugerem que as medidas profiláticas podem ser falhas e insuficientes para o completo controle e prevenção da LV. Contudo os estudos que têm sido realizados demonstraram resultados conflitantes (MINAS GERAIS, 2012). Dietze *et al.*, (1997) em ensaio controlado, investigaram o papel de cães soropositivos na infecção humana por LV. Não encontraram diferenças significativas entre a incidência de soroconversão de humanos nas áreas de intervenção comparadas à área-controle ao final de 12 meses de estudo, apesar da retirada dos cães soropositivos. Oliveira e Araújo (2003) avaliaram as ações de controle de LV desenvolvidas rotineiramente em Feira de Santana, Bahia, no período de 1995 a 2000. Encontraram relação significativamente inversa entre

número de ciclos de borrifação de imóveis para controle vetorial e incidência de casos humanos. Dye (1996) modelou o efeito de diferentes estratégias na transmissão da leishmaniose e mostrou que o controle vetorial químico foi mais efetivo do que o controle dos reservatórios na redução da incidência e da prevalência tanto da LV humana quanto da canina.

A obtenção de novos princípios ativos é uma necessidade premente para o tratamento desta doença. Uma das fontes incontestáveis de novos compostos terapêuticos são as plantas.

2.5 PLANTAS COM AÇÃO LEISHMANICIDA

2.5.1 Ação in vitro de plantas medicinais

A busca de um fitoterápico, como uma alternativa no tratamento da leishmaniose, vem sendo abordado pelos órgãos de saúde mundiais (DNDi, 2014).

Costa *et al.* (2006) relataram que alcaloides extraídos da casca da planta *Annona foetida* apresentou atividade leishmanicida sobre *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis*. Os extratos brutos de CH₂Cl₂ e MeOH possuem atividade *in vitro* contra *L. braziliensis* (IC₅₀ 23.0 e 40.4 µg/mL, respectivamente) e *L. guyanensis* (IC₅₀ 2.7 and 23.6 µg/mL, respectivamente)

O efeito de oito espécies do gênero *Copaifera*, *C. multijuga*, *C. officinalis*, *C. reticulata*, *C. lucens*, *C. langsdorffii*, *C. paupera*, *C. martii*, e *C. cearensis* sobre *L. amazonensis* demonstrou que a espécie *C. reticulata* foi a mais efetiva com valores de CI₅₀ igual a 5 µg/mL sobre promastigotas e de 20 µg/mL sobre amastigotas. Além disso, foi evidenciado que o óleo desta espécie apresentou baixa toxicidade sobre macrófagos murinos da linhagem J774G8 (SANTOS *et al.*, 2008).

Os efeitos de diferentes óleos sobre promastigotas de *L. chagasi* foram os seguintes: óleo essencial de *Lippia sidoides* exibiu CI₅₀ de 19,76 µg/mL (CI = 95%, 11.00 – 38.98), o óleo resina de *C. reticulata* obteve CI₅₀ de 7,88 µg/mL (CI = 95%, 1.52 – 40.86), o óleo essencial de *Coriandrum sativum* foi o menos efetivo com CI₅₀ de 181,00 µg/mL (CI = 95%, 57.53 – 269.60) (RONDON *et al.*, 2012).

Outra pesquisa analisando o efeito de compostos isolados de plantas de duas espécies da família Annonaceae evidenciou que os alcaloides e as acetogeninas obtiveram valores de CI50 sobre amastigotas de 25,4 µg/mL (CI = 95%, 6.1 – 105.9) para o alcaloide composto I, CI50 de 25,3 µg/mL (CI = 95%, 22.7-28.1) para acetogenina composto II, CI50 de 28,7 µg/mL (CI = 95%, 6.2-67.4) e para acetogeninas do composto III, e CI50 de 13,5 µg/mL (CI = 95%, 2.1-53.6) (VILA-NOVA *et al.*, 2011). De acordo com Meneguetti *et al.* (2015) os valores de CI50 acima de 10 µg/mL e abaixo de 100 µg/mL apresentam inibição moderada e valores que ultrapassam 100 µg/mL apresentam fraca inibição.

2.6 AÇÃO *IN VIVO* DE PLANTAS MEDICINAIS

Os estudos *in vitro* apenas indicam o potencial leishmanicida de um determinado composto. Logo faz-se necessário a execução de estudos *in vivo* para comprovar realmente a ação leishmanicida. No entanto, estudos sobre produtos naturais no tratamento da LV em diferentes espécies de roedores ainda são restritos.

Alguns estudos utilizando os modelos *Mesocricetus auratus* (hamster) ou *Mus musculus* Balb/C (camundongos) demonstraram que compostos isolados a partir de plantas foram capazes de reduzir a carga parasitária, em amostras de baço e/ou fígado, comprovando que as plantas têm potencial contra *Leishmania* spp. Lakshmi *et al.* (2007) demonstraram uma redução de 38 a 69% da carga parasitária esplênica de *L. donovani* utilizando a planta *Dysoxylum binectariferum* e seu composto isolado rohitukine.

Dutta *et al.* (2008) relataram que a planta *Aloe vera* foi capaz de reduzir em mais de 90% a carga parasitária de *L. donovani* no baço, fígado e medula óssea em camundongos Balb/C. Outro grupo de pesquisa utilizou a planta *Azadirachta indica* e conseguiu reduzir em mais de 90% a carga parasitária esplênica e mais de 80% da carga parasitária do fígado de Balb/C infectados experimentalmente com *L. donovani* (DAYAKAR *et al.*, 2015). O efeito de *Maesa balansae* sobre *L. infantum* foi uma redução de mais de 90% da carga parasitária hepática em camundongos Balb/C, e o composto maesabalide III foi isolado (GERMONPREZ *et al.*, 2005). Utilizando óleo de

Copaifera. martii foi possível reduzir de 4,4 mm para 1,1 mm de diâmetro uma lesão da almofada da pata de Balc/C experimentalmente infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (SANTOS *et al.*, 2008). Estes resultados demonstraram que as plantas apresentam potencial contra *Leishmania* spp.

2.7 COPAIFERA RETICULATA

Esta planta é conhecida popularmente como copaíba, atinge cerca de 36 m de altura e 3 m de diâmetro, e está amplamente distribuído no Brasil (ROCHA, 2001) (Figura 5).

Figura 3 - Copaibeira produtora do óleo resina de copaíba



Fonte: sitiodamata.com.br

O produto desta planta é um óleo resina que pode ser obtido diretamente de seu tronco, e que é comercializado sob o nome de óleo de copaíba, principalmente na

região Amazônica. Diversos estudos comprovaram seus efeitos como antiedêmico, anti-inflamatório, antibacteriano, insetífugo, antifúngica e cicatrizante (ARROYO-ACEVEDO *et al.*, 2011; COMELLI-JR *et al.*, 2010; MUNIZ *et al.*, 2009; PIERI *et al.*, 2012).

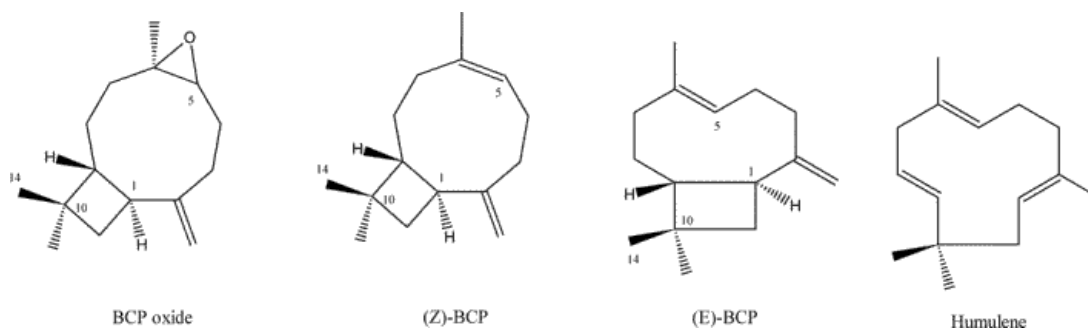
Além dessas propriedades medicinais comprovadas cientificamente, dentre as espécies estudadas do gênero *Copaifera*, óleo resina de *C. reticulata* vem destacando-se por ser utilizado *in natura* na medicina popular e por apresentar avanços na avaliação do potencial leishmanicida (RONDON *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2008).

Os sesquiterpenos já identificados no óleo de copaíba são: β -cariofileno, α -copaeno, zingibereno, bergamoteno e β -bisaboleno (VEIGA-JÚNIOR, 2002). Sendo que o sesquiterpeno majoritário, foi β -cariofileno (PINTO *et al.*, 2000; TAPPIN *et al.*, 2004).

2.8 COMPOSTO QUÍMICO β -CARIOFILENO

β -cariofileno é uma substância volátil com forte odor de madeira incluído na classe sesquiterpeno bicíclico encontrada em grande quantidade em plantas alimentares, óleos essenciais e óleo resina (BERNARDES *et al.*, 2010; HUDAIB *et al.*, 2002). *In natura* encontrado com alguns isômeros (Z) β -cariofileno (iso-cariofileno) e α -húmuleno (α -cariofileno) e oxidação - óxido de β -cariofiloteno (FIDYT *et al.*, 2016) (Figura 6).

Figura 4 - Formas moleculares do cariofileno encontrado na natureza



Fonte: FIDYT *et al.* (2016).

Este composto possui alguns efeitos comprovados cientificamente como: anti-inflamatório (GERTSCH *et al.*, 2008), anestésico local, anti-

carcinogênico (LEGAULT ; PICHETTE, 2007), antifibrótico (CALLEJA *et al.*, 2012) ansiolítico (GALDINO *et al.*, 2012), ardioprotetor, hepatoprotetor, gastroprotetor, nefroprotetor, antioxidante, antimicrobiano, imunomodulatório, neuroprotetor (CHICCA *et al.*, 2014; FIDYT *et al.*, 2016; SHARMA *et al.*, 2016) e leishmanicida (SOARES *et al.*, 2013). β -cariofileno possui uma grande afinidade com os receptores CB2R podendo ser utilizado no tratamento de doenças cerebrais como: isquemia cerebral (PERTWEE, 2009), lesões cerebrais (ZHANG *et al.*, 2008), neuro-inflamação (ZHANG *et al.*, 2009), alterações no cortical, hipocampal e neurônios cerebelar e células da glia (LANCIEGO *et al.*, 2011).

2.9 ENZIMA TRIPAREDOXINA-I (TXN-I)

Os protozoários do grupo tripanossomatídeo possuem diferentes estratégias de defesa contra xenobióticos, espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (NOS) entre outros. *L. infantum*, é um protozoário parasito intracelular obrigatório e após ser fagocitado desencadeia diferente sistema de defesa intracelular para evitar apoptose celular (STEINERT *et al.*, 1999). Um mecanismo eficiente na defesa do parasita é o metabolismo redox capaz de fortalecer a proliferação intracelular. Essa arma expressa pelo parasito é eficiente pela participação de três enzimas, tripanotionina redutase (TryR), triparedoxina (TXN) e proteínas da triparedoxina peroxidase (TXNPx) presentes na via enzimática redox tripanotiona [T(SH)₂] (SANCHITA *et al.*, 2017). As triparedoxinas (TXNs) são oxidorreduases pertencentes à família tiorredoxina compartilhando 13% de identidade apresentando peso molecular de 16 kDa exibindo a sequência WCPPC no centro catalítico (BAKER *et al.*, 2001). Além da atividade antioxidante as TXNs estão envolvidas na síntese de desoxirribonucleótidos (FIORILLO *et al.*, 2012), na replicação do cinetoplasto (ONN *et al.*, 2004) na transferência de equivalentes reduzidos para metionina sulfóxido redutase (ARIAS *et al.*, 2011), na defesa contra ação de xenobióticos e interação com outras enzimas para ampliar a eficiência durante o estresse oxidativo (GONZALEZ-CHAVEZ *et al.*, 2015). As TXNs tem duas formas homólogas, TXN-I *in citosol* de *L. infantum* (CASTRO *et al.*, 2010), *Trypanosoma*

brucei (TETAUD *et al.*, 2001), *Trypanosoma cruzi* (WILKINSON *et al.*, 2002) e *Crithidia fasciculata* (STEINERT *et al.*, 1999) e TXN-II presente na mitocôndria de alguns parasitos como *L. infantum* (CASTRO *et al.*, 2010). A forma TXN-I é considerada essencial para o equilíbrio oxidativo (WILKINSON *et al.*, 2003), enquanto que a forma TXN-II totalmente ativa não é importante para a proliferação do parasita ou na infectividade bem sucedida (CASTRO *et al.*, 2010). As TXNs são alvos atraentes para o desenho racional de fármacos por serem extremamente importantes para a sobrevivência do parasito e por estarem ausentes nos processos metabólicos do hospedeiro (DIAS *et al.*, 2018).

2.10 BIOINFORMÁTICA

Devido ao recente avanço nas tecnologias de processamento de dados biológicos houve uma expansão sem precedentes de dados digitais. Esse universo de dados só é compreendido devido a utilização de máquinas poderosas e linguagem de alto nível no processamento supervisionado. Dessa forma, surgiu a necessidade de especializar um campo responsável por estudar as informações biológicas usando métodos da ciência da computação, estatística, matemática, física, química e engenharia denominando Bioinformática. Essa ciência tem suas origens uma década antes do sequenciamento do DNA (HAGEN, 2000) embasada nos estudos de alguns cientistas, como a Dra. Margaret Belle Dayhoff por seus estudos na sistematização do conhecimento da proteína tridimensional (3D) (HUNT, 1984).

Alguns autores relacionam a biologia computacional com organização de dados biológicos para que os estudiosos possam acessar as informações e criar novas entradas; desenvolver ferramentas e recursos que auxiliem na análise de grande volume de dados; utilização desses recursos para analisar os dados e interpretá-los de maneira significativa (LUSCOMBE *et al.*, 2001). Foram criadas áreas emergentes em bioinformática como a mineração de texto via web, biologia de sistemas e a web semântica, análise de imagem (SINHA *et al.*, 2002), computação em grade (FOSTER, 2002; GANNON *et al.*, 2005), evolução dirigida, design racional de proteínas (LOOGER

et al., 2003), bioinformática relacionada a microRNA (BROWN; SANSEAU, 2005) e modelagem em epigenômica (FAZZARI; GREALLY, 2004).

2.11 TOXICIDADE E CÁLCULO DA DL50 *IN SILICO*

A análise da toxicidade de novos compostos é uma parte essencial do processo de caracterização do novo medicamento. Substâncias com potencial carcinogênico são de grande preocupação na seleção de novos candidatos a fármacos devido aos seus graves efeitos sobre a saúde humana como a capacidade de induzir mutação no genoma ou de romper o metabolismo celular incapacitando sua aprovação e comercialização (ONAKPOYA *et al.*, 2016). Dessa forma, os órgãos farmacêuticos são responsáveis pela realização de vários estudos de carcinogenicidade em modelos animais, como em roedores por um período de 2 anos e em camundongos Tg-rash2 por 26 semanas, para a aprovação dos novos compostos (JACOBS; BROWN, 2015). Assim, estes modelos experimentais em animais são trabalhosos, as vezes demorados e em último caso podendo ser considerado inviáveis e antiéticos pela utilização de um grande volume de animais para grandes conjuntos de produtos químicos necessitando de abordagens alternativas como técnicas computacionais (BENIGNI, 2014; RAIES; BAJIC, 2016) como: o servidor web CarcinoPred-EL desenvolvido para predição de toxicidade (ZHANG *et al.*, 2017).

O Regulamento Europeu n.º 1272/2008 relativo à classificação, rotulagem e embalagem (CRE) requer uma avaliação da DL50 da substância definindo o perfil da toxicidade aguda administrada por via oral, dérmica ou inalação (EUROPEAN UNION, 2008). A toxicidade aguda pode ser expressa em termos de "dose letal mínima" (DL50) (TREVAN, 1927). Contudo, devido a questões éticas na redução da quantidade de animais e bem-estar animal, métodos alternativos de predição de toxicidade com objetivo de evitar a utilização de animais, estão sendo empregados em alguns estudos (EUROPEAN UNION, 2008). Entre os métodos alternativos, as análises computacionais com os modelos de relação quantitativa estrutura/atividade (QSAR), estão sendo difundidos na academia científica na estimativa da DL50 (DEVILLERS, 2004; GARCÍA-DOMENECH, 2007). Este modelo é baseado na relação matemática entre os dados

quantitativos dos descritores moleculares ou assinaturas moleculares de um dado composto ou um conjunto de dados moleculares e suas atividades toxicológicas. Para a predição da DL50 oral, foram elaborados 5 programas usando diferentes métricas a partir de grandes conjuntos de treinamentos e funções matemáticas incluindo os comerciais e os disponíveis gratuitamente: TOPKAT de Accelrys, ToxSuite de ACD/Labs; TerraQSAR de TerraBase Inc.; ADMET Predictor de Simulation Plus e T.E.S.T. da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US EPA).

2.12 FARMACoinformática (ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLIZAÇÃO E EXCREÇÃO - ADME).

O desenho de fármacos envolve um fluxo de técnicas especializadas com propriedades farmacocinéticas descrevendo a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) consideradas fundamentais para determinar a dose eficaz (WANG *et al.*, 2015). Um dos grandes problemas na produção farmacêutica é um alto investimento e o equilíbrio da relação risco/recompensa (PAUL *et al.*, 2010). Para suavizar os impactos na cadeia de produção, as abordagens multidisciplinares são necessárias para o processo de desenvolvimento de medicamentos, incluindo a biologia computacional estrutural, química computacional e tecnologia da informação, que coletivamente formam a base do design racional de medicamentos otimizando a prospecção de novos compostos farmacêuticos com base no conhecimento de um alvo biológico nativo (LILJEFORS *et al.*, 2002). Dessa forma, uma explosão de técnicas computacionais tem sido aplicada a várias etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de drogas (DURRANT; MCCAMMON, 2011; JORGENSEN, 2004; XIANG *et al.*, 2012) reduzindo os custos de até 50% na cadeia de produção (TAN *et al.*, 2010). Modelos de predição *in silico* de ADME estão disponíveis há certo tempo com qualidade e usabilidade variadas podendo mensurar a interação entre drogas e o corpo humano (TAO *et al.*, 2015).

A administração oral de fármacos é uma via custo/efetiva e desejada por ser pouco invasiva e de alta aceitação por parte dos pacientes. A AIH é um dos principais procedimentos de absorção oral de medicamentos, é considerada uma etapa chave nos

estágios iniciais de descoberta de fármacos (ARTURSSON; KARLSSON, 1991). Os ensaios computacionais, tem como partida grande bancos de dados biológicos com resultados da AIH obtido de forma experimental, que são submetidos a técnicas de classificação para predição de AIH pela regra de cinco, QSAR, modelos matemáticos e aprendizagem de máquinas para construir um *Support Vector Machine* (SVM) (SHEN *et al.*, 2010).

Os fármacos podem interagir com proteínas plasmáticas ocasionando uma redução no pico plasmático e formando complexos indesejáveis para o organismo (TRAINOR, 2007). Dessa forma, é crucial estimar a taxa de ligação dos compostos candidatos a fármacos com objetivo de filtrar os fortes candidatos. Uma das técnicas experimentais é a utilização de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para triagem de albumina de soro humano (ASH) com afinidade de interação (COLMENAREJO *et al.*, 2001). Contudo, essa técnica apresenta algumas desvantagens como: a presença de múltiplos sítios de ligação na ASH e a limitação na caracterização da interação dos fármacos com a ASH pelo HPLC. Assim, essa técnica pode apresentar uma melhor performance quando combinada com procedimentos computacionais. Alguns servidores realizam estimativas de ligação a proteínas plasmáticas utilizando modelos de classificação bayesiano para um conjunto de dados disponíveis publicamente com interações conhecidas para alguns sítios de ligação na ASH (HALL *et al.*, 2013). Outros sistemas de classificação são baseados na regressão linear múltipla, considerando os “resultados de docking” (LI *et al.*, 2011a). Alguns estudos utilizam modelos QSAR (PPI-QSAR) de interação proteína plasmática com docking molecular e simulações de dinâmica molecular para investigar a importância da flexibilidade protéica na predição da ligação (SHERMAN *et al.*, 2005).

A barreira hematoencefálica é formada por células endoteliais microvasculares do cérebro e com permeabilidade altamente seletiva desempenhando um papel crucial na proteção. Alguns compostos apresentam propriedades de penetração na PBH por difusão passiva ou através de uma variedade de sistemas de transporte catalisados levando compostos para o cérebro (CLARK, 2003). Algumas técnicas *in vivo* invasivas e não invasivas permitem a avaliação da travessia da PBH, com a estimativa da permeabilidade expressa como logPS (logaritmo do produto da

área de superfície permeável) e logBB (logaritmo da relação de partição cérebro/sangue em um estado estacionário), respectivamente (BICKER *et al.*, 2014). No entanto, até o momento não há uma unidade experimental *in vitro* para estimar um índice de penetração PBH, os modelos utilizados nesta abordagem são realizados em experimentos *in vivo*, tornando o seu fluxo caro e aparentando ser de baixo rendimento estabelecendo um desafio na unidade ideal para o teste (BICKER *et al.*, 2014). A maioria das abordagens *in silico* baseia-se na suposição de que os compostos são transportados por difusão passiva, avaliando a probabilidade do composto em interagir com a glicoproteína P (P-gp) (GARG; VERMA, 2006) modelos baseados em logP, pKa e fração não ligada ao plasma a utilização da dinâmica molecular (CARPENTER *et al.*, 2014).

As transformações que os fármacos sofrem no interior do organismo são classificadas em duas etapas: primeira envolve oxidação, redução e hidrólise, é a fase em que xenobióticos, como drogas e toxinas do corpo participam de transformações químicas gerando um composto mais hidrofílico podendo ser eliminado efetivamente pelos rins com atuação de enzimas chaves como a citocromo P450 com grande ocorrência no fígado. A segunda etapa envolve a conjugação, metilação, sulfatação, encaixe de glutathione e de glicina com a atuação de enzimas transferase (difosfato glucosfato de uridina - UGT, N-acetil transferase - NAT, glutathione S-transferase - GST e sulfotransferase - ST) (ESSAYS, 2003). A predição virtual da biotransformação baseia-se em reatividade, *folds* baseados em modelos de aprendizagem estatística em loco mais provável de metabolização calculando a energia de interação do complexo (fármaco/enzima), com a uniformidade e aplicação de sistema de classificação como *Support Vector Machine* (SVM) (ZHENG *et al.*, 2009).

