Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro, v.05,2024
ISSN 2178-6925

ESTUDO PREDITIVO DO POTENCIAL ANTI-MICOBACTERIANO E TOXICOLÓGICO DE FOETITIOFENOS

PREDICTIVE STUDY OF THE ANTI-MYCOBACTERIAL AND TOXICOLOGICAL POTENTIAL OF FOETITHIOPHENES

Anthony Barbosa Belarmino
Graduando em Licenciatura Plena em Química,
Universidade Estadual do Ceará, Brasil
E-mail: anthony.barbosa@aluno.uece.br

Caio Henrique Alexandre Roberto
Mestrando em Ciências Naturais,
Universidade Estadual do Ceará, Brasil
E-mail: caio.alexandre@aluno.uece.br

Victor Moreira de Oliveira
Mestrando em Ciências Naturais,
Universidade Estadual do Ceará, Brasil
E-mail: vitor.moreira@aluno.uece.br

Gabrielle Silva Marinho
Doutora em Educação,
Faculdade de Educação, Ciências e Letras de Iguatu, Brasil
E-mail: gabrielle.marinho@uece.br

Resumo

As micobactérias são microorganismos do gênero *Mycobacterium*, pertencentes ao filo *Actinobacteria* que possuem formato bacilar e ácidos micólicos em suas paredes celulares. Responsáveis por doenças como tuberculose e hanseníase, essas bactérias mostram alta

ISSN 2178-6925

resistência a medicamentos, demandando o desenvolvimento de novos fármacos com eficácia mais elevada. Estudos recentes destacam os tiofenos, compostos de enxofre que, por seu potencial farmacológico, contribuem para a criação de derivados como os foetitiofenos C-F, que apresentam atividade antimicrobiana. Dessa forma, o estudo objetiva avaliar preditivamente o potencial anti-micobacteriano e a segurança toxicológica dos foetitiofenos C-F. As ferramentas utilizadas para a realização do estudo foram as plataformas pkCSM© e mycoCSM©, que por meio de similaridade estrutural e assinaturas baseadas em gráficos, possibilitaram a predição da atividade anti-micobacteriana. Também foi usada a plataforma GUSAR© para a previsão de doses letais medianas (DL50) em ratos, e o software Graphpad Prism® para a análise estatística. Os resultados indicaram que os foetitiofenos são potenciais anti-micobacterianos, mas ao serem ingeridos podem gerar efeitos prejudiciais à saúde, como o comprometimento do fígado. Perante o exposto, podem ser realizados ensaios *in vitro* para corroborar com os resultados deste estudo e novas análises a respeito do potencial farmacológico dos foetitiofenos C-F para a terapia de outras doenças.
Palavras-chave: Micobactérias; Resistência; Medicamentos; Toxicidade.

Abstract

Mycobacteria are microorganisms of the genus *Mycobacterium*, belonging to the phylum *Actinobacteria*, which have a bacillary shape and mycolic acids in their cell walls. Responsible for diseases such as tuberculosis and leprosy, these bacteria show high drug resistance, requiring the development of new drugs with higher efficacy. Recent studies have highlighted thiophenes, sulfur compounds which, due to their pharmacological potential, have contributed to the creation of derivatives such as C-F foetithiophenes, which have antimicrobial activity. This study aims to predictively evaluate the anti-mycobacterial potential and toxicological safety of C-F foetithiophenes. The tools used to carry out the study were the pkCSM© and mycoCSM© platforms, which, through structural similarity and graph-based signatures, made it possible to predict anti-mycobacterial activity. The GUSAR© platform was also used to predict median lethal doses (LD50) in mice, and GraphPad Prism® software was used for statistical analysis. The results indicated that foetithiophenes are potential anti-mycobacterial agents, but when ingested they can have harmful effects on health, such as impairment of the liver. Given the above, *in vitro* tests could be carried out to corroborate the results of this study and new analyses could be carried out on the pharmacological potential of C-F foetithiophenes for the therapy of other diseases.
Keywords: Mycobacteria; Resistance; Medicines; Toxicity.

ISSN 2178-6925

1. Introdução

O gênero *Mycobacterium* contém cerca de 200 espécies que pertencem ao filo *Actinobacteria* e apresentam em sua estrutura ácidos micólicos presentes na parede celular e formato bacilar. As micobactérias provocam doenças como tuberculose, hanseníase e graves distúrbios pulmonares (LEE et al., 2023).