2.13 MÉTODOS COMPUTACIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

A predição do arranjo tridimensional de uma proteína a partir da sequência primária é um desafio antigo em biologia computacional (MOULT, 1999). Atualmente, encontram-se programas computacionais para elucidação da estrutura protéica

baseado em linguagem de programação como Python, Perl, C++, Java, algoritmos de aprendizagem supervisionada ou não e estatística (XU *et al.*, 2007). De modo geral, a arquitetura dos programas foi orientada para reconhecer sequências e modelos 3D e a identificação de unidades estruturais (α -hélices) e *folds* na estrutura e os domínios de proteínas nas estruturas terciárias diferenciando o dobramento das cadeias por diferenciação de padrões apresentados nos resíduos intracadeia e entre os resíduos e o sistema (PIERRI *et al.*, 2010).

Os métodos de maior usabilidade na determinação das estruturas 3D são: modelagem por homologia por PROSPECT (XU; XU, 2000), RAPTOR (XU *et al.*, 2003), pGenTHREADER (LOBLEY *et al.*, 2009), pro-sp3-TASSER (ZHOU and SKOLNICK, 2009), MODELER (WEBB ; SALI, 2014), I-TASSER (ROY *et al.*, 2010), iMembrane (KELM *et al.*, 2009), reconhecimento de dobras (*protein threading*) por ROSETTA (SIMONS *et al.*, 1999), FRAGFOLD (JONES, 2001), PROTINFO (HUNG ; SAMUDRALA, 2003), FILM (PELLEGRINI-CALACE *et al.*, 2003) e métodos *ab initio* baseado na química quântica. Cada técnica possui suas vantagens e desvantagens com variação na especificidade e tempo computacional na previsão de estrutura (NUGENT AND JONES, 2012). Outros métodos são específicos para uma estrutura molecular como FILM (PELLEGRINI-CALACE *et al.*, 2003) e RosettaMembrane (BARTH *et al.*, 2009), que foram desenhados para proteínas de membrana e transmembrana (TM) e são capazes de elucidar a estruturas de TM em tamanhos até 300 resíduos e técnicas para proteínas de membrana AlignMe (STAMM *et al.*, 2014), MP-T (HILL; DEANE, 2013), PRALINE™ (PIROVANO *et al.*, 2008), TM-Coffee (CHANG *et al.*, 2012).

2.14 DOCKING MOLECULAR

A corrida tecnológica na descoberta de medicamentos levou a criação de estratégias e adaptação de métodos computacionais no estudo de interação droga/proteína usando ferramentas que mimetizam o comportamento de um composto sobre o alvo (JORGENSEN, 2004; BAJORATH, 2002; LANGER ; HOFFMANN, 2001; KITCHEN *et al.*, 2004). A arte de avaliar o comportamento de um composto molecular

no bolso catalítico de uma macromolécula e a complementariedade é conhecido como *docking* molecular, essa técnica é utilizada na triagem virtual (*screening*), no rastreamento de compostos candidatos a fármacos baseado no ligante (*screening* baseados em ligantes) ou no rastreamento baseado na estrutura 3D de alvos biológicos (*screening* baseados em estrutura), apresentando vantagens como baixo custo e rastreamento eficaz (MOITESSIER *et al.*, 2008; BAILEY ; BROWN, 2001). O acoplamento molecular tornou-se uma ferramenta poderosa no âmbito farmacêutico. Diversos estudos foram publicados incluindo essa técnica (HALPERIN *et al.*, 2002; COUPEZ ; LEWIS, 2006; KONTOTIANNI *et al.*, 2008), com desempenho efetivo (CROSS *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010). Assim, para estudar a interação entre um composto e uma proteína alvo, temos duas etapas: previsão da melhor pose ou conformação do ligante no bolso catalítico da estrutura macromolecular e avaliação da afinidade de ligação definindo os tipos de interação as energias envolvidas na estabilização do complexo bem como os resíduos envolvidos na região farmacóforo (FERREIRA *et al.*, 2015). O conhecimento prévio do sítio ativo da proteína favorece a eficiência do encaixe induzido nos ensaios *in silico*, que pode ser obtido através de experimentos ou na comparação pelo alinhamento em loco com a família da proteína alvo que compartilha uma dada função proteínas co-cristalizadas com outros compostos (ligante). No entanto, há alguns servidores que auxiliam o reconhecimento desses *hits* detectando a cavidade *leads* como: *GRID* (GOODFORD, 1985; KASTENHOLZ *et al.*, 2000), *POCKET* (LEVITT ; BANASZAK, 1992), *SurfNet* (LASKOWSKI, 1995; GLASER *et al.*, 2006), *PASS* (BRADY ; STOUTEN, 2000) *MMC* (MEZEI, 2003). Assim, algumas abordagens foram elaboradas com o objetivo de aumentar a eficácia do *docking* molecular, estratégias como encaixe induzido de corpo rígido e ajuste induzido de corpo flexível para descrever os eventos com maior complexidade limitando as conformidades.

As interações criadas entre a proteína e o ligante são definidos por limitações nos graus de liberdade translacional e rotacional escrito em cada algoritmo de amostragem específico para cada programa de *docking* molecular. As energias exercidas no sistema são calculadas por funções de pontuação, com intuito de classificar poses corretas de poses incorretas. As funções de pontuação são baseadas no campo de força empírica (KITCHEN *et al.*, 2004). Programas como Autodock apresentam função de pontuação baseada em campo de força estendida para avaliar a energia de ligação, cálculo da soma das interações não relacionadas (eletrostática e van der Waals) consideram as ligações de hidrogênio, solvatações e contribuições de entropia exercida no complexo (KOLLMAN 1993).

3 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral humana e canina são doenças crônicas que podem levar a óbito hospedeiros não tratados. Os tratamentos disponíveis atualmente com drogas sintéticas são muito agressivos ao organismo, dificultando o controle da doença tanto no homem como no cão. Sendo assim, há escassez de substâncias altamente eficazes contra *L. infantum* e de baixa toxicidade. Experimentos preliminares *in vitro* demonstraram efeito leishmanicida do óleo resina de *C. reticulata*. β -cariofileno é o composto majoritário do óleo resina de *C. reticulata* e em geral o composto majoritário de um produto natural é responsável por sua atividade biológica. Porém até o momento os resultados sobre a ação leishmanicida de β -cariofileno são contraditórios. Logo faz-se necessário elucidar a eficácia comparada destes produtos. O teste de toxicidade aguda deve anteceder a utilização de um novo produto para que seja utilizado na espécie alvo. Porém estes estudos demandam o sacrifício de animais de laboratório, fato que está sendo cada dia mais rejeitado por problemas éticos. Algumas técnicas computacionais foram desenvolvidas para a predição *in silico* da DL50. Assim sendo a comparação de resultados destas duas formas de cálculo da toxicidade aguda é indispensável pois será possível reduzir o uso de animais experimentais. Outras lacunas a serem preenchidas na pesquisa de produtos naturais com ação leishmanicida é a farmacocinética *in silico* de β -cariofileno e um possível mecanismo de ação, possibilitando assim a validação de um novo fármaco para a terapia das leishmanioses.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O óleo resina de *C. reticulata* possui efeito leishmanicida *in vitro* e não possui toxicidade.

β -cariofileno possui efeito *in vitro* sobre *L. infantum* apresentando DL50 segura com ausência de toxicidade para uso em animais.

β -cariofileno enquadra-se nas propriedades da farmacoinformática atingindo o sítio ativo da triparedoxina (*LiTXN-I*) de *L. infantum*.

5 OBJETIVOS

5.1 GERAL

Investigar a ação leishmanicida e toxicidade do óleo resina de *C. reticulata* e seu composto majoritário, β -cariofileno. Assim como descobrir o provável modo de ação do β -cariofileno.

5.2 ESPECÍFICOS

- a) Caracterização química do óleo resina de *C. Reticulata*;
- b) Avaliação *in vitro* do efeito anti-Leishmania do óleo resina de *C. reticulata* e do composto químico β -cariofileno;
- c) Estipular uma dose segura em camundongos Swiss do óleo resina de *C. reticulata* e do composto β -cariofileno;
- d) Determinação da toxicidade do β -cariofileno *in silico*;
- e) Definir ação do composto β -cariofileno sobre *L. Infantum*;
- f) Caracterizar o alvo molecular de triparedoxina-I pontuando outras enzimas essenciais para o protozoário presentes na cascata enzimática;
- g) Indicar um modelo tridimensional da triparedoxina-I próximo da conformação nativa;
- h) Apresentar hipótese sobre o mecanismo de ação do β -cariofileno sobre a triparedoxina-I.

6 ARTIGO: *Copaifera reticulata* RESIN OIL AND ITS MAJOR COMPOUND, B-CARYOPHYLLENE: *IN VITRO* EFFECT ON *Leishmania infantum*, TOXICITY AND *IN SILICO* STUDIES

Óleo resina de *Copaifera reticulata* e seu composto majoritário β -cariofileno: efeito *in vitro* sobre *Leishmania Infantum*, toxicidade e estudos *in silico*

6.1 ARTIGO SUBMETIDO: Journal of Ethnopharmacology

***Copaifera reticulata* resin oil and its major compound, β -caryophyllene: *in vitro* effect on *Leishmania infantum*, toxicity and *in silico* studies**

Valdir F. de Paula-Júnior¹, Fernanda C. M. Rondon¹, Maria Vivina B. Monteiro², Osmar A. Lameira³, Lorena M. B. Oliveira¹, Iara T. M. Freitas¹, Wesley L. C. Ribeiro⁴, Ito L. Barroso Neto⁵, Geancarlo Zanatta⁵, Valder N. Freire⁵, Selene M. Morais¹, Claudia M. L. Bevilaqua^{1*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/FAVET/Universidade Estadual do Ceará;

²Universidade Federal do Pará;

³Embrapa Amazônia Oriental;

⁴Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos/Faculdade de Medicina/Universidade Federal do Ceará;

⁵Programa de Pós-graduação em Física/Universidade Federal do Ceará

*Corresponding author:

Claudia M L Bevilaqua

Universidade Estadual do Ceará/FAVET/Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias

Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Fortaleza, Ceará, Brasil

CEP 60.714-903

Phone: 55 85 31019853; Fax: 55 85 31019840

Email: claudiamlb@yahoo.com.br or claudia.bevilaqua@pq.cnpq.br

Abstract

Ethnopharmacological relevance

Brazil is rich in biodiversity and medicinal uses of plants by the local population. Copaiba resin oil is widely used in folk medicine, indigenous medicine and in the pharmaceutical and cosmetic industries. Among the species cited in ethnofarmacology studies with proven therapeutic properties in *in vitro* and *in vitro* trials, *Copaifera reticulata* has pharmacological potential in the fight against herpes virus, inflammation, cutaneous *Leishmaniasis* among other activities, requiring more attention to evaluate the potential in the treatment of Visceral Leishmaniasis (LV).

Aim of the study

The aim of this study was to determine the effect of *C. reticulata* resin oil and β -caryophyllene on 50% parasites (IC50) and to evaluate the acute toxicity in mice and computationally evaluate the action mechanism of β -caryophyllene to combat the parasite.

Materials and methods

The *in vivo* toxicity and the antiproliferative effect on promastigotes and axenic amastigotes were determined of *C. reticulata* resin oil and its major compound. Additionally, *in silico* analysis using the protein trypanothione from *L. infantum* (LiTXN-I) was performed to better characterize β -caryophyllene mechanism of action, besides β -caryophyllene toxicity, pharmacoinformatics, characterization of LiTXN-I as predictor of protein structure (PSP), and validation of the 3D model and molecular docking.

Results

The results showed that *C. reticulata* and β -caryophyllene were efficient in inhibiting the proliferation of *L. infantum*, with no signs of *in vivo* and *in silico* toxicity. The *in vivo* β -caryophyllene LD50 was 5 g which was similar to that obtained *in silico*. This compound conforms to the Lipinski rule and has been shown to be a good candidate for use to treat LV. The *in silico* results of absorption, metabolization, distribution and excretion (ADME) were satisfactory. The characterization of the enzyme indicated it is involved in two LiTXN-I reactions (KEGG 1.8.1.8 and KEGG - R03914) and in the interaction with 10

essential proteins of the enzymatic reactions of the parasite. In the molecular modeling of *LiTXN-I*, the model used was *Leishmania major* (*LmTXN-I*) (PDB-3s9f) due to greater coverage in the alignment. During the molecular coupling of β -caryophyllene with *LiTXN-I*, free energy of $-6.44 \text{ kcal/mol}^{-1}$ and the inhibition constants K_i were observed at $19.17 \text{ }\mu\text{M}$. Thus, in the evaluation of the scoring functions created at the complex (drug-protein) observed favorable interactions of the hydrophobic and van der Waals type, with 5 corresponding residues.

Conclusion

The resin oil *C. reticulata* and β -caryophyllene achieved promising results *in vitro* and computational performance. β -caryophyllene showed to be a strong drug candidate to treat *L. infantum*.

Keywords: Promastigote, Axenic amastigote, Molecular modelling, Pharmacoinformatics

Introduction

Visceral Leishmaniasis (VL) is caused by an intracellular protozoan parasite, in Brazil the causative agent is *Leishmania infantum*. It is characterized as potentially fatal chronic disease whose lethality is high when associated with poor nutrition and coinfections, as well as when adequate treatment is not established (Sundar, 2015).

The Brazilian Ministry of Health recommends a therapeutic protocol with the use of N-methyl glucamine antimonyate (Glucantime®) and non-antimonials, such as amphotericin B and its liposomal form (Sharief et al., 2006). However, the efficacy of such therapies is limited because of the high toxicity and adverse side effects, as well as the appearance of resistant protozoan strains (Croft et al., 2006).

A promising alternative is the use of plants and their metabolic constituents, for which several scientific studies have shown effects on promastigotes and amastigotes of *Leishmania* spp (Vila-Nova et al., 2013; Ullah et al., 2016; Prates et al., 2017). Of the plants with antimicrobial activity the *Copaifera* genus stands out. This tree, popularly known as copaiba, is a plant widely distributable in Brazil. It reaches about 36 m in height and diameter of 3 m. The resin oil obtained from the trunk of these trees is

broadly marketed throughout Brazil due to its anti-inflammatory and healing properties (Basile et al., 1988; Veiga-Junior and Pinto, 2002). It is also used against larvae *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Silva et al., 2003; Fernandes and Freitas, 2007; Geris et al., 2008). In addition, the anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* activities have been described (Maciel et al., 2002; Rondon et al., 2012).

A study involving the screening of eight resin oils from *Copaifera* spp. showed that *C. reticulata* exhibited better activity against promastigotes, axenic amastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis* (Santos et al., 2008). The major chemical constituent found in resin oils of the *Copaifera* genus is β -caryophyllene, a compound included in the sesquiterpene group due to its physicochemical properties. In nature, it occurs in isomers, trans-caryophyllene, β -caryophyllene, α -humulene, β -caryophyllene oxide and gives off a wooden odor (Fidyt et al., 2016). β -caryophyllene has anti-inflammatory (Shimizu et al., 1990), antimicrobial and antioxidant activities (Sahin et al., 2004). Trans- β -caryophyllene has effect on *L. amazonensis* (Soares et al., 2013). However, the mechanism of action of β -caryophyllene is still unknown.

In trypanosomatids, one of the metabolic pathways of choice for action of synthetic and natural products is the antioxidant pathway (Fairlamb and Cerami, 1985). The redox enzyme pathway trypanothione $[T(SH)_2]$, which contains two glutathione molecules in conjunction with trypanothione reductase (TryR), tryparedoxin (TXN) and tryparedoxin peroxidase (TXNPx) proteins are involved in intracellular defense of the parasite against the stress caused by reactive oxygen species (ROS) (Singh et al., 2017) and drugs (Mukhopadhyay et al., 1996). Studies report that antimonial drugs directly interfere with thiol metabolism by inducing efflux of intracellular $T[SH]_2$. The lack of these enzymes in the host makes it possible to formulate target-based stratagems by the computational approach (Krauth-Siege and Coombs, 1999). Of the proteins involved in the redox balance of the parasite, TXN and TXNPx also act on DNA biosynthesis (Fiorillo et al., 2012). TXN has two homologous forms, TXN-I, which is found in cytosol and is considered essential for oxidative balance and TXN-II found in mitochondria (Wilkinson et al., 2003). TXN-I is a good target for action of new drugs against *Leishmania*. Although this detoxification pathway is not the only one used by the

parasite, it is essential for its survival, making its constituents more attractive as potential drug targets (Fiorillo et al., 2012).

The functional association of proteins is crucial in the flow of information and the flow of cellular energy. The cluster of functional protein association of an organism characterizes the proteins involved in a cellular function, allowing the tailoring of drugs to another participating protein target in the metabolic cascade of interest (Ghizoni et al., 2017).

The objective of this work was to verify the *in vitro* effect of *C. reticulata* resin oil and its major constituent, β -caryophyllene, on the survival of promastigotes and axenic amastigotes of *L. infantum*, as well as to evaluate the acute toxicity "up and down" in Swiss mice besides computational analysis. Additionally, we analyzed the interaction between the major compound β -caryophyllene and the enzyme trypanothione from *L. infantum* (LiTXN-I) using *in silico* tools.

2 Materials and Methods

2.1 Plant material collection

The main product of *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae, Caesalpinoideae) is a resin oil which is obtained directly from the trunk. The exudate was collected from dispersed trees with more than 30 years located in the National Forest of Tapajós, in the municipality of Belterra, State of Pará, Brazil. The orifice opened in the trunks, after the complete flow of the resin oil, was sealed with PVC pipe to facilitate subsequent collections. One specimen of the species was deposited in the IAN Herbarium of the Embrapa Eastern Amazon research unit (exsiccate 183939). The resin oil samples were stored in plastic containers in 2000 mL aliquots per tree and protected from light by aluminum foil and then transferred to glass vials.

2.2 Quantification of the constituents of the resin oil

The oil resin compounds were identified by ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) (Avance DRX-500 NMR Spectrometer, ©Bruker Corporation, USA).

The volatile components of the *C. reticulata* resin oil were identified and quantified by gas chromatography combined with mass spectrometry (GC/MS) with a Finnigan Mat INCOS XL system, equipped with a DB-5MS silica capillary column (30m x 0.25mm; film of 0.25µm). The operating conditions were: carrier gas helium (32cm/s); splitless injection (solution of the product to be characterized at 0.2% in hexane); temperature of the injector and detector of 250°C; temperature program: 60°C-240°C (3°C/ min); ionization energy of 70eV; and interface temperature of 180°C. The resin oil components were identified according to the retention index (IR), determined by using a calibration curve of a homologous series of n-alkanes injected under the same chromatographic conditions as the samples and in the fragmentation models of the mass spectra, both of which were compared to the system database and the literature (Adams, 2001; Neto et al., 2008). The quantification of the components was obtained using an HP5890-II chromatograph equipped with a flame ionization detector (FIDIC), coupled to an HP 3396-II integrator under the same operating conditions described above, except the carrier gas was hydrogen.

2.3 Chemicals

β-caryophyllene (C₁₅H₂₄) - SIGMA-ALDRICH-USA -W225207, M199 (Cultilab®), fetal bovine serum (SFB) (Cultilab®), HEPES (Sigma-Aldrich®), bovine heme (Inlab®), sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich®), gentamicin (Inlab®), RPMI (Sigma-Aldrich®), amphotericin B (Sigma-Aldrich®), meglumine antimononiate (Glucantime®) glutamine (Sigma-Aldrich®), MTT [3- (4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich®), DMSO (Sigma-Aldrich®).

2.4 Cultivation of *L. infantum*

The culture of the parasite was carried out according to the adapted protocol (Rondon et al., 2012). Briefly, promastigotes from the *L. infantum* CLIOC 0579 strain, were provided by the Oswaldo Cruz Foundation in Rio de Janeiro and were cultured in M199 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB), HEPES, bovine heme,

sodium bicarbonate and 40 mg/mL of gentamicin at pH 7.2-7.4. The culture was kept in a BOD oven at a temperature of 23.6°C and the peeling was done every 3 or 4 days.

Axenic amastigotes were obtained from culturing promastigotes in the logarithmic phase, maintained in RPMI medium supplemented with 10% SFB, HEPES, glutamine and gentamicin (40 mg/mL), with pH 5.8 to 5.9 in a CO₂ incubator at temperature of 34°C. After 48 hours, the transformation of promastigotes into axenic amastigotes was evident, with a rate varying from 90 to 95% of transformed parasites, enabling the continuity of the experiment, since the viability of this form is 7 days. The culture bottles were kept in the incubator.

2.5 *In vitro* tests

For *in vitro* assays, promastigotes and axenic amastigotes were counted in a Neubauer chamber and the final concentration was set to 1.25×10^6 parasites/well. The concentrations of oil and β -caryophyllene used in the experiments ranged from 0.098 to 100 μ g/mL and were obtained from serial dilutions, according to the method described by Rondon et al., 2012. Cultures were treated with oil resin/ β -caryophyllene for 24 h, after which MTT was added to each well and incubated for 4 h, at 37 °C. The viability of the parasite in the amastigote or promastigote phase was calculated using the following equation: $\text{viability \%} = (\text{treated cell mean} / \text{untreated cell mean}) \times 100$ to determine the 50% inhibitory concentration of parasites (IC 50). Amphotericin B and Glucantime® were employed as positive controls against promastigotes and axenic amastigotes, respectively. As negative control, M199 medium and RPMI were employed for promastigotes and axenic amastigotes, respectively. Samples were tested in triplicate and results were obtained with a Multiskan MS microplate reader (Uniscience) using a 570 nm filter.

2.6 Acute toxicity

This study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of State University of Ceará under the number 2683033/2017.

For the establishment of the toxicological profile, 20 female Swiss mice (*Mus musculus*) aged between 2 and 3 weeks were acclimatized for 7 days to the laboratory conditions (12h/12h, light/dark, 22°C, relative humidity 60%) and maintained with commercial feed (Purina®) and water *ad libitum*. Acute toxicity was performed according to OECD-425/2008 (OECD, 2008) “Up and Down”. The resin oil of *C. reticulata* and β -caryophyllene were administered orally in a single dose progression at minimal intervals of 48h. The dose correction factor was 3.2 fold and dose increase or reduction was performed according to survival or mortality of the animals, respectively. The doses were as follows: 170mg, 440mg, 1100mg, 2800mg, to a limit of 5000mg/kg. All decisions of the doses that were administered and the estimation of the LD50 was done using the AOT425StatPgm software (OECD, 2008).