O tratamento clínico contra as micobactérias varia consoante ao grupo das cepas causadoras da doença, sendo demorado em razão da elevada resistência a medicamentos (SEIDEL et al., 2022). Por consequência, necessita-se de novos fármacos capazes de combater esses microorganismos para a criação de métodos mais eficazes para o tratamento dessas doenças.

Nesse contexto, os tiofenos são uma classe de compostos muito estudados por pesquisadores nos últimos anos, visto que suas estruturas são compostas por moléculas de enxofre que proporcionam uma forte propriedade de retirada de elétrons, estabilidade a reações de hidrólise e propensão a elétrons ao invés de processos radicais. Essas características contribuem para a produção de novos fármacos com atividades biológicas como antiviral, antimicrobiana e antileishmania (IBRAHIM et al., 2022).

Entre os derivados dos tiofenos estão os foetitiofenos C-F, moléculas obtidas a partir das raízes secas da *Ferula foetida* que apresentam atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *B. cereus* (CHITSAZIAN-YAZDI et al., 2015). Assim, esse estudo visa investigar de forma *in silico* o potencial anti-micobacteriano para os compostos foetitiofenos C-F. Além de avaliar a segurança toxicológica das moléculas como medicamentos anti-micobacterianos.

2. Revisão da Literatura

2.1 Estudos *in silico* no desenvolvimento de medicamentos

A produção tradicional de fármacos trata-se de um processo arriscado e demorado, pois consisti em identificar alvos, descobrir e otimizar moléculas, como também realizar estudos pré-clínicos, clínicos e de segurança toxicológica. O período de desenvolvimento até o medicamento estar disponível para o

ISSN 2178-6925

consumidor dura entre 10 a 15 anos e os gastos são próximos a US$ 2,558 bilhões. Além disso, apenas 13% dos medicamentos são aprovados e liberados ao mercado. Esses resultados são consequências da toxicidade, baixa eficácia, fraca absorção, distribuição, metabolismo e excreção (SHAKER et al., 2021).

Neste cenário, os métodos computacionais se tornaram fundamentais no desenvolvimento de fármacos, visto que reduzem riscos, recursos e a relação custo-eficácia. Também são importantes no auxilio dos ensaios experimentais, facilitando a pesquisa e orientando a validação dos estudos. Os procedimentos *in silico* vêm ganhando credibilidade em virtude de sua confiabilidade e exatidão na predição dos resultados das propriedades dos compostos (AGAMAH et al., 2020).

As *quantitative structure-activity relationships* (QSARs) são métodos *in silico* que relacionam matematicamente as conformações das moléculas e suas propriedades de maneira quantitativa. Essas metodologias são essenciais para a elaboração de novos medicamentos devido ao surgimento de bactérias resistentes a antibacterianos. Dessa forma, as QSARs contribuem diminuindo o tempo de desenvolvimento dos fármacos, os custos econômicos e o uso de testes em animais (SUAY-GARCIA et al., 2020).

3. Metodologia

3.1 pkCSM©

O pkCSM© é uma plataforma online utilizada para caracterizar e prever propriedades físico-químicas, farmacológicas e toxicológicas de pequenas moléculas. A previsão é realizada por preditores de cinco classes, sendo elas absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (PIRES; BLUNDELL & ASCHER, 2015).

A ferramenta opera por meio de similaridade estrutural baseada em gráficos que preparam o algoritmo de previsão para codificar a distância entre os átomos (YENI & RACHMANIA, 2022).

ISSN 2178-6925

3.2 mycoCSM©

O mycoCSM© (https://biosig.lab.uq.edu.au/myco_csm/) funciona mediante assinaturas fundamentadas em gráficos para prever compostos anti-micobacterianos. A atividade contra as micobactérias são avaliadas utilizando a concentração inibitória mínima (CIM) < 1 log(μM) (PIRES & ASCHER, 2020). Além disso, a plataforma fornece valores de doses máximas toleradas recomendadas (DMTRs) em log(mg/kg/dia), informando as doses seguras em seres humanos (MEDINA-BARANDICA et al., 2023).

3.3 (GUSAR©) *General Unrestricted Structure-Activity Relationships*

O GUSAR© é uma ferramenta online disponível gratuitamente que realiza a previsão de doses letais medianas (DL50) em ratos. A predição é feita a partir de modelos que relacionam a estrutura e as propriedades de compostos orgânicos em uma análise quantitativa (ASKEROVA, 2023).

Para classificar a toxicidade das moléculas, o GUSAR© utiliza as normas da *Organization of Economic Cooperation and Development* (OECD) (PERVEZ et al., 2021). As estruturas são avaliadas por via oral e classificadas em: classe 1 (DL50 ≤ 5 mg/kg), classe 2 (5 < DL50 ≤ 50 mg/kg), classe 3 (50 < DL50 ≤ 300 mg/kg), classe 4 (300 < DL50 ≤ 2000 mg/kg), classe 5 (DL50 > 2000 mg/kg) e não classificadas (DL50 > 5000 mg/kg) (HAMM et al., 2021).

3.4 Avaliação estatística

O estudo estatístico foi realizado com o software Graphpad Prism® para realizar análise de *one way anova*, identificando diferenças significativas entre as DL50 das vias de administração de medicamentos. Na avaliação as doses foram normalizadas e aplicadas ao teste de múltiplas comparações de Turkey, em que, para identificar uma diferença significativa, o valor de P deve ser < 0,05.

ISSN 2178-6925

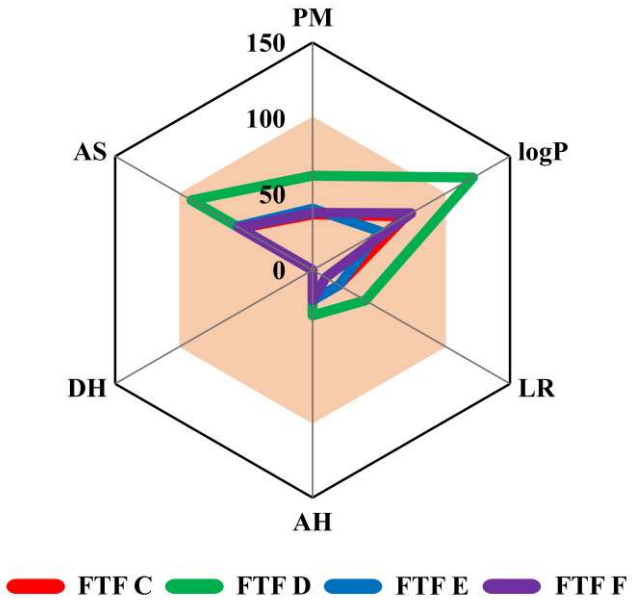
4. Resultados e Discussão

4.1 Atividade anti-micobacteriana

A partir das propriedades físico-químicas, pode-se analisar o potencial anti-micobacteriano ao utilizar como critério a Regra dos Cinco de Lipinski (PIRES & ASCHER, 2020). De acordo com Lipinski, as propriedades são: peso molecular (PM) < 500 g/mol; coeficiente de partição octanol-água (logP) < 5; doadores de hidrogênio (DH) > 5; aceitadores de hidrogênio (AH) > 10. Posteriormente, estudos adicionaram mais dois critérios à regra, são eles: área de superfície (AS) ≤ 140 Å e ligações rotativas (LR) < 10, propriedades que influenciam na permeabilidade e flexibilidade do fármaco (CHEN et al., 2020).

Utilizando essas propriedades, foram construídas a Tabela 1 de propriedades físico-químicas e a Figura 1 com o radar de biodisponibilidade, o qual indica pela cor laranja a região do potencial anti-micobacteriano.

Figura 1. Radar de biodisponibilidade



Fonte: Autores

Notas: PM – Peso molecular; logP – Coeficiente de partição octanol-água; LR – Ligações rotativas; AH – Aceitadores de hidrogênio; DH - Doadores de hidrogênio; AS – Área de superfície.