2.7 *In silico* study

2.7.1 The *in silico* toxicity test

Toxicity is one of the major problems during drug tests using *in vivo* models. To avoid it, the β -caryophyllene DL50 was calculated computationally with the aid of the PROTOX server (Raies and Bajic, 2016) which evaluated the toxicological class according to the harmonized global system of classification and labeling of chemicals (GHS). The *in silico* toxicity test based on the PREADMET server (<<https://preadmet.bmdrc.kr/toxicity-prediction/>>) was performed for carcinogenicity studies in rodents and mutagenic testing (AltTox, 2017) using the standard parameters as established by the server.

2.7.2 Pharmacoinformatics (absorption, distribution, metabolism and excretion, ADME)

The pharmacokinetic analyses of the β -caryophyllene were performed by the PREADMT server by the calculation of ADME (Alqahtani, 2017), including: intestinal absorption (Egan et al., 2000), aqueous solubility (Cheng and Merz, 2003), plasma protein binding (Colmenarejo et al., 2001), penetration of the blood-brain barrier (BBB) (Kelder et al., 1999) and inhibition of cytochrome P450 (Susnow and Dixon, 2003). In the analysis *in silico*, the parameters established by the server were used.

Lipinski-type properties (octanol - water partition coefficient: $\text{LogP} \leq 5$, molecular weight ≤ 500 KDa, number of H binding donors ≤ 5 , number of H-binding acceptors ≤ 10 , molecular refractivity 40-130) (Lipinski et al., 2001) and the bioactivity of the major chemical compound β -caryophyllene were evaluated by the Molinspiration server (<<http://www.molinspiration.com/>>). These properties are intrinsically related to the absorption, bioavailability, hydrophobic interactions of the drug receptor, metabolism and toxicity (Podunavac-Kuzmanović and Cvetković, 2011)

2.7.3 Analysis of tryparedoxin-I protein from *Leishmania infantum* (LiTXN-I)

The characterization of the enzyme LiTXN-I (Uniprot: <http://www.uniprot.org> - Q6RYT3) involved in the redox balance was performed with the Kyoto server Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa and Goto, 2000) which punctuates the genes and their respective enzymes involved in the metabolic cascade. After characterization of the enzyme, analysis of protein interactions was performed by the STRING server of the Network of Functional Protein Associations (Szklarczyk et al., 2017).

2.7.4 Molecular modeling

At first, we performed global alignment of the primary structure of LiTXN-I against the Protein Data Bank (PDB), using the BLASTp tool (<<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>>) to get 3D models. However,

the refinement of the selected models was performed according to the best values of similarity, identity, alignment coverage, quality of the three-dimensional structure (crystallographic resolution and complete amino acid sequence) and enzyme complexed or not with a binder and the presence or not of a heteroatom. The structure of tryparedoxin-I from *Leishmania major* (LmTXN-I) (PDB - 3s9f, and UniProtKB - E9ADX4) was used as template in the molecular modeling.

The three-dimensional model was submitted to comparative modeling (Höltje et al., 2003) using the Modeller software version 9.10 (Eswar et al., 2005). Briefly, all scripts were written in the Python programming language (<<http://www.python.org>>) in the Pycharm IDE (<<https://www.jetbrains.com/pycharm/>>), the coordinates of the LmTXN-I were edited and placed in the "PIR" format accepted by Modeller and modeled with the "automodel" command, displaying as output 100 three-dimensional models. The loops with non-permitted conformations of the generated three-dimensional models were identified using the DOPE-Loop method in conjunction with the GNUPLOT graphical program (Janert, 2010) and the Rampage server (Lovell et al., 2003) to evaluate the geometric model. The problematic residues were characterized and optimized by the modelloop commands in Modeller with 10 loop reconciliations optimized for each problematic region, based on the atomic coordinates of these residues. The generated models were edited and submitted to the minimization of energy by YASARA (Krieger et al., 2009) associated with the YASARA force field.

2.7.5 Validation of three-dimensional models

The three-dimensional models of LmTXN-I were subjected to *in silico* validation. In this step, the SWISS-MODEL online server (Schwede and Kopp., 2003) was used to evaluate the empirical atomic strength with the ANOLEA software (Melo and Feytmans, 1998). The program evaluated the packing levels of the atoms by performing various energy calculations throughout the structure to characterize the "Non-Localized Environments" (NLE). The overall analysis of the LmTXN-I was aimed at identifying the unfavorable regions was performed by the QMEAN4 scoring program (Benkert et al., 2011).

The QMEAN6 program was used to calculate the accessibility of the solvent with the model analyzed. The QMEAN Z-score software estimated the absolute quality of *L*iTXN-I, creating a probability called "degree of nature" based on the three-dimensional quality of other three-dimensional structures already solved (Benkert et al., 2012). The DFIRE program was used to evaluate the non-bounded *L*iTXN-I atoms generated after packing.

The GROMOS molecular simulation package was used to evaluate the global *L*iTXN-I system, characterizing the energies in the favorable and unfavorable regions of a given residue (van Gunsteren and Billeter, 1996). The DSSP program was used to determine the amount and type of secondary structure of *L*iTXN-I, while the PROMOTIF program was used to characterize the structural conformation of the generated *L*iTXN-I, such as gamma and beta angles, clips and protrusions (Hutchinson and Thornton M, 1996). Finally, the PROCHECK program was used to create a "RAMACHANDRAN" graph with 14 evaluation parameters, analyzing the stereochemical quality of the model according to the following parameters: torsional angles of the main chain (Φ and Ψ), torsional angles of the side chains, bad contacts, energies of the hydrogen bonds, planarity of the peptide bonds and deviations in relation to the tetrahedral geometry of the alpha (α) carbons (Ramakrishnan and Ramachandran, 1965). In addition, the "RAMACHANDRAN" graph was also plotted to observe the combinations of the lateral torsion angles Chi1 and Chi2. The analysis of the main chain was done by plotting a RAMACHANDRAN graph of the geometric quality of the residues, taking into consideration the planarity of the peptide bond, unrelated negative interactions, tetrahedral distortion of the alpha (α) carbons, binding energy of main chain hydrogen and general G-factor. Finally, the generated model was evaluated by the iPBA server for the evaluation of root-mean-square deviation (RMSD) generated by the structural alignment of the model with the template (Gelly et al., 2011).

2.7.6 Molecular Docking

Molecular docking was performed using the AutoDock 4.2 package (Morris et al., 2009). Briefly, the optimization of *L*iTXN-I with addition of polar hydrogen and calculation

of Kollman's loads was performed using AutoDockTools 1.5.6 (Huey and Morris 2006). The *LtTXN-I* enzyme assumed a rigid shape during the procedure, whereas β -caryophyllene was in flexible form with ten degrees of freedom, facilitating torsion of angles for promising orientation and position of these compounds (Friesner *et al.*, 2004). The β -caryophyllene (ZIC-8234282) was retrieved from the ZINC Database (<http://zinc.docking.org/>) (Irwin *et al.*, 2012) and subjected to refinement as well as topological analysis and optimization of atomic geometry by the MarvinSketch-v17.29 program.

Lastly, the ligands were submitted to the PRODRG program to evaluate their atomic charge again, thus creating a topology file (Schuettelkopf and van Aalten, 2004). The molecular coupling was divided into two steps. In the first, *LmTXN-I* was prepared for two types of *in silico* assays, the first one using *LmTXN-I* in the presence of water molecules in the active site and the binder of interest and the second employing *LmTXN-I* in the presence of metal ions and the binder of interest. The second step involved three tests, using *LtTXN-I* obtained from molecular modeling and edited to add the water atoms in the active site (Thilagavathi and Mancera, 2010; Lemmon and Meiler, 2013) and cations of magnesium, which can contribute to enzymatic activity (Axelrod and Tomchick, 1958). Subsequently, three *in silico* assays were performed under different conditions: *LtTXN-I* in the presence of metal ions and the binder of interest; *LtTXN-I* in the presence of metal ions, water molecules in the active site and the binder of interest; and *LtTXN-I* with the binder of interest. During the molecular docking, grid boxes were created with the help of AutoDockTools 1.5.6 with the coordinates "x, y and z" with maximum size for the cavity, analyzed in AutoDock 4.2.

The free-binding energies (kcal/mol) used to calculate the inhibition constants (K_i) by the equation ($\Delta G = RT \ln K_i$), where R is the universal gas constant ($1.987 \text{ cal.K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) and T is the global system temperature in Kelvin (298.15 K) were evaluated in AutoDockTools 1.5.6. The RMSD was assessed by PyMOL 2.0 (Schrödinger, LLC, New York, USA) and the characterization of the amino acids involved in the interaction of the binder with the receptor was evaluated by Accelrys Discovery Studio Visualizer 4.5 (Humphrey *et al.*, 2013) and PyMOL 2.0.

2.8 STATISTICAL ANALYSIS

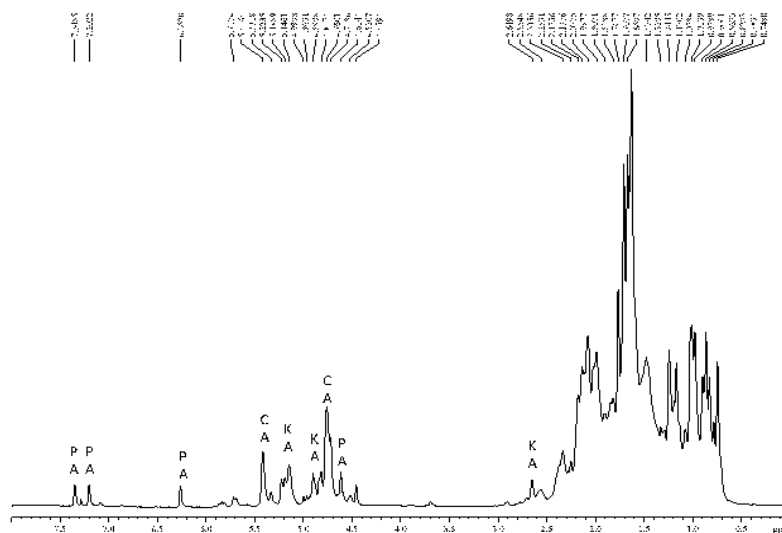
The IC₅₀ values obtained for the resin oil and β -caryophyllene on *L. infantum* were calculated using a nonlinear regression curve with logarithmic transformation and subsequent normalization as a percentage of the data, where 100% viability was expressed from optical density (OD) values obtained from negative controls containing only promastigotes or axenic amastigotes. The comparative analysis was performed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni test using the GraphPad Prism 6.0 statistical software, and the significance level of the analyzed data was 5% ($P \leq 0.05$).

3 RESULTS

3.1 QUANTIFICATION OF THE CONSTITUENTS OF THE *COPAIFERA RETICULATA* RESIN OIL

¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of the resin oil of *C. reticulata* in comparison with literature data were used to characterize the chemical constituents (Figure 1).

Figure 1 - ¹H NMR spectra (300 MHz, solvent, CDCl₃) of *C. reticulata*.



The analysis of ^1H nuclear magnetic resonance indicated mainly the presence of kaurenoic acid, polyalthic acid and β -caryophyllene and the analysis of ^{13}C nuclear magnetic resonance indicated mainly the presence of kaurenoic acid, polyalthic acid and β -caryophyllene (Figures 2 and 3).

Figure 2 - ^1H NMR spectra (300 MHz, solvent residual signals CDCl_3) of *C. reticulata*.

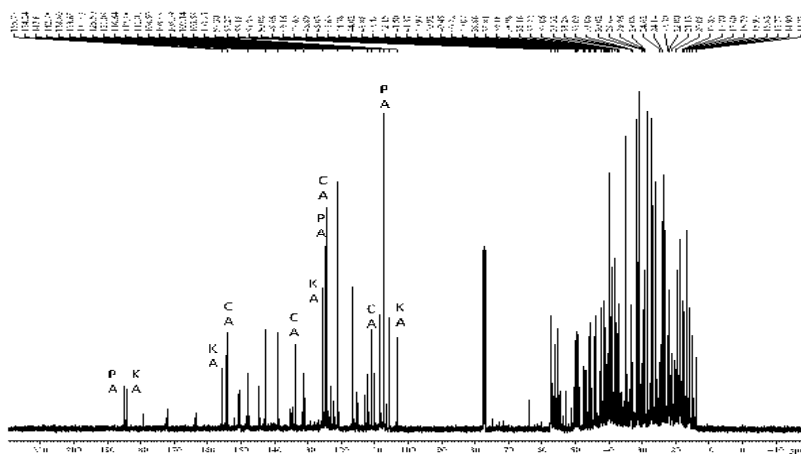
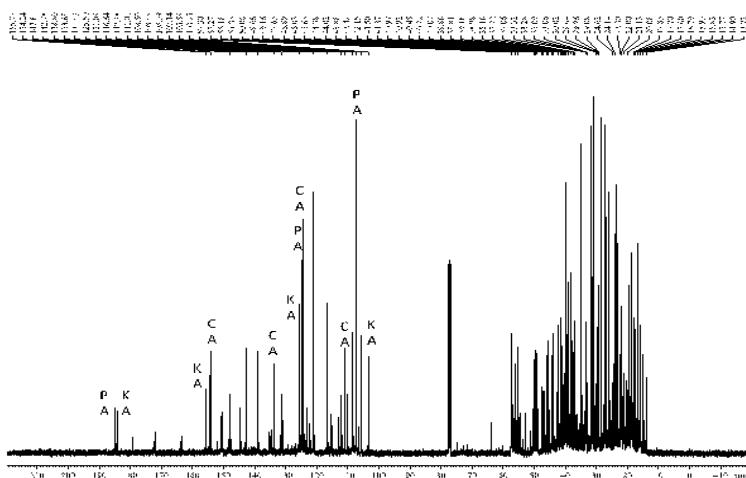
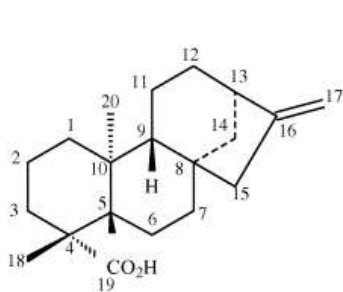


Figure 3 - ^{13}C NMR spectra (300 MHz, solvent residual signals CDCl_3) of *C. reticulata*.

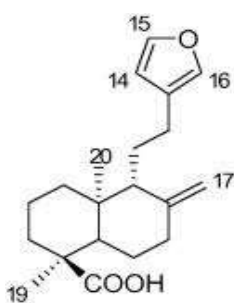


The ^1H NMR spectrum of kaurenoic acid (KA) showed a broad singlet at δH 2.64 (1H), indicative of allylic hydrogen, attached to C-13 carbon, characteristic of caurene-type skeletal diterpenes. This structural type was confirmed by the characteristic signals of the hydrogens: H-18 (δH 1.24; s; 3H), H-20 (δH 0.90; s; 3H), H-17 (δH 4.81; s, 1H) and H-17 (δH 4.76, s, 1H). In the ^{13}C NMR spectrum of Aca, the signal at δC 184.9 was related to the carboxyl group and the signals at δC 156.2 and 103.5 allowed confirming the presence of the exocyclic double bond of the caurene skeleton (Figure 4).

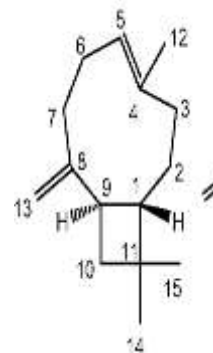
Figure 4 - Identification of the compounds Kaurenoic acid, Polyalthic acid and β - Caryophyllene by NMR analysis.



Kaurenoic acid



Polyalthic acid



β -Caryophyllene

The ^1H NMR spectrum of polyalthic acid (PA) recorded three singlets, characteristic of monosubstituted furan ring, observed at δH 7.35 (H-15); 7.21 (H-16) and 6.27 (H-14). Signals at δH 4.89 and 4.61 were related to methyldiene hydrogens of the exocyclic double bond (H-17). The ^{13}C NMR spectrum of Apo showed signal at δ 185.4, characteristic of carboxyl, in addition to the signals at δ 148.1; 125.50 and 107.4, evidencing the presence of β -monosubstituted furan ring.

The ^1H NMR spectrum of β -caryophyllene (CA) showed peaks at δH 5.41 related to the hydrides of the trisubstituted double (H-5) and at 4.81 and 4.99, attributed to the exocyclic double bond (H-13). The ^{13}C NMR spectrum showed signals at 154.24, 133.69, 125.50 and 112.28, attributed to the carbons of the double bonds.

The GC/MS results of *C. reticulata* resin showed that α -caryophyllene is the major compound, with 37%, followed by 13% β -bisabolene and 9% *Trans*- α -bergamotene (Table 1).

Table 1 - Percent volatile compounds of oil resin *Copaifera reticulata*, Ducke

Constituents (%)	
δ -elemene	0.2
Ciclosativene	0.9
α -copaene	0.5
β -elemene	3.3
α -gurjunene	0.4
β -caryophyllene	37.6
<i>Trans</i> - α -bergamotene	9.3
Aromadendrene	0.9
<i>Epi</i> - β -santalene	0.1
α -humulene + (E)- β -farnesene	5.3
β -chamigrene	0.9
γ -gurjunene	0.6
γ -curcumene	0.6
β -selinene	4.9
α -selinene	3.1
(Z)- α -bisabolene	1.8
α -bulnesene	2.1
β -bisabolene	13.9
β -curcumene	0.4
β -sesquiphellandrene	1.1
(E)- γ -bisabolene	1.3
Caryophyllene oxide	0.2
<i>Epi</i> - β -bisabolol	0.1
β -bisabolol	0.2

3.2 IN VITRO TESTS

The resin oil *C. reticulata* obtained IC₅₀ of 5.9 µg/mL on promastigotes and 2.19 µg/mL on axenic amastigotes. The major compound β-caryophyllene IC₅₀ were 2.2 µg/mL and 2.18 µg/mL on promastigotes and axenic amastigotes, respectively (Table 2).

Table 2 - Inhibitory concentration values (IC₅₀) of *Copaifera reticulata* and β-caryophyllene on promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania infantum*.

Products	Promastigotes IC ₅₀ (µg/mL)	Axenic amastigotes IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Copaifera reticulata</i>	5.9 ^b	2.19 ^a
β-caryophyllene	2.2 ^a	2.18 ^a
Amphotericin B	1.57 ^a	1.42 ^a
Glucantime	-	2.56 ^a

Different letters in column means statistical difference (P>0.05 *C. reticulata* P = 0,31)

3.3 ACUTE TOXICITY *IN VIVO*

Two acute toxicity profiles were obtained, for copaiba resin oil, a LD₅₀ > 5,000 mg/kg, and for β-caryophyllene LD₅₀ was 5,000 mg/kg with a minimum dose of 2,610 mg/kg, characterizing both as safe substances for *in vivo* administration.

3.4 IN SILICO TOXICITY AND LD₅₀ CALCULATION

β-caryophyllene presented a LD₅₀ of 5,000 mg/kg, with a minimum dose of 2,319 mg/kg (Supplementary Figure 1). The prediction accuracy was 70.9% and the molecule received a level 5 toxicological classification according to the GHS. The average molecular weight was 319.67 g/mol (Supplementary Figure 2).

In the rodent β -caryophyllene did not induce a carcinogenic effect, while in the mutagenicity test it was found to be negative for T100 to TA1535 *S. typhimurium* strains.

3.4.1 Studies of ADME (Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion)

In the evaluation of the physical properties of β -caryophyllene we observed that this compound has the following parameters: molar refractivity: $66.59 \pm 0.4 \text{ cm}^3$; molar volume: $228.4 \pm 5.0 \text{ cm}^3$; parachor: $533.3 \pm 6.0 \text{ cm}^3$; refractive index: 1.494 ± 0.03 ; superficial tension: $29.7 \pm 5.0 \text{ dyne/cm}$; density: $0.89 \pm 0.1 \text{ g / cm}^3$; dielectric constant: 2.61 ± 0.2 ; and polarizability: $26.40 \pm 0.5 \cdot 10^{-24} \text{ cm}^3$.

The Lipinski-type results were: molecular weight: 204.35 Da; number of hydrogen donors: 0; number of hydrogen bond acceptors: 0; number of rotating obligations: 0; and surface area topological polarization (TPSA). These data are related to the passive molecular transport through the membranes, with score of 0.00. In addition, the octanol-water partition coefficient logP and logD at pH 7.4 of β -caryophyllene, used to measure molecular hydrophobicity, was 4.896560.

Regarding the pharmacokinetic analysis, the β -caryophyllene was classified as adequate by Lipinski's rule and can be recommended as a drug, because it obtained a high human intestinal absorption value (100.000000%). Furthermore, the average membrane permeability *in vitro* of Caco2-adenocarcinoma epithelial adenocarcinoma cells was 23.6315 nm/sec, whereas the *in vitro* permeability in Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) was 50.5246 nm/sec, indicating high permeability. The drug presented strong binding to plasma protein (100.000000%), high *in vivo* penetration of the blood-brain barrier (score: 12.4386) and low *in vitro* skin permeability (transdermal score: -0.627223). Furthermore, in the computational format, β -caryophyllene induced the enzymes cytochrome P450 2C9 and cytochrome P450 2C19, and did not induce cytochrome P450 2D6, the substrate of cytochrome P450 2D6 and cytochrome P450 3A4. Inhibition of p-glycoprotein also occurred. This protein is involved in the expulsion of drugs into the luminal space, which decreases their bioavailability. The bioactivities of β -caryophyllene presented the following scores: G - GPCR inhibition (-0.34); KI kinase

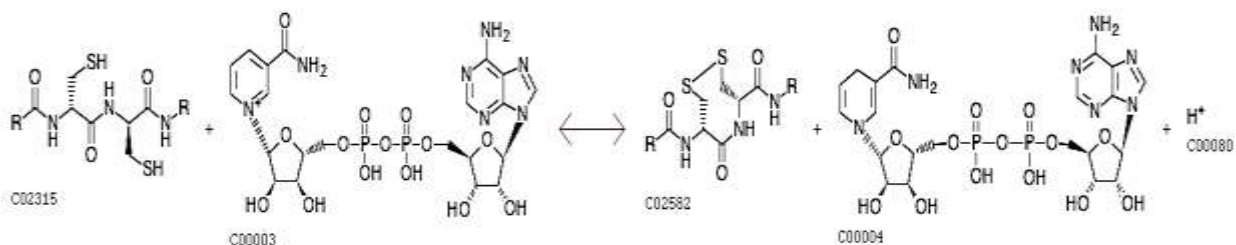
inhibition (- 0.78); PI protease inhibition (-0.60); inhibition enzyme - IE (0.19); nuclear receptor affinity - NRL (0.13); and ion channel modulation - ICM (0.28).