ISSN 2178-6925

Tabela 1. Propriedades físico-químicas

Compostos	PM (g/mol)	logP	LR	AH	DH	AS (Å)
FTF C	183,345	3,536	2	2	0	77,02
FTF D	310,553	6,093	4	3	0	128,812
FTF E	202,344	2,551	2	2	0	80,271
FTF F	188,361	3,742	1	2	0	78,21

Fonte: Autores

Observando a Figura 1 e a Tabela 1, o FTF D indicado pela cor verde extrapola o limite do logP (6,093), ao mesmo tempo que apresenta AH (3) e DH (0) inferiores à quantidade ideal. Os compostos FTF C, E e F exibidos pelas cores vermelho, azul e roxo, respectivamente, apresentaram resultados idênticos de AH (2) e DH (0). Contudo, esses números de aceptores e doadores estão abaixo do exigido pela Regra dos Cinco. Desta forma, essas moléculas apresentam bom potencial anti-micobacteriano, em virtude da maioria de suas propriedades físico-químicas se enquadrarem na regra de Lipinski. Já a FTF D apresentou moderado potencial anti-micobacteriano, pois metade dos parâmetros não foram atendidos (logP, AH e DH).

Com o potencial anti-micobacteriano dos foetitiofenos aferido, elaborou-se a Tabela 2 com dados sobre os valores CIM fornecidos em log(μM) para diversas cepas de micobactérias e as DMTRs dos potenciais fármacos em humanos.

Ao avaliar a Tabela 2, verifica-se que a CIM do FTF C foi maior contra a *M. phlei* (-3,583), enquanto a menor se sucedeu na *M. tuberculosis* (-4,699). No FTF D, o valor mais elevado encontra-se na *M. intracellulare* (-3,792) e o mais baixo foi na *M. phlei* (-4,946). Logo após, na avaliação do FTF E, a concentração mais elevada ocorreu na *M. avium* (-3,178) e a mais inferior foi na *M. bovis* (-4,979). Por último, no FTF F, o valor mais elevado sucedeu na *M. smegmatis* (-3,689) e o menor aconteceu na *M. tuberculosis* (-4,511). Diante dos resultados apresentados, todos os foetitiofenos exibiram atividade anti-micobacteriana contra as cepas analisadas, visto que, apresentam concentração < 1 log(μM).

ISSN 2178-6925

Tabela 2. Atividade anti-micobacteriana dos foetitiofenos

Compostos	Atividade biológica - CIM log_{10}(µM)								*Caseum* (%)	DMTR log(mg/kg/dia)
	M. avium	***M. bovis***	***M. fortuitum***	***M. intracellulare***	***M. kansasii***	***M. phlei***	***M. smegmatis***	***M. tuberculosis***		
FTF C	-3,888	-4,635	-3,657	-4,153	-4,193	-3,583	-3,671	-4,699	21,337	0,853
FTF D	-3,911	-5,138	-3,812	-3,792	-4,757	-4,946	-4,176	-4,237	4,888	0,986
FTF E	-3,178	-4,979	-3,631	-4,156	-4,189	-3,578	-3,774	-3,938	25,213	0,982
FTF F	-4,4	-4,281	-3,805	-4,262	-4,282	-3,92	-3,689	-4,511	24,24	0,676

Fonte: Autores

Notas: CIM – Concentração inibitória mínima; DMTR – Dose máxima tolerada recomendada.

ISSN 2178-6925

Ainda na Tabela 2, além da análise da CIM para avaliar a atividade contra a *M. tuberculosis*, utiliza-se também a fração não ligada ao *caseum* (%, visando indicar a distribuição do composto no núcleo caseoso e uma melhor eficácia contra a micobactéria (SARATHY & DARTOIS, 2020). A molécula com a menor fração não ligada foi o FTF D, com 4,888%, sinalizando uma ótima eficiência contra a *M. tuberculosis*. Já o FTF E apresentou a maior fração, equivalente a 25,213% e indicando efetividade contra a cepa. Em complemento, as DMTRs apresentadas pelos foetitiofenos foram consideravelmente baixas, onde a maior dose exibida foi do FTF D de 0,986 log(mg/kg/dia). Caso essas doses sejam excedidas, os compostos podem gerar efeitos toxicológicos em seres humanos.

4.2 Segurança toxicológica

Os ratos são animais muito utilizados na investigação da eficiência de medicamentos e na avaliação de toxicidade dos fármacos, em virtude do seu metabolismo semelhante com os seres humanos, período de gestação reduzido e vida curta (GAD, 2019). Diante disso, produziu-se a Tabela 3 em que é avaliada a DL50 por via intraperitonial (IP), intravenosa (IV), oral e subcutânea (SC) dos foetitiofenos em ratos, para analisar a segurança desses compostos como possíveis medicamentos.