3.4.2 Characterization of the enzyme *LiTXN-I*

LiTXN-I (KEGG 1.8.1.8) also called disulfide reductase has 438 nucleotides (UniProt LINJ_29_1250) and participates in two reactions:

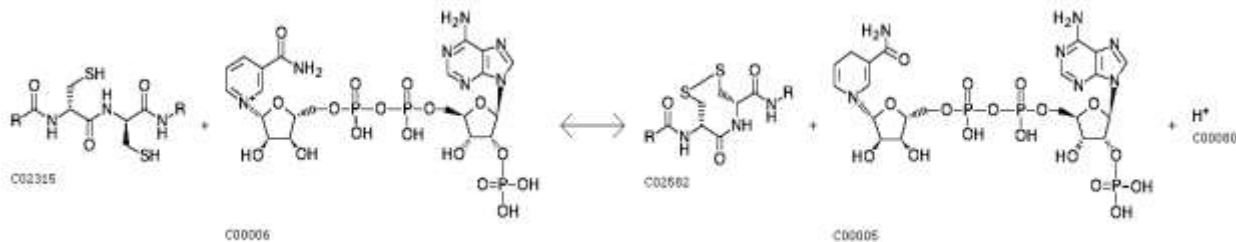
First reaction - (KEGG-R03913): Protein dithiol - C02315; NAD⁺ - C00003 $\rightleftharpoons$ Disulfide protein - C02582; NADH-C00004; H⁺ - C00080 (Figure 5).

Figure 5 - Metabolic reaction schematizing the participation of the enzyme *LiTXN-I*.



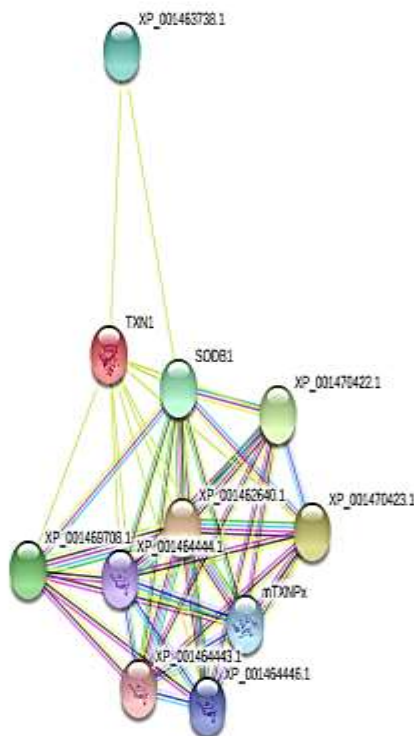
Second reaction (KEGG-R03914): Protein dithiol-C02315; NADP⁺ - C00006 $\rightleftharpoons$ Disulfide protein - C02582; NADPH-C00005; H⁺ - C00080 (Figure 6).

Figure 6 - Metabolic reaction characterizing the second activity of the enzyme *LiTXN-I*.



In relation to the network of protein interactions involving the enzyme *LiTXN-I*, 145 amino acids (UniProt - Q6RYT3), the STRING server characterized 10 proteins involved in the interaction network with minimum required score of PI > 0.400 (Figure 7).

Figure 7. Network of protein interactions with the enzyme *L*TXN-I.



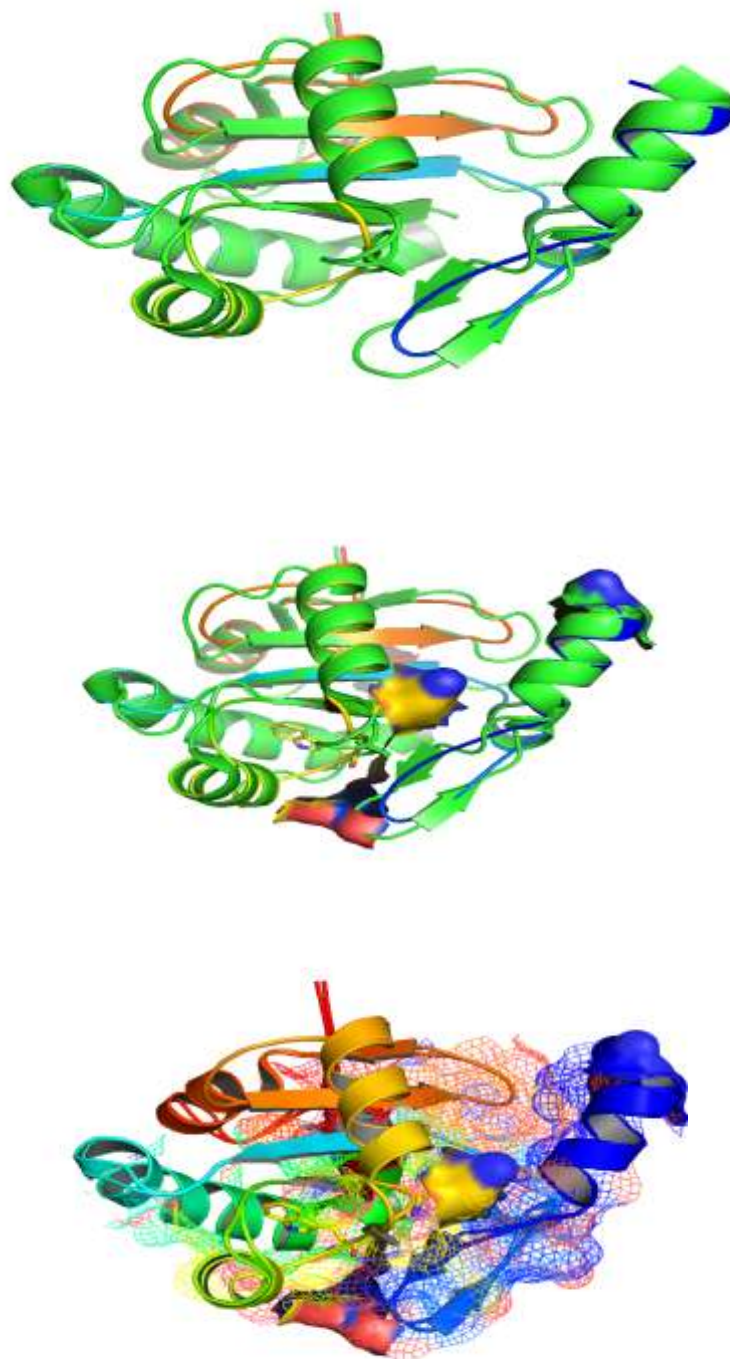
Subtitles: STRING - XP_001462640.1: putative thioredoxin (107 aa, PI = 0.522), enzyme involved in the catalytic activity isulfase of disulfide protein, catalysts for folding proteins; STRING - XP_001469708.1: glutathione peroxidase (152 aa, PI = 0.513), an enzyme involved in two metabolic pathways - glutathione metabolism and arachidonic acid metabolism; STRING - SODB1: superoxide dismutase (195 aa, PI = 0.500), enzyme with participation in hydrogen peroxide metabolism of the peroxisome antioxidant system; STRING - XP_001463738.1: Ntf2-like (124 aa, PI = 0.499), enzyme involved in nuclear transport factor 2; STRING-XP_001470422.1: putative glutathione peroxidase-like protein (174 aa, PI = 0.513); STRING-XP_001470423.1: putative protein similar to glutathione peroxidase-like protein (183 aa, PI = 0.513), STRING-mTXNPx: peroxide 229 aa, PI = 0.499); STRING-XP_001464446.1: tryparedoxin peroxidase (199 aa, PI = 0.499); STRING-XP_001464444.1: tryparedoxin peroxidase (190 aa, PI = 0.499); and STRING-XP_001464443.1: tryparedoxin peroxidase (199 aa, PI = 0.499). All are involved in glutathione metabolism.

3.4.3 Protein modeling

The protein that obtained greatest coverage in amino acid alignment, with 86% identity, 100% query cover and an acceptable resolution of 1.8 (8Å) was *LmTXN-I* (PDB - 3s9f), which was submitted to model *LiTXN-I* protein. Thus, after the evaluation of the 100 models generated, the *LiTXN-I* model presented the highest DOPE score (-16361.66797), being evident in the structural alignment of the *LiTXN-I* protein with the template (3s9f) *LmTXN-I*.

After alignment, we observed that both proteins have an active site with WCPPCR repeat, which in the *LiTXN-I* protein corresponds to the positions 39-44 and is part of the conserved region of both proteins. On the other hand, the loop regions of *LiTXN-I* were identified and subjected to the refinement of residues (Ser2, Gly3, Gln17, Trp86, Lys93, Phe140) (Figure 8). These regions were optimized by Modeller, but prior to refinement, the RAMPAGE server, used to evaluate the model's quality, revealed that 995.8% of the residues were in the favorable regions and 4.2% in the permitted regions. After the looping refinement, the RAMPAGE server indicated that 99.3% of the residues were in the favorable regions and 0.7% in the allowed regions (Supplementary Figure 3).

Figure 8 - Problematic residues are presented with protuberance on the surface of the proteins *LiTXN-I* and mesh analysis for visual inspection of the model.



After the refinement of the problematic regions of *L*/TXN-I, the identification and characterization of the atomic coordinates of the five magnesium ions in position 146-150 (Mg²⁺) with score of the b-factor less than 35 Å² in the *Lm*TXN-I protein were added to the *L*/TXN-I protein. Finally, the *L*/TXN-I model with total energy of -43517.7 kJ/mol, was subjected to refinement of the structure and energy minimization by YASARA through a molecular dynamic simulation of the model in an explicit solvent, generating a refined model with energy of -81502.4 kJ/mol.

3.4.4 Three-dimensional model validation

The *L*/TXN-I model was submitted to validation of the three-dimensional structure. The atoms were compacted in the molecular structure with the energies in the most favorable regions for a good model. While the assignment of the secondary structure by the DSSP (H = α -helix, B = residue on the isolated β -bridge, E = prolonged strand, participates in the β -ladder, G = 3-helix, 310 helix, I = 5 helix, π -helix, the structure presented some looping, with also a larger region of α -helix, (Supplementary Figure 4). The pseudo-energies for the whole model were also calculated by DFIRE (Energy - 197.42) according to which the lower the energy, the closer the protein will be to the native conformation. Solvent accessibility was also evaluated as QMEAN6 = 0.723.

The absolute quality of the model was calculated by the QMEAN Z-score software, where the whole structure presented values within the parameters (Z-score <1; 1 <Z-score <2; Z-score > 2), (Supplementary Figure 5). Some conformations were evaluated by PROMOTIF, such as the formation of hairpins at positions (14 - 21; 111 - 124), (Supplementary Figure 6), helix formation at positions (3-11: GVSKHLGDV; 26: SSL; 41-61: PPCRGFTP KLV E FYEKHHNSK; 74-81: EEDFNGYY; 95-104: NVVEALTKQY; 127-133: ARHALTQ) (Supplementary Figure 7), the protuberances identified at 3 residues at positions (116,120,121; NGD sequences) of type (AG), as well as at 3 residues at positions (114, 123, 124; sequences - GVT) of type (AC) (Supplementary Figure 8). However, the beta curves present in the peptide structures are located at some positions with their amino acids respectively (Table 1 and Supplementary Figure 9).

Dihedral angles called Phi (ϕ) and Psi (ψ) of all the amino acids of the model were also evaluated, and all of them presented a score of <-3.00 . Regarding the analysis of the stereochemistry of the model, we observed that in the RAMACHANDRAN graph, 94.5% of the residues were in the favorable region and 5.5% in the allowed regions (Supplementary Figure 10), while in the combination of the lateral torsion angles Chi1 and Chi2, all residues evaluated presented a score <-3.00 . With respect to the geometric quality of the residues (Lys16; Ser88; Thr125; Arg126; Pro141) of the main chain, all showed bond angles > 10.0 degrees being classified as acceptable, and one group was characterized as having ordination planar rigid ranking with > 0.03 (Supplementary Figure 11). In the evaluation of the properties of the residues, it was observed that in graphs A, B, C, D, E, F and G, most of the residues were within acceptable margins and were classified as satisfactory (Supplementary Figure 12). With respect to the binding angles and the attachment lengths of the main chain, most of the residues obtained a score > 2.0 standard deviation of the mean established by the server. In turn, at RMS distances from the planarity for the different groups present in the structure, it was observed that the amino acids of aromatic rings (His, Phe, Trp, Tyr) obtained acceptable scores of $> 0.03 \text{ \AA}$, and that acids without aromatic rings (Arg, Asn, Asp, Gln, Glu) also had acceptable scores of $> 0.02 \text{ \AA}$. In the evaluation of the structural alignment of the model with the template by the iPBA, 99.31% of the residues were aligned with a RMSD = 0.41 (Supplementary Figure 13).

3.4.5 Molecular docking

Molecular docking is a powerful tool for drug discovery *in silico* due to its exploitation in protein-binding interactions. Thus, analysis created two profiles of molecular interactions for the proteins of *L*TXN-I (1 Li, 2 Li, 3 Li) and *Lm*TXN-I (1 Lm, 2 Lm) associated with β -caryophyllene in different conditions to achieve a simulation with greater precision by valuing the pose of the ligand in the active site of the protein, thus choosing the one with greatest affinity. Two fields, hydrophobic and ionization were generated for the position of the β -caryophyllene insert with the *L*TXN-I and *Lm*TXN-I proteins.

It was observed that the proteins 1 Lm, 2 Lm of *L. major* submitted to docking, presented the lowest free energy, -4.28 kcal/mol⁻¹ (1 *Lm*) (Table 3).

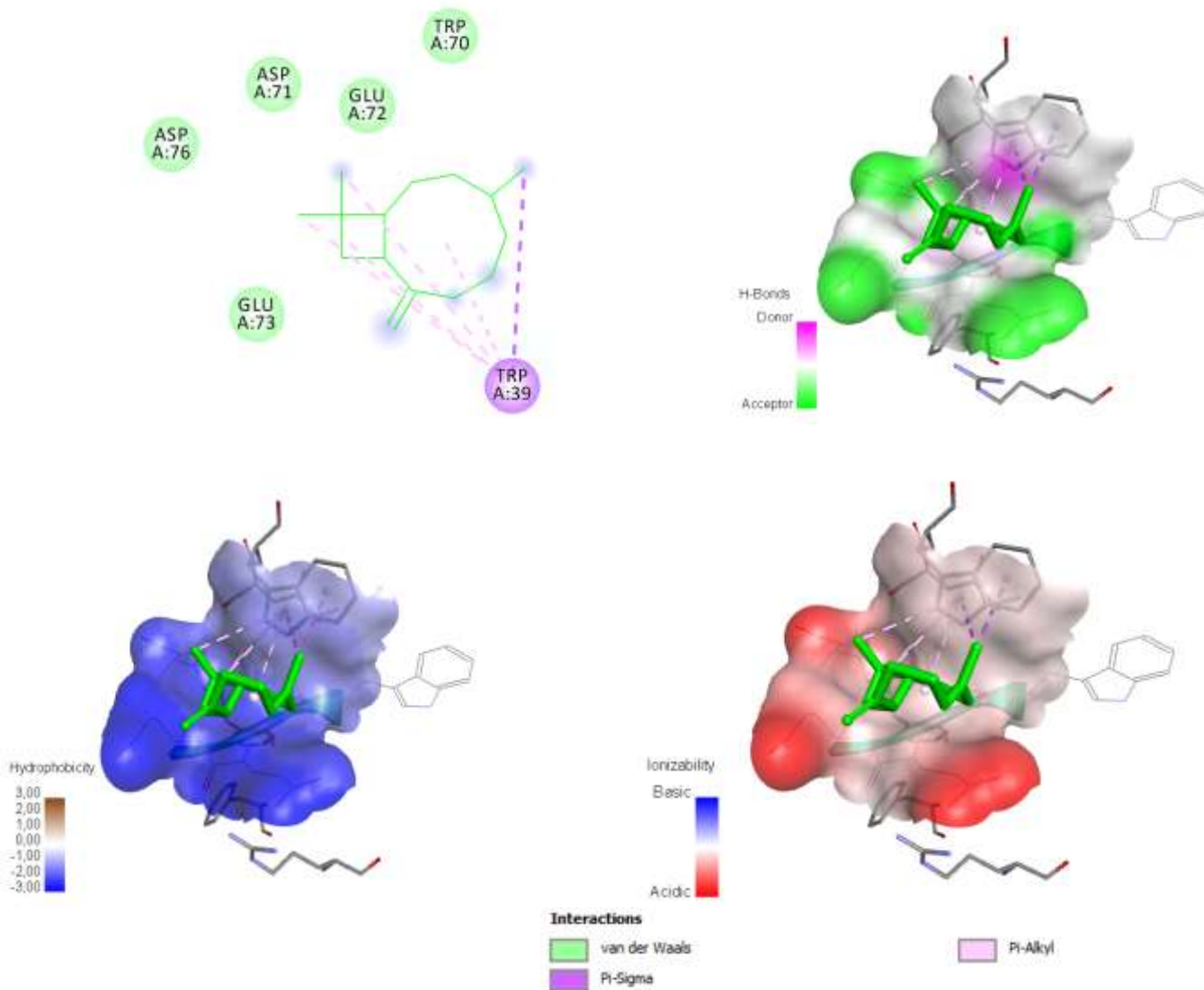
Table 3 - Free energy estimation and inhibition constant generated during the molecular fit of β -caryophyllene with proteins *LiTXN-I* and *LmTXN-I*.

Protein		AutoDock 4.2	
		ΔG : kcal / mol ⁻¹	Ki (μ M)
1	<i>Lm</i>	-4.38	617.11
2	<i>Lm</i>	-4.34	657.38
1	<i>Li</i>	6.36	21.74
2	<i>Li</i>	-6.42	19.73
3	<i>Li</i>	-6.44	19.17

Ki = inhibition constant calculated by Autodock 4.2 (script = printEnergies.cc); ΔG (kcal / mol⁻¹) = Free energies of binding ($\Delta G = E_{\text{Hbond}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{electrostatic}} + E_{\text{desolv}} + E_{\text{internal}} + E_{\text{torsional}} - E_{\text{unbound}}$); *Lm*: *L. major*; *Li*: *L. infantum*; 1 *Lm*: (*LmTXN-I* in the presence of metal ions, water molecules in the active site and ligand of interest).; 2 *Lm*: (*LmTXN-I* in the presence of metal ions and binder of interest).; 1 *Li*: (*LiTXN-I* and linker of interest).; 2 *Li*: (*LiTXN-I* in the presence of metal ions and binder of interest).; 3 *Li*: (*LiTXN-I* in the presence of water molecules in the active site, metal ions and ligand of interest).

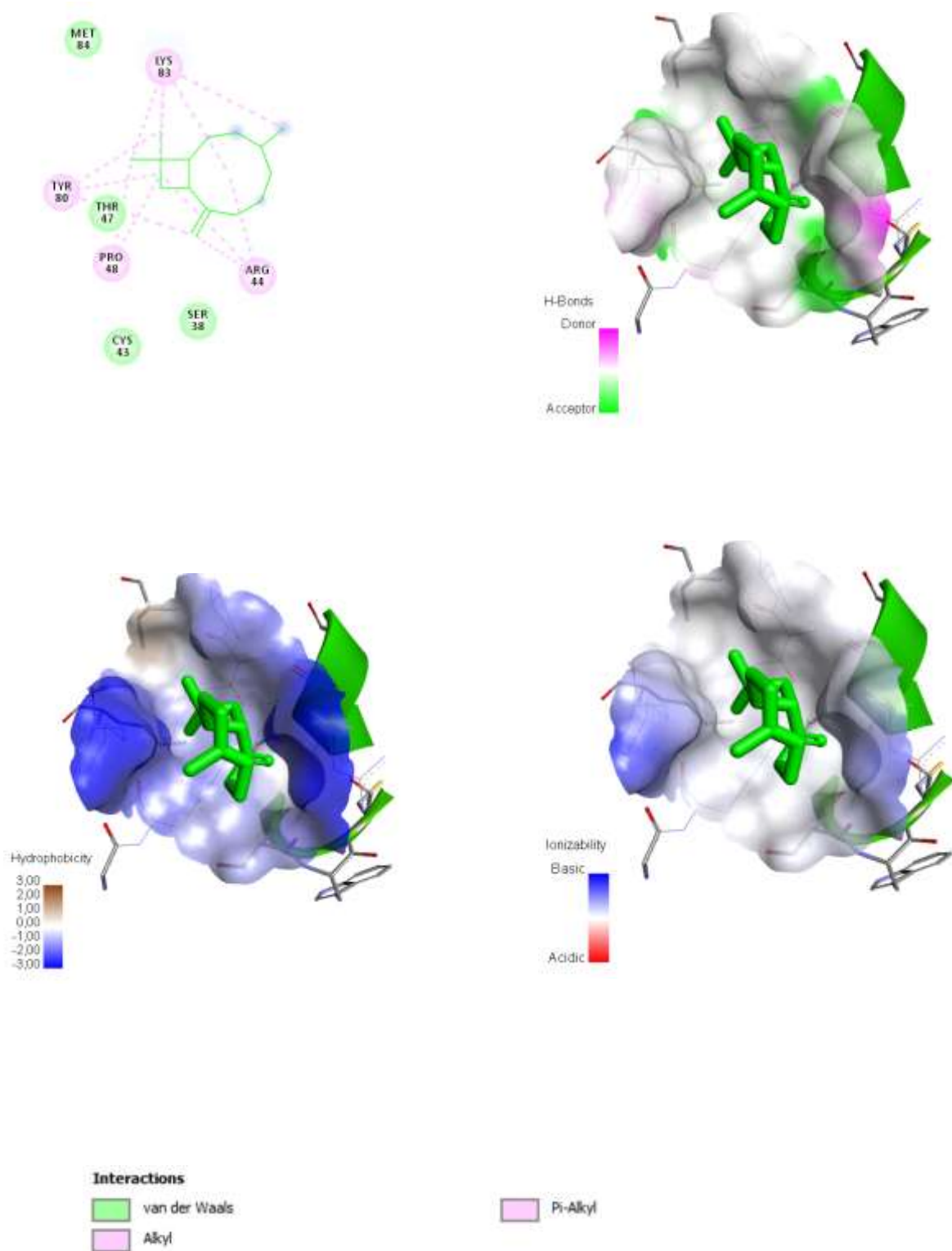
The accessibility to the solvent of 1,869.55 and favorable interactions (hydrophobic and van der Waals) with 6 matched residues: ASP76 (C14); ASP71 (12, 14); GLU72 (C2, C3, C9, C10, C11, C12, C13, C14); TRP70 (C12, C13); GLU73 (C9, C10, C14); and TRP39 (1, 8, 10, 12, 13, 14) (Figure 9).

Figure 9 - *LmTXN-I* complexed with β -caryophyllene characterizing the favorable interactions, as well as the hydrophobic fields in blue and ionization in red.



However, in the coupling of 3 Li with β -caryophyllene, the free energy was high presenting a value of $-6.44 \text{ kcal/mol}^{-1}$ with solvent accessibility of 2,544.64, establishing interactions of the hydrophobic and van der Waals type, with 5 matched residues: LYS83 (C1, C15); TYR80 (C5, C6, C7, C15); THR47 (C9, C10, C14, C15); PRO48 (C9, C14); and ARG44 (C4, C6, C7, C8, C9) (Figure 10).

Figure 10 - *LiTXN*-I complexed with β -caryophyllene characterizing the favorable interactions, as well as the fields of hydrophobicity in blue and ionization in red.



In the determination of inhibition constant K_i during the coupling of β -caryophyllene with each of the proteins, the results obtained were *Lm*TXN-I (1 *Lm*) of 617.11 μ M and *L*iTXN-I (3 *L*i) of 19.17 μ M.

4 DISCUSSION

Among the species of the genus *Copaifera*, *C. reticulata* is one that has the greatest number of biological activities described in the literature, having antimicrobial, anti-inflammatory, insecticidal, antinociceptive, antilithic, healing, anxiolytic and antiprotozoan effects (Ghizoni et al., 2017).

Significant antileishmanial activity of *C. reticulata* was demonstrated against promastigote, axenic amastigotes and intracellular amastigote of *L. amazonensis* with IC₅₀ values of 5 μ g/mL, 15.0 μ g/mL and 20.0 μ g/mL, respectively (Santos et al., 2008). However, β -caryophyllene was not active against *L. amazonensis* axenic amastigotes and intracellular amastigotes. Cell viability was checked by staining the cells with propidium iodide (Santos et al., 2012). In turn, Leite et al. (2013) used caryophyllene in two concentrations (100 and 50 μ g/mL) and obtained 100% inhibition of *L. braziliensis* promastigotes.

Our findings corroborate the results of Rondon (Rondon et al., 2012) who obtained for *C. reticulata* resin oil against *Leishmania chagasi* (=syn *L. infantum*) IC₅₀ values of 7.88 μ g/mL on promastigotes and 0.52 μ g/mL on amastigotes. Trans- β -caryophyllene (99% with 1% caryophyllene oxide) obtained dose-dependent effect on *Leishmania* spp amastigotes (Soares et al., 2013). Our findings demonstrated that β -caryophyllene has anti- *L. infantum* activity on both promastigotes and axenic amastigotes.

The acute toxicity test is advocated by the OECD to calculate the LD₅₀ of a given compound, creating a safe margin for the administration of the compound. The comparison of acute toxicity between experimental and computational analysis showed close accordance. This validates the use of computational simulations for this system, which aim to minimize and/or replace the use of animals for toxicity testing (Raies and Bajic, 2016; AltTox, 2017). The resin oil of *C. reticulata* and β -caryophyllene were not

toxic in Swiss mice, corroborating the findings of other studies (Sachetti et al., 2009; Teixeira et al., 2017).

The *in silico* method is an excellent screening tool for drug candidates, reducing time and cost for the synthesis of compounds (Gangrade et al., 2016). Negative results for carcinogenicity in animals treated with β -caryophyllene were confirmed by the absence of carcinomas in mice, corroborating the study by (Molina-Jasso et al., 2009), who obtained negative genotoxicity and cytotoxicity results in rats. In the computational mutagenicity test, β -caryophyllene was negative in all four strains of *S. typhimurium*, as was observed in the *in vitro* studies performed previously (Di Sotto et al., 2010; Gonçalves et al., 2011). However, β -caryophyllene has a medium risk of causing cardiac arrhythmias by the binding of the compound to the ionic channels of potassium, possibly leading to sudden death (Keating and Sanguinetti, 2001). Lastly, in the ADME evaluation, this compound showed good human intestinal absorption (HIA) and mean *in vitro* permeability in heterogeneous human epithelial colo-rectal adenocarcinoma, Caco2 cells and high permeability in MDCK cells used for compound screening (Irvine et al., 1999). Both cells, Caco-2 and MDCK have properties to evaluate drug absorption (Ganapathy et al., 1995) possessing essential properties for candidate drugs.

As β -caryophyllene can penetrate the blood-brain barrier, it can be classified as a “molecular Trojan horse” for other drugs, allowing the compound to have the desired pharmacological effect (Pardridge et al., 2006).

Proteins CYP - Cytochrome P450, which is a superfamily (CYP2A6, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 / 5) are responsible for the metabolism of endogenous and exogenous substances in the body (Guengerich, 1994) and play an important role in the metabolism of drugs (Nelson et al., 1996). The CYP2C enzyme is associated with the metabolism of 20% of the drugs administered (Goldstein, 2001). The isoforms CYP2C9 and P450 2C19, which reacted with β -caryophyllene are liver enzymes (Shimada et al., 1994) and are involved in the metabolism of some drugs of clinical importance, such as: anti-inflammatory drugs (Goldstein et al., 1994) antihypertensives, analgesic drugs and metabolizes approximately 15% of clinically used drugs (Cavallari et al., 2011). β -caryophyllene does not aggressively affect these enzymes, except for CYP3A4/5, whose activity is inhibited

by β -caryophyllene (Nguyen et al., 2017). This may be related to the increase in β -caryophyllene metabolism by CYP3A4/5, generating toxic levels of the compound's reactive metabolites, creating unwanted effects in the organism. Finally, β -caryophyllene inhibited the activity of P-glycoprotein, whose function is to translocate a broad variety of xenobiotics out of cells, increasing the therapeutic effect (Fromm et al., 2004). In the characterization of the enzyme tryparedoxin-I, in the metabolic cascade, it was verified that *LiTXN-I* interacts with ten other enzymes involved in the metabolism of glutathione (GSH) present in *Leishmania* spp. This protein is responsible for protecting the parasite against the rust action of nitric oxide (Fiorillo et al., 2012).

The modeling of the *LiTXN-I* protein was necessary, since to date its crystallographic structure is not contained in the PDB database, making it necessary to generate a reliable model close to its native structure (Cohen, 1988). Thus, after obtaining the three-dimensional model of *LiTXN-I* it was observed that β -caryophyllene presented favorable interaction with some residues in the active site (WCPPCR) of *LiTXN-I*, with low perturbation to the system (Kitchen et al., 2004). This is due to the complementarity of the three-dimensional arrangement of the bioactive molecule, with the influence of the chemical composition present in the structure (Romão et al., 2006).

5 CONCLUSION

The resin oil of *C. reticulata* and β -caryophyllene showed high proliferative inhibition in the *in vitro* tests. The *in vivo* toxicity study showed a safe LD50 with no toxicity. Furthermore, the results of acute toxicity *in vivo* were equivalent to those obtained *in silico*, further supporting the computational approach in the prediction of LD50.

The main compound of *C. reticulata* resin oil, β -caryophyllene, when compared to resin oil, obtained better *in vitro* performance on parasite promastigotes. Thus, our *in silico* findings, regarding toxicity, carcinogenicity, mutagenicity and ADME analyses, showed that β -caryophyllene is a strong candidate with pharmacological potential.

Finally, our results point to *LiTXN-I* as the target of β -caryophyllene as observed during the simulations. Docking of β -caryophyllene into *LiTXN-I* binding pocket showed

similar trend (19.17 Ki) as observed in the *in vitro* assays. If confirmed, this hypothesis indicates that the mechanism of action of β -caryophyllene is intrinsically related to imbalances in the functioning of the redox balance of the parasite.

Statement of authors' contributions to the manuscript

V.F.P.J, F.C.M.R and C.M.L.B created and executed the *in silico*, *in vitro* and *in vivo* studies; M.V.B.M and O.A.L extracted the resin oil *C. reticulata*; S.M.M and I.T.M.F contributed to the chemical analysis of the oil; W.L.C.R and L.M.B.O; contributed to the *in vivo* analysis; I.L.B.N, G.Z and V.N.F participated in the computational analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Declaration of interest

Declarations of interest: none

Acknowledgments

We thank the Brazilian government research agencies CAPES and CNPq for financial support. Dr. Bevilaqua and Dr. Freire received a fellowship from CNPq.

References

- Alqahtani, S., 2017. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects, Expert Opinion on Drug Metabolism ; Toxicology. Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol. 13, 1147-1158.
- AltTox.org. <http://alttox.org/>. (Acessed December, 17 2017).
- Axelrod, J., Tomchick, R., 1958. Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catecholamines. J. Biol. Chem. 233, 702-705.
- Basile, A. C., Sertié, J. A., Freitas, P. C. D., Zanini, A. C., 1988. Antiinflammatory activity of oleoresin from Brazilian Copaifera. J. Ethnopharmacol. 22, 101-109.
- Benkert, P., Tosatto, S.C.E., Schomburg, D., 2008. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. Proteins. 71, 261-277.
- Benkert P., Biasini M., Schwede T., 2011. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. Bioinformatics. 27, 343-50.

- Benkert, P., Tosatto, S.C.E., Schomburg, D., 2008. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins*. 71, 261-277.
- Cavallari, L. H., Jeong, H., Bress, A., 2011. Role of cytochrome P450 genotype in the steps toward personalized drug therapy. *Pharmacogenomics. Person. Med.* 4, 123–136.
- Cheng, A., Merz, K. M., 2003. Prediction of aqueous solubility of a diverse set of compounds using quantitative structure-property relationships. *J. med. chem.* 46, 3572-3580.
- Cohen, J., 1988. *Statistical power analysis for the behavioral Science* (Ed 2). Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- Colmenarejo, G., Alvarez-Pedraglio, A., Lavandera, J. L., 2001. Chemoinformatic models for predicting binding affinities to human serum albumin. *J. Med. Chem.* 44, 4370-4378.
- Croft, S. L., Sundar, S., Fairlamb, A. H., 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 111–126.
- Di Sotto, A., Mazzanti, G., Carbone, F., Hrelia, P., Maffei, F., 2010. Inhibition by beta-caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* 699, 23–28.
- Egan, W. J., Merz, K. M. Jr., Baldwin, J. J., 2000. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J. Med. Chem.* 43, 3867 – 3877.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M., Madhusudhan, M., Eramian, D., Shen, M., Pieper, U., Sali, A., 2006. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 5, 5-6.
- Fairlamb, A. H., Cerami, A., 1985. Identification of a novel thiol containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14, 187-198.
- Fernandes, F. F., Freitas, E. P. S., 2007. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 147, 150-154.

- Fidy, K., Fiedorowicz, A., Strzdała, L., Szumny, A., 2016. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer. Med.* 5, 3007-3017.
- Fiorillo, A., Colotti, G., Boffi, A., Baiocco, P., Ilari, A., 2012. The Crystal Structures of the Tryparedoxin-Tryparedoxin Peroxidase Couple Unveil the Structural Determinants of Leishmania Detoxification Pathway. *Plos. Negl. Trop. Dis.* 6, 1781.
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., 2004. *Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. J. Med. Chem.* 47, 1739–1749.
- Fromm M. F., 2004. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends. Pharmacol. Sci.* 25, 423-9.
- Ganapathy, M. E., Brandsch, M., Prasad, P. D., Ganapathy, V., Leibach, F. H., 1995. Differential recognition of b-lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2. *J. Biol. Chem.* 270, 25672–25677.
- Gangrade, D., Sawant, G., Mehta, A., 2016. Re-thinking drug discovery: In silico method. *J. Chem. Pharm. Res.* 8, 1092-1099.
- Gelly, J. C., Joseph, A. P., Srinivasan, N., de Brevern, A. G., 2011. *iPBA: a tool for protein structure comparison using sequence alignment strategies. Nucleic. Acids. Res.* 39, 18-23.
- Geris, R., Silva, I. G., Silva, H. H. G., Barison, A., Rodriguesfilho, E., Ferreira, A. G., 2008. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 1, 25-28.
- Ghizoni, C. V. C., Ames, A. P. A., Lameira, O. A., Amado, B. A. C., Sá Nakanishi, B. A., Bracht, L., Natali, M. R. M., Peralta, M. R., Bracht, A., Comar, F. J., 2017. Anti-Inflammatory and antioxidant actions of copaiba oil are related to liver cell modifications in arthritic rats. *J. Cell. Biochem.* 118, 3409-3423.
- Goldstein, J. A., 2001. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 52, 349–355.
- Goldstein, J. A., Morais, S. M. F., 1994. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics.* 4, 285–299.

- Gonçalves, O., Pereira, R., Gonçalves, F., Mendo, S., Coimbra, M. A., Rocha S. M., 2011. Evaluation of the mutagenicity of sesquiterpenic compounds and their influence on the susceptibility towards antibiotics of two clinically relevant bacterial strains. *Mutat. Res.* 723, 18–25.
- Guengerich, F. P., 1994. Preparation of microsomal and cytosolic fractions. In: Hayes AW. *Principles and Methods of Toxicology* (Ed 3). New York.
- Höltje, H. D., Sippl, W., Rognan, D., Folkers, G., 2003. Introduction to comparative protein modeling. In *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications* (Ed2). Germany.
- Huey, R., Morris, G. M., 2006. Using AutoDock with AutoDockTools: A Tutorial, Torrey Pines RD. La Jolla, California, EUA.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. J., 2013. Accelrys Inc. Materials Studio, version 7.0, Accelrys Inc. San Diego, CA, USA. Mol. Graph. 14, 33-38.*
- Hutchinson, E. G., Thornton M. J., 1996. PROMOTIF - a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein. Sci.* 5, 212-20.
- Irvine, J. D., Takahashi, L., Lockhart, K., Cheong, J., Tolan, W. J., Selick, H. E., Grove R. J., 1999. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. *J. Pharm. Sci.* 1, 28 – 33.
- Irwin, J. J., Sterling, T., Mysinger, R. M. M., Bolstad, E. S., Coleman, R. G., 2012. ZINC: A Free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* 52.
- Janert, P. K., 2010. Gnuplot in action: Understanding data with graphs (Ed 1). Manning Publications, Shelter Island, NY.
- Kanehisa, M., Goto, S., 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucleic. Acids. Res.* 28, 27-30.
- Keating, M. T., Sanguinetti, M. C., 2001. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell.* 104, 569-580.
- Kelder, J., Grootenhuys, P. D., Bayada, D. M., Delbressine, L. P., Ploemen, J. P., 1999. Polar molecular surface as dominant determinant for oral absorption and cerebral penetration of drugs. *Pharm. Res.* 16, 1514 – 1519.
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., Bajorath, J., 2004. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev.* 3, 935-949.

Krauth-Siegel, R. L., Coombs, G. H., 1999. Enzymes of parasite thiol metabolism as drug. *Parasitol. Today*. 15, 404-9.

Krieger, E., Joo, K., Lee, J., Lee, J., Raman, S., Thompson, J., Tyka, M., Baker, D., Karplus, K., 2009. *Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8*. *Proteins*. 9,114-22.

Leite, N.F., Sobral-Souza, C. E., Albuquerque, R. S., Brito, D. I. V., Lavor, A. K. L. S., Alencar, L. B. B., Tintino, S. R., Ferreira, J. V. A., Figueredo, F. G., Lima, L. F., Cunha, F. A. B., Pinho, F. G., Coutinho, H. F. M. 2013. Atividade antiparasitária in vitro e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis*. *Rev. Cubana Plant. Med.* 18, 522- 528.

Lemmon, G., Meiler, J., 2013. **Towards ligand docking including explicit interface water molecules**. *PloS. One*. 8, e67536.

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J., 2001. *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. *Adv. Drug. Deliv. Ver.* 46, 3-26.

Lovell, S. C., 2003. *Structure validation by C alpha geometry: phi, psi and C beta deviation*. *Proteins*. 50, 437–450.

Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga Junior, V. F., 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova*. 25, 429-438.

Melo, F., Feytmans, E., 1998. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *J. Mol. Biol.* 277, 1141-1152.

Molina-Jasso, D., Alvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., 2009. Clastogenicity of beta-caryophyllene in mouse. *Biol. Pharm. Bull.* 3, 520-522.

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 30, 2785–2791.

Mukhopadhyay, R., Dey, S., Xu, N., Gage, D., Lightbody, J., Ouellette, M., Prosen, B., 1996. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 10383-10387.

- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 6, 1–42.
- Neto, S.J.L., Gramosa, N. V., Silveira, E. R. 2008. Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. *Quim. Nova*, 31, 1078-1080.
- Nguyen, L. T., Myslivecková, Z., Szotáková, B., Spicáková, A., Lnenicková, K., Ambroz, M., Kubíček, V., Krasulová, K., Anzenbacher, P., Skálová, L., 2017. The inhibitory effects of β -caryophyllene, β -caryophyllene oxide and α -humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 25, 123-128.
- OECD, 2008. *Environmental outlook to 2030*, OECD Publications, Paris, France.
- Pardridge, M. W., 2006. Molecular Trojan horses for blood–brain barrier drug delivery. *Curr. Opin. pharmacol.* 6, 494–500.
- Podunavac-Kuzmanović, S.O., Cvetković, D. D., 2011. Lipophilicity and antifungal activity of some 2-substituted benzimidazole derivatives. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, 17, 9-15.
- Prates, F. V., Dourado, M. E., Silva, S. C., Schriefer, A., Guimarães, L. H., Brito, M. D., 2017. Fluconazole in the treatment of cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*: a randomized controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* 64, 67-71.
- Raies, A. B., Bajic, V. B., 2016. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley. Interdiscip. Ver. Comput. Mol. Sci.* 6, 147-172.
- Ramakrishnan, C., Ramachandran, G. N., 1965. Stereochemical Criteria for Polypeptide and Protein Chain Conformations: II. Allowed Conformations for a Pair of Peptide Units. *Biophys. J.* 909-933.
- Romão, P. R. T., Tovar, J., Fonseca, S. G., Moraes, R. H., Cruz, A. K., Hothersall, J. S., Noronha-Dutra, A. A., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q., 2006. Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 355-363.
- Rondon, F. C., Bevilaqua, C. M., Accioly, M. P., DE Moraes, S. M., Andrade-Júnior, H. F., Carvalho, C. A., Lima, J. C., Magalhães, H. C., 2012. In vitro efficacy of *Coriandrum*

- sativum, Lippia sidoides and Copaifera reticulata against Leishmania chagasi. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 21, 185-91.
- Sachetti, C. G., Fascineli, M. L., Sampaio, J. A., Lameira, O. A., Caldas, E. D., 2009. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (Copaifera reticulata Ducke, Fabaceae). Rev. Bras. Farmacogn. 19, 937-941.
- Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of Origanum vulgare spp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food. Control. 1, 549-557.
- Santos A.O., Ueda-Nakamura T., Dias-Filho B.P., Veiga-Jr V. F., Nakamura C. V., 2012. Copaiba oil: an alternative to development of new drugs against leishmaniasis. Evid. Based Complement Alternat. Med. 898419.
- Santos, A. O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Veiga-Junio, V. F., Pinto, A. C., Nakamura, C. V., 2008. Effect of Brazilian copaiba oils on Leishmania amazonensis. J. Ethnopharmacol. 120, 204-208.
- Schuettelkopf A. W, van Aalten, D. M., 2004. PRODRG - a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60, 1355-1363.
- Schwede, T. J., Kopp., 2003. "SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. Nucleic. Acids. Res. 31, 3381-3385.
- Sereno, D., Guilvard, E., Maquaire, S., Cavaleyra, M., Holzmüller, P., Ouaisi, A., Lemesre, J. L., 2001. Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the in vitro life cycle of Leishmania infantum: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas. Acta. Trop. 80, 195–205.
- Sharief, A. H., Gasim Khalil, E.A., Theander, T.G., Kharazmi, A., Omer, S.A., Ibrahim, M. E., 2006. Leishmania donovani: An in vitro study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. Exp. Parasitol. 114, 247-52.
- Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., Guengerich, F. P., 1994. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians, J. Pharmacol. Exp Ther. 270, 414-23.

- Shimizu, M., Shogawa, H., Matsuzawa, T., Yonezawa, S., Hayashi, T., Arisawa, M., 1990. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. IV. Constituents and anti-inflammatory effect of Paraguayan crude drug "Alhucema" (*Lavandula latifolia* Vill.). *Chem. Pharm. Bull.* 38, 2283-2284.
- Silva, I. G., Zanon, V. O. M., Silva H. H. G., 2003. Larvicidal activity of *Copaifera reticulata* Ducke oil-resin against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Neotrop. Entomol.* 32, 729-732.
- Singh, K., Ali, V., Pratap Singh, K., Gupta, P., Suman, S., Ghosh, A. K., Bimal, S., Pandey, K., Das, P., 2017. Deciphering the interplay between cysteine synthase and thiol cascade proteins in modulating Amphotericin B resistance and survival. *Redox. Biol.* 12, 350-366.
- Soares, D. C., Portella, N. A., Ramos, M. F. S., Siani, A. C., Saraiva, E. M., 2013. Trans- β -Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (*Copaifera* spp.). *J. Evid. Based Complementary Altern Med.* 761323.
- Sundar, S., 2015. Visceral leishmaniasis. *Trop. Parasitol.* 5, 83-85.
- Susnow, R. G., Dixon, S. L., 2003. Use of robust classification techniques for 2D6 inhibition of human cytochrome P450. *J. Chem. Inf. Comput.* 43, 1308 – 1315.
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., 2017. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible, *Nucleic. Acids. Res.* 45, 362-368.
- Teixeira, F. B., Silva, B., Lameira, O. A, Webber, L. P., Couto, A. R. S., Martins M. D., Lima R. R., 2017. Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues. *BMC complement. Altern. Med.* 17, 313.
- Thilagavathi, R., Mancera, R. L., 2010. Ligand-protein cross-docking with water molecules. *J. Chem. Inf. Model.* 50, 415-421.
- Ullah, N., Nadhman, A., Siddiq, S., Mehwish, S., Islam, A., Jafri, L., Hamayun, M., 2016. Plants as Antileishmanial Agents: Current Scenario. *Phytother. Res.* 30, 1905–1925.

van Gunsteren, W. F., Billeter, S. R., 1996. Biomolecular Simulations: The GROMOS96 Manual and User Guide. Zürich, VdF Hochschulverlag ETHZ.