Tabela 3. Doses letais administradas em diferentes vias

	DL_{50} (mg/kg)				
Compostos	**IP**	**IV**	**Oral**	**Classe tóxica**	**SC**
FTF C	183,9	75	1.235	4	220,7
FTF D	435,8	76,96	1.126	4	575,5
FTF E	86,85	144,9	1.083	4	264
FTF F	283,2	54,84	1.908	4	381,3

Fonte: Autores

Notas: DL_{50} - Dose letal 50%; IP – Intraperitonial; IV – Intravenosa; SC - Subcutânea

Avaliando a Tabela 3, na via IP, as doses variaram entre 86,85 (FTF E) e 435,8 mg/kg (FTF D). Os menores valores de DL50 foram observados pela

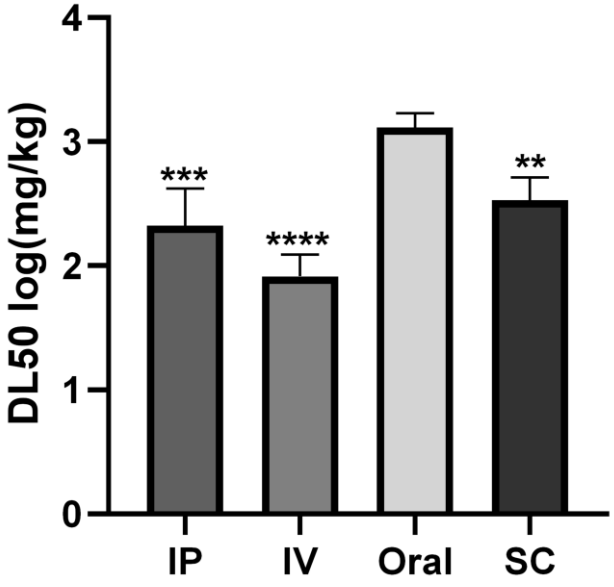
ISSN 2178-6925

administração IV, enquanto o FTF F apresentou o menor valor com 54,84 mg/kg, o FTF E denotou o maior com 144,9 mg/kg. Na via SC, a dose letal mais baixa foi apresentada pelo FTF C, tendo resultado igual a 264 mg/kg, já a DL50 mais elevada foi exibida pelo FTF D com 575,5 mg/kg. Pela administração oral, as moléculas apresentaram doses elevadas, variando entre 1.083 (FTF E) e 1.908 mg/kg (FTF F). Os resultados da via oral indicaram que os compostos são prejudiciais quando ingeridos, por estarem inseridos na classe 4, que possui um intervalo entre 300 a 2.000 mg/kg (MUSLIKH et al., 2022). Portanto, pode-se inferir que os foetitiofenos pela via oral excederam os valores previstos das DMTRs.

A ingestão desses possíveis anti-micobacterianos pode acarretar biotransformação e a formação de metabólitos mais tóxicos que os compostos majoritários. Desse modo, prejudicando o fígado, órgão responsável pela biotransformação de xenobióticos (BERETTA, 2020).

Em vista disso, como a via oral é a principal rota de administração de medicamentos, foi elaborada a Figura 2, onde é ilustrado o log da DL50 dos foetitiofenos nas vias já analisadas (IP, IV, oral e SC) para identificar se há diferenças significativas entre essas rotas.

Figura 2. Gráfico da média da DL50 das rotas de administração



Fonte: Autores

Nota: * - Diferença significativa entre as rotas.

Ao visualizar a Figura 2, nota-se que a IV é a via com menor média no gráfico, enquanto a oral possui a média mais elevada. Estas vias apresentaram diferenças significativas em relação às outras, isso é evidenciado pelo descritor estatístico P que apresentou valor < 0,0001. As rotas que manifestaram diferença foram a IP, IV e SC em relação à oral, e também a SC com a IV.

5. Conclusão

Em síntese, os foetitiofenos C-F apresentaram atividade anti-micobacteriana para todas as cepas avaliadas. Além disso, as moléculas no ensaio de toxicidade mostraram ser fármacos prejudiciais quando ingeridos. Diante do exposto, o estudo pode ser complementado com análises *in vitro* para respaldar os resultados apresentados e novas pesquisas sobre a atividade farmacológica dos foetitiofenos C-F, a fim de contribuir no tratamento de outras doenças.