Veiga-Junior, V. F., Pinto, A. C., 2002. O gênero *Copaifera*. *Quim. Nova* 25, 273-286.

Vila-Nova, N. S., Morais, S. M., Falcão, M. J., Alcantara, T. T., Ferreira, P. A., Cavalcanti, E. S., Vieira, I. G., Campello, C. C., Wilson, M., 2013. Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corossolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. *Exp. Parasitol.* 133, 334-8.

Wilkinson, S. R., Horn, D., Prathalingam, S. R., Kelly, J. M., 2003. RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the African trypanosome. *J. Biol. Chem.* 278, 31640–31646.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram a necessidade de melhorar a eficácia destes produtos naturais por meio da síntese de nanopartículas de β -cariofileno e/ou do óleo resina de *C. reticulata*. Espera-se o aumento do efeito leishmanicida. O próximo passo será a avaliação da atividade *in vivo* em modelos de animais suscetíveis a infecção experimental com a quantificação da carga parasitária. Caso os efeitos sejam os esperados, faz-se necessário testar no hospedeiro alvo, o cão. A bioinformática poderá confirmar a ação do princípio ativo.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, R. T.; WERNECK, L. G.; ALMEIDA, S. A.; FIGUEIREDO, B. F. Fatores ambientais associados à ocorrência de leishmaniose visceral canina em uma área de recente introdução da doença no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 00021117, 2018.
- ARIAS, D. G.; CABEZA, M. S.; ERBEN, E. D.; CARRANZA, P. G.; LUJAN, H. D.; TELLEZ, I. NÖN. M. T.; IGLESIAS, A. A.; GUERRERO, S. A. Functional characterization of methionine sulfoxide reductase A from *Trypanosoma* spp. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n.1, p. 37-46, 2011.
- ARROYO-ACEVEDO, J.; QUINO-FLORENTINI, M.; MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ALMORA-PINEDO, Y.; ALBA-GONZÁLEZ, A.; CONDORHUAMÁN-FIGUEROA M. Efecto cicatrizante del aceite de *Copaifera officinalis* (copaiba), en pacientes con úlcera péptica. **Anales de la Facultad de Medicina**, v. 72, n. 2, p. 113-117, 2011.
- ARTURSSON, P.; KARLSSON, J. Correlation between oral-drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 175, p. 880–885, 1991.
- BAILEY, D.; BROWN D. High-throughput chemistry and structure-based design: survival of the smartest. **Drug Discovery Today**, v. 6, n. 2, p. 57–59, 2001.
- BAJORATH, J. Integration of virtual and high-throughput screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 11, p. 882–894, 2002.
- BAKER, L. M. S., RAUDONIKIENE, A., HOFFMAN, P. S., POOLE, L. B. Essential thioredoxin-dependent peroxiredoxin system from *Helicobacter pylori*: Genetic and kinetic characterization. **Journal of Bacteriology**. v. 183, p. 1961-1973, 2001.
- BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 1, p. 21- 50, 2010.
- BARTH P., WALLNER B., BAKER D. Prediction of membrane protein structures with complex topologies using limited constrains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 5, p. 1409–1414, 2009.
- BASILE, A. C., SERTIÉ, J. A., FREITAS, P. C. D., ZANINI, A. C., 1988. Antiinflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 101-109, 1988.
- BENIGNI, R. Predicting the carcinogenicity of chemicals with alternative approaches: recent advances. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 10, p. 1199–1208, 2014.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, p. 560-586, 1988.

BERNARDES W. A; LUCARINI R; TOZATTI M. G; FLAUZINO L. G; SOUZA M. G; TURATTI I. C; ANDRADE E.; SILVA M. L; MARTINS C. H; DA SILVA FILHO A. A; CUNHA W. R. Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 65, n. 9-10, p. 588-93, 2010.

BICKER, J., ALVES, G., FORTUNA, A.; FALCAO, A. Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, p. 409–432, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016. **Nota Técnica Nº 11/2016 – CPV / DFIP / SDA / GM / MAPA**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br> <acesso em 15/03/2017>. Acesso em: 5 maio 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde** – 2016. Disponível em:<<http://www.rio.rj.gov.br/dlstatic/10112/6385405/4170293/GUIADEVS2016.pdf>> Acesso em: 5 maio 2018.

BRASIL. Portaria interministerial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Ministério da Saúde, 2008. **Portaria Interministerial Nº 1426/2008 – MAPA/MS**.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. DF. 2014.

BROWN, J. R.; SANSEAU, P. A. computational view of microRNAs and their targets. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 595–601, 2005.

BRYCESON, A. D. M. Leishmaniasis. In: COOK, G.C. (Org.). **Manson's Tropical Diseases**. London: **WB Saunders**, p. 1213-1245, 1996.

CALLEJA, M. A.; VIEITES, J. M.; MONTEROMETERDEZ, T.; TORRES, M. I.; FAUS, M. J.; GIL, A.; SUÁREZ, A.; The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British Journal of Nutrition**, v. 1, p. 1-8, 2012.

CARPENTER, T. S.; KIRSHNER, D. A.; LAU, E. Y.; WONG, S. E.; NILMEIER, J. P. ; LIGHTSTONE, F. C. A. method to predict blood-brain barrier permeability of drug-like compounds using molecular dynamics simulations. **Biophysical Journal**, v. 107, p. 630–641, 2014.

CASTRO, H.; ROMAO, S.; CARVALHO, S.; TEIXEIRA, F.; SOUSA, C. Mitochondrial Redox Metabolism in Trypanosomatids Is Independent of Tryparedoxin Activity. **PLOS ONE**, v. 5, 9, p. 12607, 2010.

CHANG, J. M.; DI, TOMMASO, P.; TALY, J. F.; NOTREDAME, C. Accurate multiple sequence alignment of transmembrane proteins with PSI-coffee. **BMC Bioinformormatics**, v. 13, 2013.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 873-882, 2007.

CHICCA, A.; CAPRIOGLIO, D.; MINASSI, A.; PETRUCCI, V.; APPENDINO, G.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; GERTSCH, J. Functionalization of β -caryophyllene generates novel polypharmacology in the endocannabinoid system. **ACS Chemical Biology**, v. 9, p. 1499–1507, 2014.

CLARK, D. E. In silico prediction of blood-brain barrier permeation. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 927–933, 2003.

COLMENAREJO, G.; ALVAREZ-PEDRAGLIO, A.; LAVANDERA, J. L. Cheminformatic models to predict binding affinities to human serum albumin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 4370–4378, 2001.

COMELLI-JR, E.; SKINOVSKI, J.; SIGWALT, M. F.; BRANCO, A. B.; LUZ, S. R.; BAULÉ, C. P. Rupture point analysis of intestinal anastomotic healing in rats under the action of pure Copaiba (*Copaifera langsdorfii*) oil. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 362-367, 2010.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Resolução Normativa CONCEA n. 15, de 16 de dezembro de 2013**. Baixa a Estrutura Físcia e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica. Disponível em: <<http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/arquivos/concea/240230.pdf>> <acesso em 15/03/2017>. Acesso em: 5 maio 2018

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; XAVIER, C. M.; SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; FERREIRA, A. G.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. P. L. A Pyrimidine- β -carboline and others alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 2, p. 292-294, 2006.

COUPEZ, B.; LEWIS, R. A. Docking and scoring-theoretically easy, practically impossible. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 25, p. 2995–3003, 2006.

CROFT, S. L., SUNDAR, S., FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 111–126, 2006.

CROSS, J. B.; THOMPSON, D. C.; RAI, B. K.; BABER, J. C.; FAN, K. Y.; HU Y.; HUMBLET, C. Comparison of several molecular docking programs: pose prediction and virtual screening accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, 6, p.1455–1474, 2009.

DAYAKAR, A.; CHANDRASEKARAN, S.; VERONICA, J.; SUNDAR, S.; MAURYA, R. *In vitro* and *in vivo* evaluation of anti-Leishmanial and immunomodulatory activity of Neem leaf extract in *Leishmania donovani* infection. **Experimental Parasitology**, v. 153, p 45-54, 2015.

DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G. H. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochemical Journal**, v.38, p.405-12, 2004.

DEVILLERS, J. J. Prediction of mammalian toxicity of organophosphorus pesticides from QSTR modeling. **Journal. SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 15, p. 501–510, 2004.

DIAS, E. F.; PELOSO, A. F. P.; LEME, C. M.; CARNIELLI, C. N.; PEREIRA, C. C.; WERNECK, S.; GUERRERO, F. R.; GADELHA, L.; *Trypanosoma cruzi* trypanothione II interacts with different peroxiredoxins under physiological and oxidative stress conditions. **Experimental Parasitology**, v. 184, p. 1-10, 2018.

DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v.25, p.1240-2, 1997.

DNDi, Drugs for Neglected Diseases initiative. **Journal Business plan.**, v. 2, 2014. Disponível em: <www.dndi.org>. Acesso em: 5 maio 2018.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC Biology**, v. 9, p. 71, 2011.

DUTTA, A.; SARKAR, D.; GURIB-FAKIM, A.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. *In vitro* and *in vivo* activity of Aloe vera leaf exudate in experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 102, n. 6, p. 1235-1242, 2008.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, p.125-30, 1996.

EUROPEAN UNION, Regulation (EC) No 1272/2008 of the European parliament and of the council 16. **Farmaco**, v. 56, p. 387-389, 2001.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Identification of a novel thiol containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 14, p. 187-198, 1985.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 695-729, 1992.

FAZZARI, M. J.; GREALLY, J. M. 2004. Epigenomics: beyond CpG islands. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p.446–55, 2004.

FERNANDES, F. F., FREITAS, E. P. S. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinária Parasitologia**, v. 147, p. 150-154, 2007.

FERREIRA, L. G.; DOS SANTOS, R. N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, 7, p.13384-421, 2015.

FIDYT, K.; FIEDOROWICZ, A.; STRZĄDAŁA L.; SZUMNY, A. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, v. 5, 10, p. 3007-3017, 2016.

FIORILLO, A., COLOTTI, G., BOFFI, A., BAIOTTO, P., ILARI, A. The Crystal Structures of the Tryparedoxin-Tryparedoxin Peroxidase Couple Unveil the Structural Determinants of Leishmania Detoxification Pathway. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. 1781, 2012.

FOSTER, IAN. What is the Grid? A Three Point Checklist. **GRID today**, v. 1, p. 32-36, 2002.

FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11–19, 2012.

FRÉZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 181-9, 1999.

GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; FLORENTINO, I. F.; LINO, R. C.; FAJEMIROYE, J. O.; CHAIBUB, B.A. DE PAULA, J. R.; DE LIMA, T. C. M.; COSTA, E. A. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. *Prog. Neuropsychopharmacol.* **Biological Psychiatry**, v. 38, p. 276-284, 2012.

GANNON, D.; ALAMEDA, J.; CHIPARA, O.; CHRISTIE, M.; DUKE, V. Building grid portal applications from a Web service component architecture. **Proceedings of the IEEE**, v. 93, p. 551–63, 2005.

GARCÍA-DOMENECH, R.; ALARCÓN-ELBAL, P.; BOLAS, G.; BUENO-MARÍ, R.; CHORDÁ-OLMOS, F. A.; DELACOUR, S. A.; MOURIÑO, M. C. ; VIDAL, A.; GÁLVEZ, J. Prediction of acute toxicity of organophosphorus pesticides using topological indices, **Journal SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 18, p. 745–755, 2007.

GARG, P.; VERMA, J. In silico prediction of blood brain barrier permeability: an artificial neural network model. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, p.289–297, 2006.

GERIS, R., SILVA, I. G., SILVA, H. H. G., BARISON, A., RODRIGUESFILHO, E., FERREIRA, A. G. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. S. Paulo. v.1, p. 25-28, 2008.

GERMONPREZ, N.; MAES, L.; VAN PUYVELDE, L.; VAN TRI, M.; ANH TUAN, D.; DE KIMPE, N. *In vitro* and *in vivo* anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from *Maesa balansae* and some chemical derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 32-37, 2005.

GERTSCH, M.; LEONTI, S.; RADUNER, I.; RACZ, J. Z.; CHEN, X. Q.; XIE, K. H.; ALTMANN, M.; KARSAK, A.; ZIMMER. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, 26, p. 9099-104, 2008.

GLASER, F.; MORRIS, R. J.; NAJMANOVICH, R. J.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. A method for localizing ligand binding pockets in protein structures. **Proteins**, v. 62, 2, p. 479–488, 2006.

GONZALEZ-CHAVES, AVEZ, Z.; OLIN-SANDOVAL, V.; RODÍGUEZ-ZAVALA, J.S.; MORENO-S ANCHEZ, R.; SAAVEDRA, E. 2015. Metabolic control analysis of the *Trypanosoma cruzi* peroxide detoxification pathway identifies tryparedoxin as a suitable drug target. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1850, n. 2, p. 263-273, 2015.

GOODFORD, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 849–857, 1985.

HAGEN, J. B. The origins of bioinformatics. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, p. 231-236, 2000.

HALL, M. L.; JORGENSEN, W. L. ; WHITEHEAD, L. Automated ligand- and structure-based protocol for in silico prediction of human serum albumin binding. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, p. 907–922, 2013.

HALPERIN, I.; MA B.; WOLFSON, H. NUSSINOV, R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. **Proteins**, v. 47, n. 4, p. 409–443, 2002.

HILL, J. R.; DEANE, C. M. MP-T: improving membrane protein alignment for structure prediction. **Bioinformatics**, v. 29, n.1, 54–61, 2013.

HUDAIB, M.; SPERONI, E.; DI PIETRA, A. M.; Cavrini, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, pp. 691-700, 2002.

HUNG, L. H.; SAMUDRALA, R. PROTINFO: secondary and tertiary protein structure prediction. **Nucleic Acids Research**, v.31, p. 3296–3299, 2003.

HUNT, L. T. Margaret Oakley Dayhoff 1925-1983. Bull. **Journal of Mathematical Biology**, v. 46, p. 467-472, 1984.

JACOBS, A. C.; BROWN, P. C. Regulatory Forum Opinion Piece*
Transgenic/Alternative Carcinogenicity Assays: A Retrospective Review of Studies Submitted to CDER/FDA 1997–2014. **Toxicology Pathol**, v. 43, p. 605–610, 2015.

JONES, D. T. Predicting novel protein folds by using FRAGFOLD. **Proteins Supplements**, v. 5, p. 127–132, 2001.

JORGENSEN, W. L. The many roles of computation in drug discovery. **Science**, v. 303, p.1813–1818, 2004.

SANDEEP, K.; SUNIL K. K. T.; SUDHEER, B.; VARMA M., M. Liposomal drug delivery system - A Comprehensive Review. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 5, p. 62-75, 2013.

KASTENHOLZ, M. A.; PASTOR, M.; CRUCIANI, G.; HAAKSMA, E. E.; FOX, T. GRID/CPCA: a new computational tool to design selective ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 16, p. 3033–3044, 2000.

KELM, S.; SHI, J.; DEANE, C. M. iMembrane: homology-based membrane-insertion of proteins. **Bioinformatics**, v. 25, n. 8, p.1086–1088, 2009.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.

KONTOYIANNI, M.; MADHAV, P.; SUCHANEK, E.; SEIBEL, W. Theoretical and practical considerations in virtual screening: a beaten field?. **Current Medicinal Chemistry**, v.15, n. 2, p.107–116, 2008.

KRAUTH-SIEGEL, R. L., COOMBS, G. H. Enzymes of parasite thiol metabolism as drug. **Parasitology Today**, v.15, p. 404-9, 1999.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.

LAKSHMI, V.; PANDEY, K.; KAPIL, A.; SINGH, N.; SAMANT, M.; DUBE, A. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of *Dysoxylum binectariferum* and its fractions against *Leishmania donovani*. **Phytomedicine**, v. 14, n.1, p. 36-42, 2007.

LANCIEGO, J. L., BARROSO-CHINEA, P., RICO, A. J., CONTE-PERALES, L., CALLÉN, L., RODA, E.; FRANCO, R. Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, p. 97–104, 2011.

LANGER, T.; HOFFMANN, R. D. Virtual screening: an effective tool for lead structure discovery. **Current Pharmaceutical**, v. 7, 7, p. 509–527, 2001.

LASKOWSKI, R. A. SURFNET: a program for visualizing molecular surfaces, cavities, and intermolecular interactions. **Journal of Molecular Graphics**, v. 13, n. 5, p. 323–330. 307–328, 1995.

LEGAULT, A.; PICHETTE. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 12, p.1643-7, 2007.

LEVITT, D. G.; BANASZAK, L. J.; POCKET: a computer graphics method for identifying and displaying protein cavities and their surrounding amino acids. **Journal of Molecular Graphics**, v.10, n. 4, p.229–234, 1992.

LI, H. Y.; CHEN, Z. X.; XU, X. J.; SUI, X. F.; GUO, T.; LIU, W. ; ZHANG, J. W. Predicting human plasma protein binding of drugs using plasma protein interaction QSAR analysis (PPI-QSAR). **Biopharmaceutics Drug Disposition**, v. 32, p. 333–342, 2011a.

LI, X.; LI, Y.; CHENG, T.; LIU, Z.; WANG, R. Evaluation of the performance of four molecular docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 11, p. 2109–2125, 2010.

LOBLEY, A.; SADOWSKI, M. I.; JONES, D. T. pGenTHREADER and pDomTHREADER: new methods for improved protein fold recognition and superfamily discrimination. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1761–1767, 2009.

LOOGER, L. L., DWYER, M. A.; SMITH, J. J.; HELLINGAHW. Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions. **Nature**, v. 423, p. 185–90, 2003.

LUSCOMBE, N. M.; GREENBAUM, D.; GERSTEIN, M. What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. **Methods of Information in Medicine**, v. 40, p. 346-358, 2001.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MATO GROSSO DO SUL. **Gerência Estadual de Zoonoses/ CECV/ SGVS/ SES – Informe epidemiológico**. 2016. Disponível em: <<http://portal.cfmv.gov.br/>>. Acesso em: 5 maio 2018.

MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: Desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, 1, 2004.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; MACEDO, S. R. A.; BARROS, N. B.; FACUNDO, J. B.; MILITÃO, J. S. L. T.; NICOLETE, R.; FACUNDO, V. A. Plantas da Amazônia Brasileira com Potencial Leishmanicida *in vitro*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 4, p. 359-374, 2015.

MEZEI, M. A new method for mapping macromolecular topography. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 21, n. 5, p. 463–472, 2003.

MINAS GERAIS. Conselho Regional de Medicina Veterinária de Minas Gerais-CRMV/MG. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia (Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG)**, 138pp. 2012.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in parasitology**, v.24, p.371-377, 2008.

MOITESSIER, N.; ENGLEBIENNE, P.; LEE, D.; LAWANDI, J.; CORBEIL, C. R. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. Br. **Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 7–26, 2008.

MONGE-MAILLO B, LÓPEZ-VÉLEZ R. Therapeutic options for visceral leishmaniasis. **Drugs**, v. 73, n. 17, p.1863-88, 2013.

MOULT, J. Predicting protein three-dimensional structure. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, 6, p. 583-8, 1999.

MUKHOPADHYAY, R., DEY, S., XU, N., GAGE, D., LIGHTBODY, J., OUELLETTE, M., PROSEN, B. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 10383-10387, 1996.

MUNIZ, J. W. C.; BOZZA, P. T.; NASCIMENTO, J. L.; REIS, P. A. Atividade anti-inflamatória do óleo-resina da copaífera reticulata em modelo inflamatório de edema de pata. **Revista Paraense de Medicina**, v. 23, n. 1, p. 1-7, 2009.

NUGENT, T.; JONES, D. T. Membrane protein structural bioinformatics. **Journal of Structural Biology**, v.179, p. 327–337, 2012.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure**, 2008. OECD Publishing, Paris. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1787/9789264071049-en>>. Acesso em: 5 maio 2018.

OLIVEIRA, L. S.; JULIÃO, F. S.; DE SOUZA, V. M. M.; FREITAS, D. S.; SOUZA, B. M. P. S.; PAULE, B. J. A.; AGUIAR, P. H. P.; BARROUIN-MELO, S. M.; FRANKE, C. R. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, n.1, p.41-47, 2005.

OLIVEIRA, S. S.; ARAÚJO, T. M. Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em uma área endêmica do Estado da Bahia, Brasil (1995-2000). **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, p.1681-1690, 2003.

ONAKPOYA, I. J.; HENEGHAN, C. J. ; ARONSON, J. K. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. **BMC Medicine**, v.14, p. 10, 2016.

ONN, I.; MILMAN-SHTEPEL, N.; SHLOMAI, J. Redox potential regulates binding of universal minicircle sequence binding protein at the kinetoplast DNA replication origin. **Eukaryotic Cell**, v. 3, 2, p. 277-287, 2004.

PAUL, S. M.; MYTELKA, D. S.; DUNWIDDIE, C. T.; PERSINGER, C. C.; MUNOS, B. H.; LINDBORG, S. R. ; SCHACHT, A. L. How to improve R;D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 203–214, 2010.

PELLEGRINI-CALACE, M.; CAROTTI, A.; JONES, D. T. Folding in lipid membranes (FILM): a novel method for the prediction of small membrane protein 3D structures. **Proteins**, v. 50, p. 537–545, 2003.

PERTWEE, R. G. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, p. 397–411, 2009.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; FIORINI, J. E.; MOREIRA, M. A.; SCHNEEDORF, J. M. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 1, p. 36-38, 2012.

- PIERRI, C. L.; PARISI, G.; PORCELLI, V. Computational approaches for protein function prediction: a combined strategy from multiple sequence alignment to molecular docking-based virtual screening. **Biochim Biophys Acta**, v.1804, p. 1695–1712, 2010.
- PIMENTA, P.F.P.; SARAIVA, E.M.B.; ROWTON, E.; MODI, G.B.; GARRAWAY, L.A.; BEVERLEY, S.M. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface 121 lipophosphoglycan. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 9155-9159, 1994.
- PINTO, J. E. B. P.; SANTIAGO, E. J. A.; LAMEIRA, O. A. **Compêndio de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE. 2000. 208p.
- PIROVANO, W.; FEENSTRA, K.A.; HERINGA, J. PRALINETM: a strategy for improved multiple alignment of transmembrane proteins. **Bioinformatics**, v. 24, 4, p. 492–497, 2008.
- PRATES, F. V., DOURADO, M. E., SILVA, S. C., SCHRIEFER, A., GUIMARÃES, L. H., BRITO, M. D. Fluconazole in the treatment of cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*: a randomized controlled trial. **Clinical Infectious Diseases**, 64, 67-71, 2017.
- RAIES, A. B.; BAJIC, V. B. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. Wiley Interdiscip. **Computational Molecular Science**, v. 6, p. 147–172, 2016.
- RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; DE ANDRADE JR, H.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaníase: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, p. 550-555, 2003.
- RIO GRANDE DO SUL. **Boletim Epidemiológico Núcleo Hospitalar de Epidemiologia HNCS**: Leishmaniose visceral, Primeiro caso autóctone no Rio Grande do Sul. Boletim Epidemiológico, São Borja, RS: Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul, 2009, 16pp.
- ROCHA, A. A. **Subsidio técnico para elaboração do plano de manejo de copaíba (*Copaifera spp.*)**. Acre: Safe, 2001.
- RODRIGUES, A. C. M.; MELO, L. M.; MAGALHÃES, R. D.; MORAES, N. B.; SOUZA-JÚNIOR, A. D.; BEVILAQUA, C. M. L. Molecular identification of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) as a potential vector for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Veterinary Parasitology**, v. 220, p.28–32, 2016.
- RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; ACCIOLY, M. P.; MORAIS, S. M.; DE ANDRADE JR., H. F.; CARVALHO, C. A.; LIMA, J. C.; MAGALHÃES, H. C. R. *In vitro*

efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against a *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 185-191, 2012.

ROY A., KUCUKURAL A., ZHANG Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v. 5, p. 725–738, 2010.

SAHIN, F., GÜLLÜCE, M., DAFERERA, D., SÖKMEN, A., SÖKMEN, M., POLISSIOU, M. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* spp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v.1, p. 549-557, 2004.

SANCHITA, D.; SAGNIK, G.; SHYAM, S.; CHANDRIMA, S. *Leishmania donovani* Tryparedoxin Peroxidases: functional involvement during infection and drug treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 2, p. 00806-17, 2017.

SANDEEP, K.; SUNIL K. K. T.; SUDHEER, B.; VARMA M., M. Liposomal drug delivery system - A Comprehensive Review. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 5, p. 62-75, 2013.

SANTOS, A, O; COSTA, M, A; UEDA-NAKAMURA, T; DIAS-FILHO, B, P; VEIGA-JÚNIOR, V, F; LIMA, M, M, S; NAKAMURA, C, V. *Leishmania amazonensis*: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 145–151, 2011.

SANTOS A.O., UEDA-NAKAMURA T., DIAS-FILHO B.P., VEIGA-JR V. F., NAKAMURA C. V. Copaiba oil: an alternative to development of new drugs against leishmaniasis. **Evid. Based Complement Alternat. Med.**, v. 2, p. 898419, 2012.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R.L.; SCHLOMAI, J. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sand fly vector and implement parasite transmission by bite. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 89, p. 9944-9948, 1992.

SEGALL, M. D. ; BARBER, C. Addressing toxicity risk when designing and selecting compounds in early drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 19, p. 688–693, 2014.

SHARIEF, A. H., GASIM KHALIL, E.A., THEANDER, T.G., KHARAZMI, A., OMER, S.A., IBRAHIM, M. E. *Leishmania donovani*: An in vitro study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. **Experimental Parasitology**, v.114, p. 247-52, 2006.

SHARMA, G.; KAR, S.; BALL, W. B.; GHOSH, K.; DAS, P. K. The curative effect of fucoidan on visceral leishmaniasis is mediated by activation of MAP kinases through specific protein kinase C isoforms. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 11, n. 3, p. 263–274, 2014.

SHEN, J.; CHENG, F.; XU, Y., LI, W. ; TANG, Y. Estimation of ADME properties with substructure pattern recognition. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, p. 1034–1041, 2010.

SHERMAN, W.; DAY, T.; JACOBSON, M. P.; FRIESNER, R. A. ; FARID, R. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 534–553, 2005.

SHIMIZU, M., SHOGAWA, H., MATSUZAWA, T., YONEZAWA, S., HAYASHI, T., ARISAWA, M. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. IV. Constituents and anti-inflammatory effect of Paraguayan crude drug "Alhucema" (*Lavandula latifolia* Vill.). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p. 2283–2284, 1990.

SILVA, I. G., ZANON, V. O. M., SILVA H. H. G 2003. Larvicidal activity of *Copaifera reticulata* Ducke oil-resin against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 729–732, 2003.

SIMONS, K. T.; BONNEAU, R.; RUCZINSKI, I.; BAKER, D. Ab initio protein structure prediction of CASP III targets using ROSETTA. **Proteins**, v. 3, p. 171–176, 1999.

SINGH, K., ALI, V., PRATAP SINGH, K., GUPTA, P., SUMAN, S., GHOSH, A. K., BIMAL, S., PANDEY, K., DAS, P. Deciphering the interplay between cysteine synthase and thiol cascade proteins in modulating Amphotericin B resistance and survival. **Redox Biology**, v. 12, p. 350–366, 2017.

SINGH, O. P.; HASKER, E.; SACKS, D.; BOELAERT, M.; SUNDAR, S. Asymptomatic Leishmania Infection: A New Challenge for Leishmania Control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, p. 424–9. 2014.

SINGH, O.; STOBBER, C.; SINGH, A.; BLACKWELL, J.; SUNDAR, S. Cytokine responses to novel antigens in an Indian population living in an area endemic for visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n.10, p. 1874–1884, 2012.

SINHA, U.; BUI, A.; TAIRA, R.; DIONISIO, J.; MORIOKA, C. A review of medical imaging informatics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 980, p.168–97, 2002.

SOARES, D. C.; PORTELLA, N. A.; RAMOS, M. F. D. S.; SIANI, A. C.; SARAIVA, E. M. Trans- β -caryophyllene: An effective antileishmanial compound found in commercial

copaiba Oil (*Copaifera* spp.), **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 761-323, 2013.

STAMM, M.; STARITZBICHLER, R.; KHAFIZOV, K.; FORREST, L. R. AlignMe—a membrane protein sequence alignment web server. **Nucleic Acids Res**, v. 42, p. W246–W251, 2014.

STEINERT, P.; DITTMAR, K.; KALISZ, H. M.; MONTEMARTINI, M.; NOGOCEKE, E. Cytoplasmic localization of the trypanothione peroxidase system in *Crithidia fasciculata*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 844–849, 1999.

SUNDAR, S. Visceral leishmaniasis. **Tropical parasitology**, v. 5, p. 83-85, 2015.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.14, n. 1, p. 53-63, 2013.

SUNDAR, S.; PAI, K.; SAHU, M. Immunochromatographic strip test detection of anti K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. **Annals Tropical Medical Parasitology**, v. 96, p.19- 23, 2002.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; RAI, M.; PRAJAPATI, V. K.; SINGH, A. K.; OSTYN, B.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J. C.; CHAKRAVARTY, J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 543-50, 2012.

SZKLARCZYK, D., MORRIS, J. H., COOK, H. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. 362-368, 2017.

TAN, J. J.; CONG, X. J.; HU, L. M.; WANG, C. X.; JIA, L. ; LIANG, X. J. Therapeutic strategies underpinning the development of novel techniques for the treatment of HIV infection. **Drug Discovery Today**, v.15, p. 186–197, 2010.

TAO, L.; ZHANG, P.; QIN, C.; CHEN, S. Y.; ZHANG, C.; CHEN, Z.; ZHU, F.; YANG, S. Y.; WEI, Y. Q.; CHEN, Y. Z. Recent progresses in the exploration of machine learning methods as in-silico ADME prediction tools. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 86, p. 83-100, 2015.

TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, 2004.

TETAUD, E.; GIROUD, C.; PRESCOTT, A. R.; PARKIN, D. W.; BALTZ, D. Molecular characterisation of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent tryparedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 116, p. 171–183, 2001.

TRAINOR, G. L. The importance of plasma protein binding in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2, p. 51–64, 2007.

TREVAN, J. W. The error of determination of toxicity, **Proceedings of the Royal Society**, v. 101, p. 483–514, 1972.

ULLAH, N., NADHMAN, A., SIDDIQ, S., MEHWISH, S., ISLAM, A., JAFRI, L., HAMAYUN, M. Plants as Antileishmanial Agents: Current Scenario. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 1905–1925, 2016.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaífera* L. **Química Nova**, n. 25, p. 273, 2002.

VILA-NOVA, N. S., MORAIS, S. M., FALCÃO, M. J., ALCANTARA, T. T., FERREIRA, P. A., CAVALCANTI, E. S., VIEIRA, I. G., CAMPELLO, C. C., WILSON, M. Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corossolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. **Experimental Parasitology**, v.133, p. 334-8, 2013.

VILA-NOVA, N. S.; BEVILAQUA, C. M. L.; COSTA, I. R. F.; FALCÃO, M. J. C.; MORAIS, S. M.; BRASIL, N. V. G. P. S.; ANDRADE JÚNIOR, H. F.; MACHADO, L. K. A. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two *Annonacea* species cultivated in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 567-571, 2011.

WANG, Y.; XING, J.; XU, Y.; ZHOU, N.; PENG, J.; XIONG, Z.; LIU, X.; LUO, X.; LUO, C.; CHEN, K.; In silico ADME/T modelling for rational drug design. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 48, p. 488–515, 2015.

WEBB, B.; SALI, A. Current protocols in bioinformatics. John Wiley ; Sons; 2014. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 8, 47, p. 5.6.1-32, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Accelerated plan for Kala-azar elimination 2017**. [S.l.]: WHO, 2017. 94p.

WILKINSON, S. R., HORN, D., PRATHALINGAM, S. R., KELLY, J. M. RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the African trypanosome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 31640–31646, 2003.

WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J.; TAYLOR, M. C.; BROMLEY, E. V.; MILES, M. A. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 17062–17071, 2002.

WORLD HEALTH STATISTICS. Monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization, 2017.

XIANG, M. L.; CAO, Y.; FAN, W. J.; CHEN, L. J. ; MO, Y. R. Computer-aided drug design: lead discovery and optimization. **Combinatorial Chemistry ; High Throughput Screening**, v. 15, p. 328–337, 2012.

XU, J.; LI, M.; KIM, D.; XU, Y. RAPTOR: optimal protein threading by linear programming. **Journal of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 1, p. 95–117, 2003.

XU, Y.; XU, D.; LIANG, J. Computational methods for protein structure prediction and modeling. **Springer**, 2007. p. 65–108, 2007.

ZHANG, L.; AI, H.; CHEN, W.; YIN, Z.; HU, H.; ZHU, J.; ZHAO, J.; ZHAO, Q.; LIU, H. CarcinoPred-EL: Novel models for predicting the carcinogenicity of chemicals using molecular fingerprints and ensemble learning methods, **Scientific reports**, v. 7, 1, p. 2118, 2017.

ZHANG, M.; ADLER, M. W.; ABOOD, M. E.; GANEA, D.; JALLO, J. ; TUMA, R. F. CB2 receptor activation attenuates microcirculatory dysfunction during cerebral ischemic/reperfusion injury. **Microvascular Research**, 78, 86–94, 2009.

ZHANG, M.; MARTIN, B. R.; ADLER, M. W.; RAZDAN, R. K.; GANEA, D. ; TUMA, R. F. Modulation of the balance between cannabinoid CB(1) and CB(2) receptor activation during cerebral ischemic/reperfusion injury. **Neurosci**, v. 152, p. 753–760, 2008.

ZHENG, M.; LUO, X.; SHEN, Q.; WANG, Y.; DU, Y.; ZHU, W. ; JIANG, H. Site of metabolism prediction for six biotransformations mediated by cytochromes P450. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1251–1258, 2009.

ZHOU, H. Skolnick J. Protein structure prediction by pro-sp3-TASSER. **Biophysical Journal**, v. 96, 6, p. 2119–2127, 2009.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado CEUA/UECE

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ	Comissão de Ética para o Uso de Animais Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Itaperi CEP 60740-903 – fone 3101-9890 ceua.uece@uece.br – www.uece.br/ceua	 GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação
---	---	--

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito in vivo do fitoterápico *Copaifera reticulata* sobre camundongos Balb/C infectados com *Leishmania infantum* a partir da análise da carga parasitária pela PCR em tempo real" registrado sob o número 2683033/2017, tendo como pesquisador principal Cláudia Maria Leal Bevilaqua está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE). Este certificado expira-se em 21 de junho de 2019.

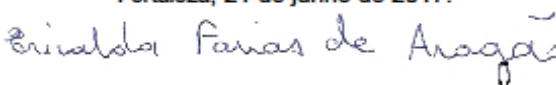
CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled "Efeito in vivo do fitoterápico *Copaifera reticulata* sobre camundongos Balb/C infectados com *Leishmania infantum* a partir da análise da carga parasitária pela PCR em tempo real" registered with the protocol 2683033/2017, under the supervision of Cláudia Maria Leal Bevilaqua is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE). This certificate will expire on June 21st, 2019.

RESUMO

Vigência do projeto	2017
Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico swiss / Isogênico Balb/C
Número de animais	80
Peso/idade	20 a 30g / 2 a 3 semanas
Sexo	50 Feminino / 30 Masculino
Origem	Biotério de produção do Nubex - Núcleo de Biologia Experimental da Universidade de Fortaleza - Unifor

Fortaleza, 21 de junho de 2017.



Maria Erivalda Farias de Aragão
 Presidente CEUA-UECE



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO CEARÁ

Comissão de Ética para o Uso de
Animais
Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Itaperi
CEP 60740-903 – fone 3101-9890
ceua.uece@uece.br – www.uece.br/ceua



GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Departamento de Ciência, Tecnologia
e Inovação Superior

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito in vivo do fitoterápico *Copaifera reticulata* sobre camundongos Balb/C infectados com *Leishmania infantum* a partir da análise da carga parasitária pela PCR em tempo real" registrado sob o número 2683033/2017, tendo como pesquisador principal Cláudia Maria Leal Bevilaqua está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE). Este certificado expira-se em 21 de junho de 2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled "Efeito in vivo do fitoterápico *Copaifera reticulata* sobre camundongos Balb/C infectados com *Leishmania infantum* a partir da análise da carga parasitária pela PCR em tempo real" registered with the protocol 2683033/2017, under the supervision of Cláudia Maria Leal Bevilaqua is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE). This certificate will expire on June 21st, 2019.

RESUMO

Vigência do projeto	2017
Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico swiss / Isogênico Balb/C
Número de animais	80
Peso/idade	20 a 30g / 2 a 3 semanas
Sexo	50 Feminino / 30 Masculino
Origem	Biotério da UFC

Fortaleza, 21 de junho de 2017.

Erivalda Farias de Aragão

Maria Erivalda Farias de Aragão
Presidente CEUA-UECE

ANEXO B - Material suplementar - Artigo.

Figure 1 - Calculation of β -caryophyllene LD50 by the Protox server.

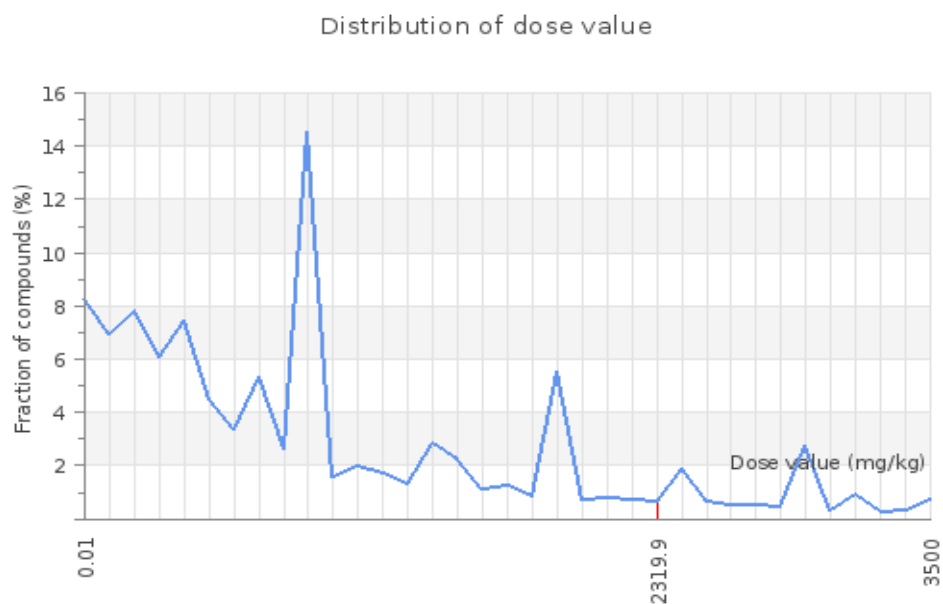


Figure 2 - Characterization of the molecular weight distribution of β -caryophyllene by the Protox server.

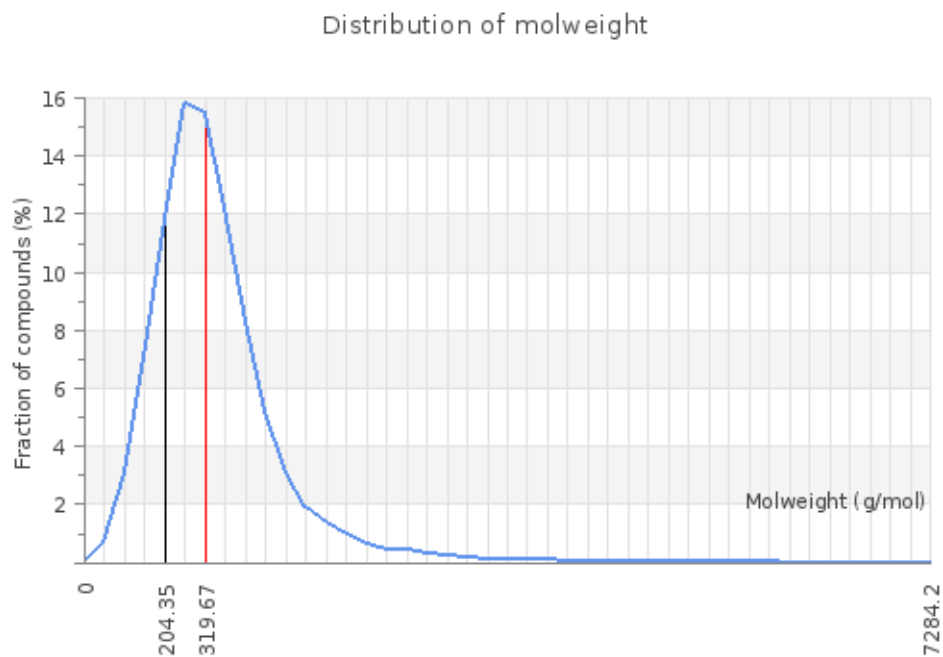


Figure 3 - Ramachadram graph characterizing the black residues in the acceptable region and orange in the allowed regions before the refinement of the MODELLER loopings.

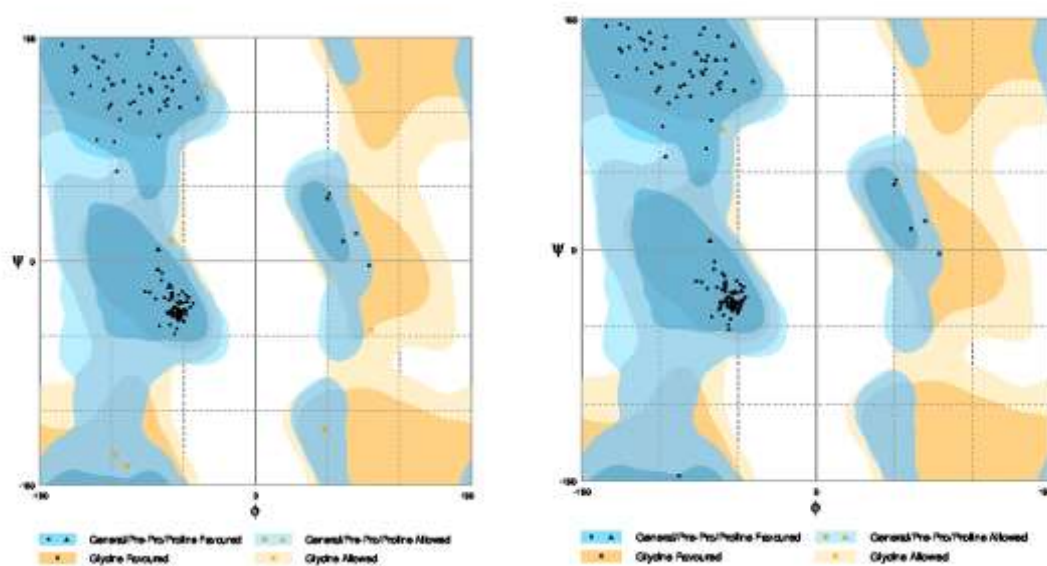


Figure 4 - Disposal of the wastes after *in silico* compaction.

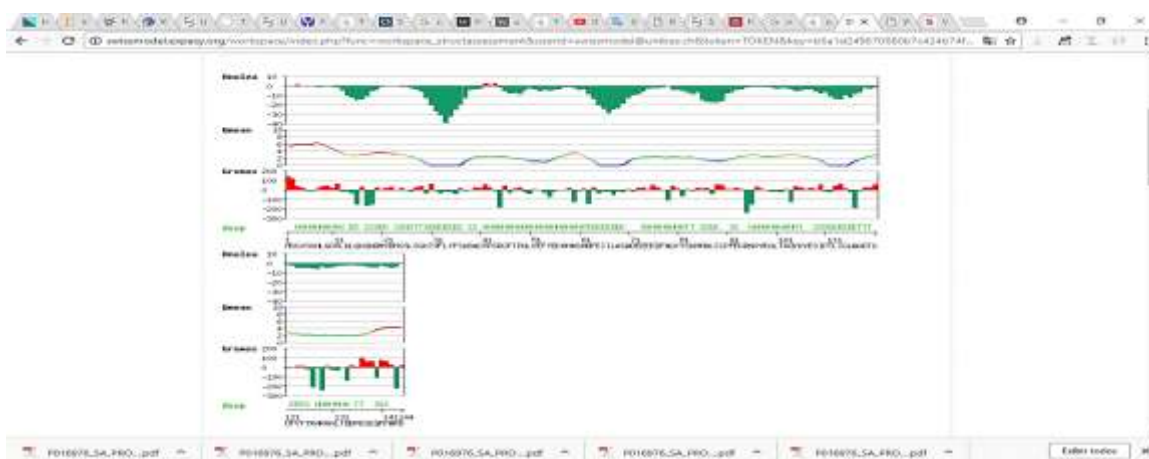


Figure 5 - Absolute quality analysis of model obtained from modeling.

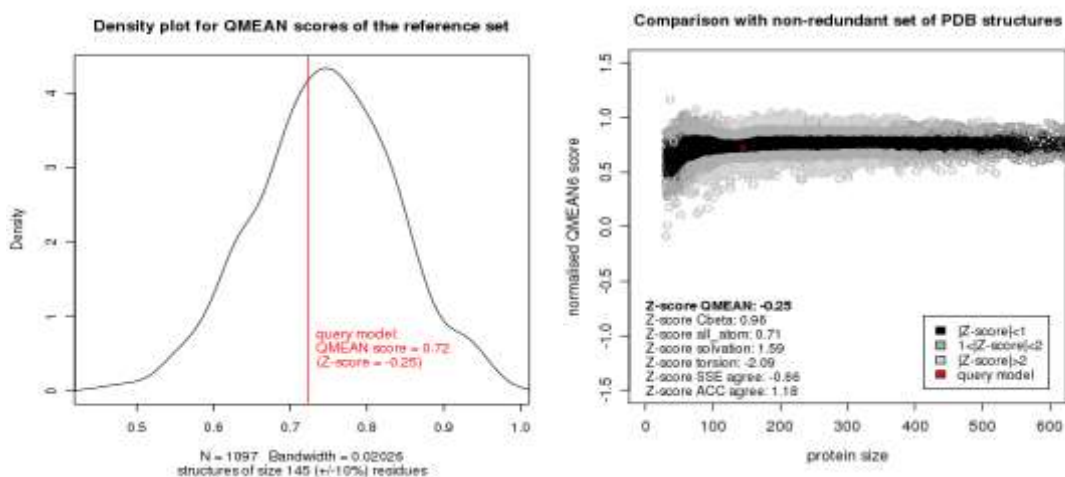


Figure 6 - Characterization of the formation of HAIRPINS in protein *LtTXN-I*.

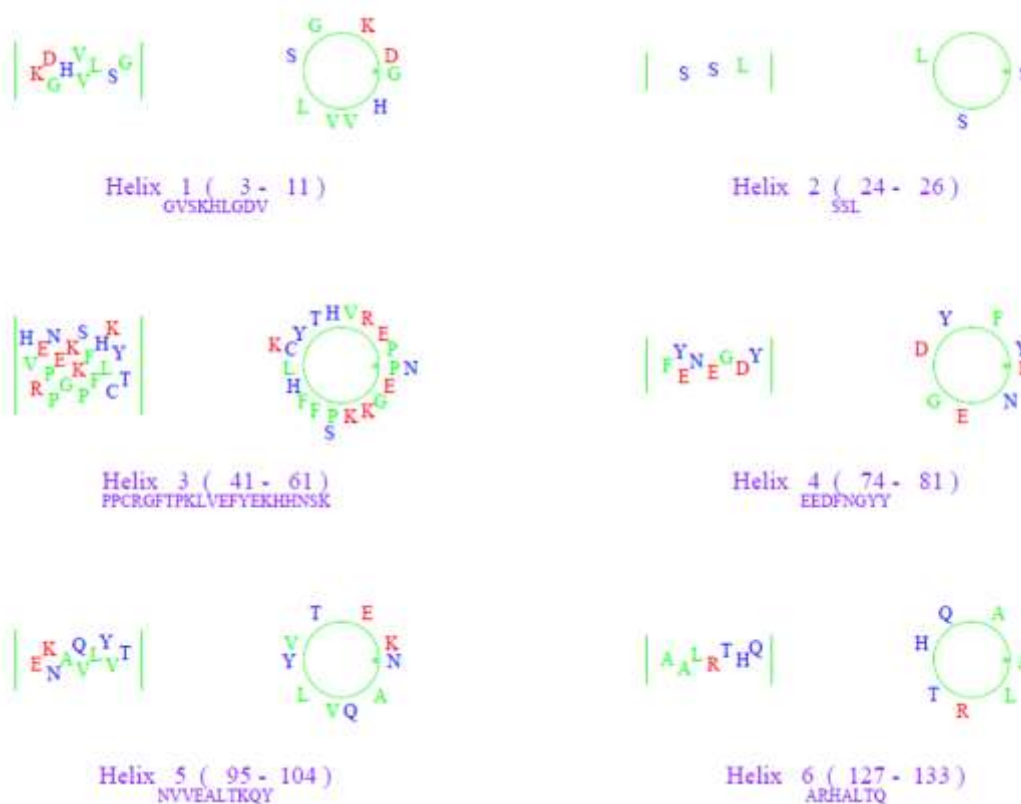


Figure 7- Characterization of the HELICES formation in the protein *L/TXN-I*.

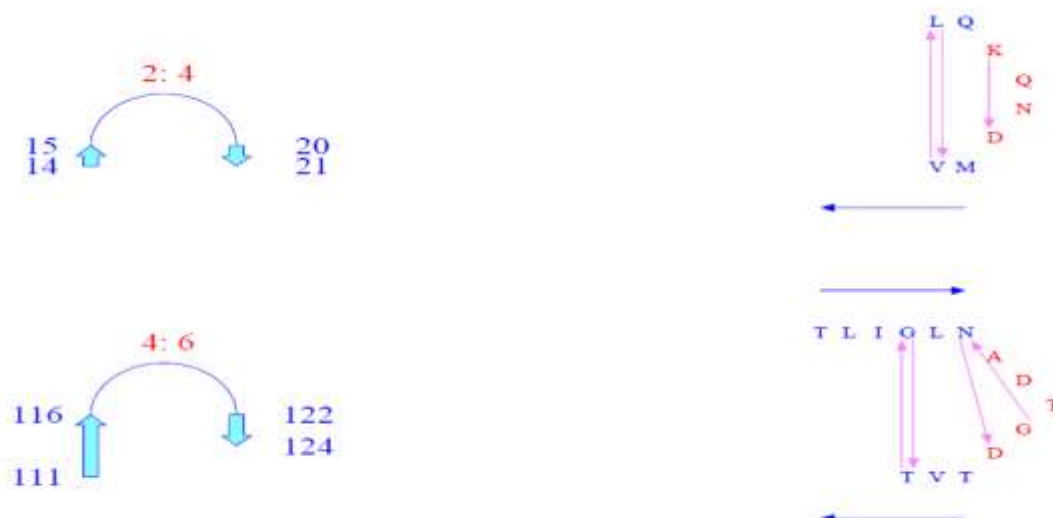


Figure 8 - Protuberances study created in the model *L/TXN-I*

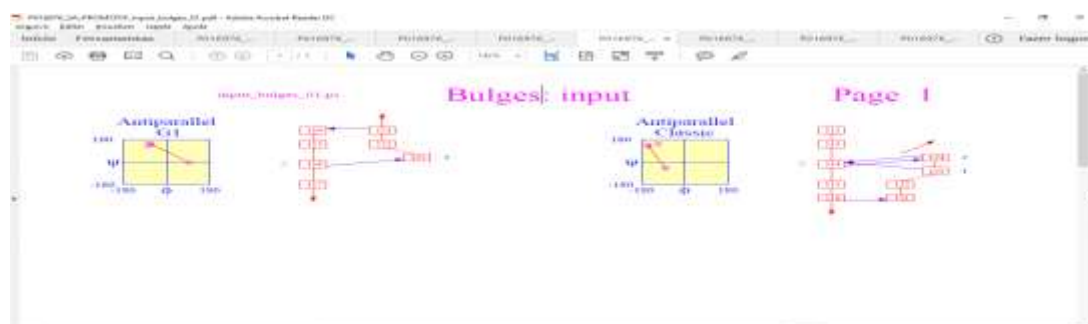


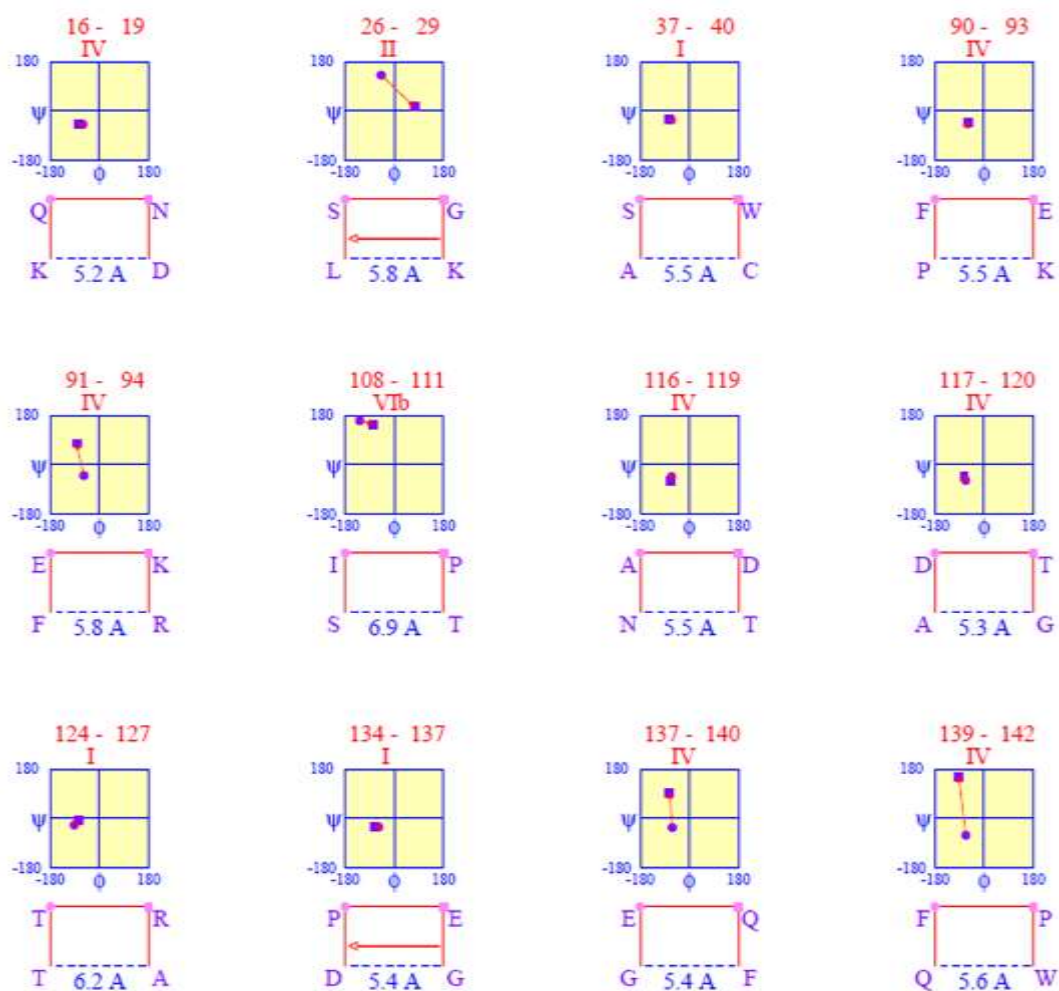
Figure 9 - Characterization of beta regions in protein *L*/TXN -I.

Table 1 - Identification of the residues with their respective sequences that are part of the beta regions.

Residue numbers	Sequence	Turn Type	(i+1)		(i+2)		ϕ ψ Region	Chi1 (i+1)	Chi1 (i+2)	i to i+3 Distance
			ϕ	ψ	ϕ	ψ				
16 - 19	KQND	IV	-60.3	-49.6	-74.5	-46.7	AA	-68.2	60.2	5.2
26 - 29	LSGK	II	-48.4	130.7	73.0	16.1	PG	-61.3	-	5.8
37 - 40	ASWC	I	-65.7	-33.4	-72.4	-31.4	AA	-55.9	53.9	5.5
90 - 93	PFEK	IV	-60.2	-46.5	-56.8	-40.6	AA	175.5	-74.4	5.5
91 - 94	FEKR	IV	-56.8	-40.6	-84.2	78.5	AP	-74.4	-71.6	5.8
108 - 111	SIPT	VIb	-127.0	160.7	-76.8	148.0	BP	63.3	19.2	6.9
116 - 119	NADT	IV	-64.8	-43.6	-67.4	-58.4	AA	-	-67.1	5.5
117 - 120	ADTG	IV	-67.4	-58.4	-72.8	-42.1	AA	-67.1	61.8	5.3
124 - 127	TTRA	I	-91.9	-24.7	-78.0	-9.5	AA	61.8	-171.9	6.2
134 - 137	DPEG	I	-57.4	-31.8	-70.2	-30.4	AA	29.4	56.5	5.4
137 - 140	GEQF	IV	-61.9	-33.8	-72.3	93.4	AP	-65.7	-60.7	5.4
139 - 142	QFPW	IV	-66.8	-62.2	-91.9	153.3	AP	-157.6	-23.7	5.6

Figure 10 - Analysis of protein stereochemistry LITXN -I.

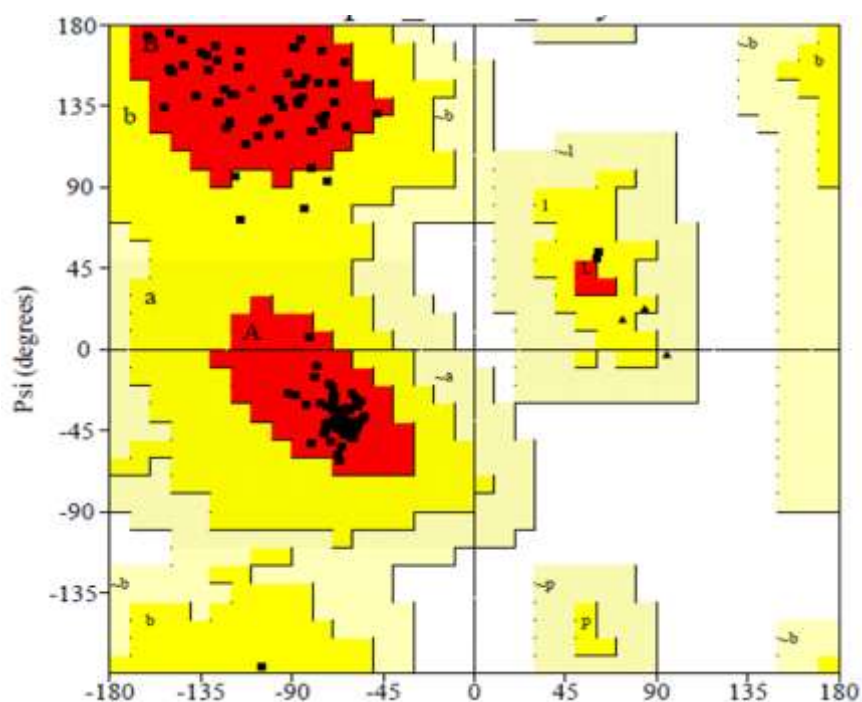


Figure 11 - Geometric quality of the residues of the main chain of the protein

*L*iTXN -I.

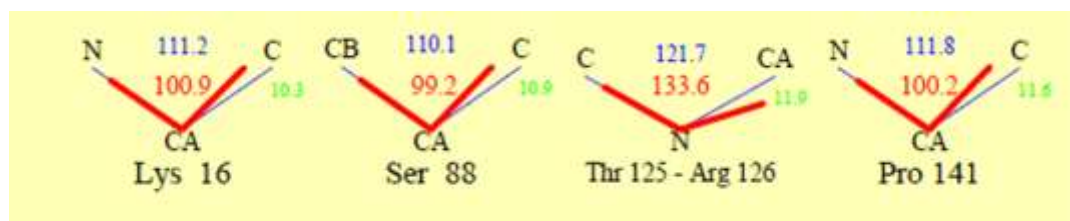
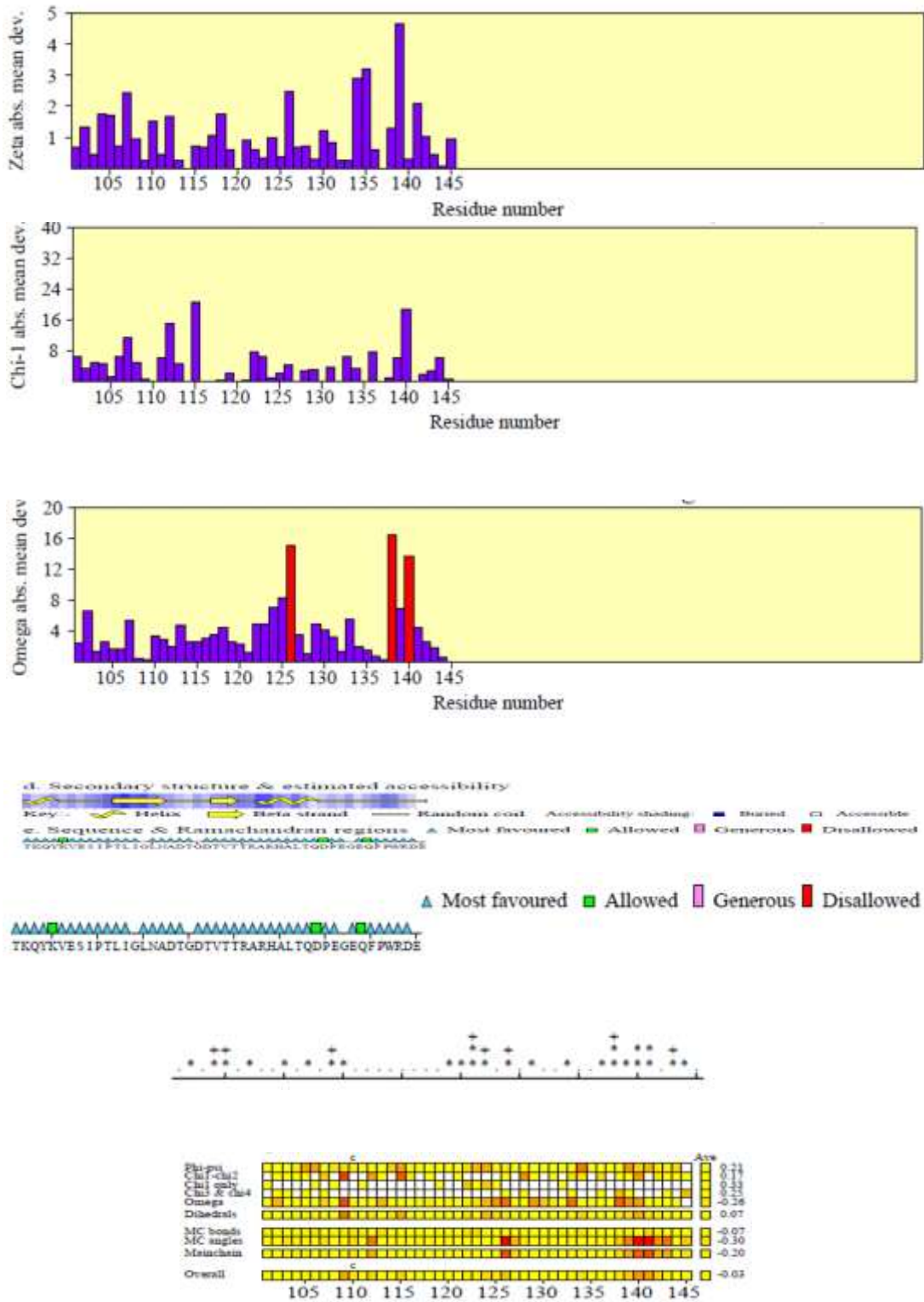


Figure 12 - Characterization of the residues in the favorable regions of the protein
*L*iTXN-





```

Position      2      12      22      32      42      52      62      72
PB            zmmmmmmmpccdehjbcddfklmgopacdddddffklmklmmmmmmmmmmmmmmmmnopaddddfbfbfk
Identity      -SGVAKHLGEALKLRKQADATADNDSLGGKTVFF:PSASWCPCRGPTPLQVLF:EKHHDSKNFEIILASWDEEI
Trx1_1_      MSGVSKHLGDVLKQKQNDMVNSSLGKTVFLVPSASWCPCRGPTPLQVLF:EKHHDSKNFEIILASWDEEI
PB            zklmmmmmpccddffklcdfklmgopacdddddffklmklmmmmmmmmmmmmmmmmnopaddddfbfbfk
Position      1      11      21      31      41      51      61      71

mmmmmmmpcbcdcdffklmmmmmmmmmmmmmmmmnopabdcdddddffklpafbfclmmmmmmmmmmmmmmmmoghigaz
DDFNAYYAKMPWLSIPFANRNTVEALTKKYSVESIPTLIGLNADTGDTVTTRARHALTQDPMGEQFFWRDE
EDFNGYYSKMPWLSIPFEKRNVEALTKQYKVESIPTLIGLNADTGDTVTTRARHALTQDFEGEQFFWRDE
mmmmmmmpcbcdcdffklmmmmmmmmmmmmmmmmnopabacdddddffklpafbfklmmmmmmmmmmmmmmmmmbacdz
Position      82      92      102      112      122      132      142

```