Referências

AGAMAH, Francis E. et al. Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. **Briefings in bioinformatics**, v. 21, n. 5, p. 1663-1675, 2020. Disponível em: <https://l1nq.com/CzgRK>. Acesso em 13 de maio de 2024.

ASKEROVA, Ulviyya F. Prediction of acute toxicity for (Z)-3-(2-phenylhydrazinylidene) benzofuran-2 (3H)-one and its derivatives for rats using GUSAR program. **New Materials, Compounds and Applications**, v. 7, n. 1, p. 50-56, 2023. Disponível em: <https://acesse.dev/mzWbM>. Acesso em 13 de maio de 2024.

BERETTA, Eduardo Morais. **Efeitos do inseticida Diazinon em células de Hepatocarcinoma humano (HepG2)**. 2020. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas. 41 p. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-217815>. Acesso em 13 de maio de 2024.

CHEN, Xiaoxia et al. Analysis of the physicochemical properties of acaricides based on Lipinski's rule of five. **Journal of computational biology**, v. 27, n. 9, p. 1-10, 2020. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/cmb.2019.0323 >. Acesso em 13 de maio de 2024.

CHITSAZIAN-YAZDI, Mahsa et al. Foetithiophenes CF, thiophene derivatives from the roots of Ferula foetida. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 5, p. 710-714, 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2014.939765>. Acesso em 13 de maio de 2024.

GAD, Shayne C. Rodent models for toxicity testing and biomarkers. In: **Biomarkers in toxicology**. Academic Press, 2019. p. 7-73. Disponível em: <https://l1nq.com/fQCrU>. Acesso em 15 de maio de 2024.

HAMM, Jon et al. Performance of the GHS mixtures equation for predicting acute oral toxicity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 125, p. 1-8, 2021. Disponível em: <https://encr.pw/BouDp>. Acesso em 15 de maio de 2024.

IBRAHIM, Sabrin R. M. et al. Thiophenes—naturally occurring plant metabolites: Biological activities and in silico evaluation of their potential as cathepsin D inhibitors. **Plants**, v. 11, n. 4, p. 1-64, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/4/539>. Acesso em 15 de maio de 2024.

LEE, Duhyung et al. Phylogenetic distribution of malonate semialdehyde decarboxylase (MSAD) genes among strains within the genus Mycobacterium: evidence of MSAD gene loss in the evolution of pathogenic mycobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1-14, 2023. Disponível em: <https://acesse.dev/84CSk>. Acesso em 15 de maio de 2024.

MEDINA-BARANDICA, Jeffry et al. In-silico study for the identification of potential destabilizers between the spike protein of SARS-CoV-2 and human ACE-2. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 40, p. 1-8, 2023. Disponível em: <https://acesse.dev/GQ2jG>. Acesso em 15 de maio de 2024.

MUSLIKH, Faisal Akhmal et al. In Silico Molecular Docking and ADMET Analysis for Drug Development of Phytoestrogens Compound with Its Evaluation of Neurodegenerative Diseases. **Borneo Journal of Pharmacy**, v. 5, n. 4, p. 357-366, 2022. Disponível em: <https://l1nq.com/bjdH4>. Acesso em 15 de maio de 2024.

PERVEZ Muniba et al. A short communication on inhibitory agents against SARS-CoV2: virtual screening and drug repurposing studies. ChemRxiv. 2021. Disponível em: <https://encr.pw/m4ta2>. Acesso em 15 de maio de 2024.

PIRES, Douglas E. V.; ASCHER, David B. mycoCSM: using graph-based signatures to identify safe potent hits against mycobacteria. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 7, p. 3450-3456, 2020. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jcim.0c00362>.

Acesso em 18 de maio de 2024.

PIRES, Douglas EV; BLUNDELL, Tom L.; ASCHER, David B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>. Acesso em 18 de maio de 2024.

SARATHY, Jansy P.; DARTOIS, Véronique. Caseum: a niche for Mycobacterium tuberculosis drug-tolerant persisters. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 3, p. 1-19, 2020. Disponível em: <https://acesse.dev/NsMI2>. Acesso em 18 de maio de 2024.

SEIDEL, Angélica et al. Skin infection by Mycobacterium marinum-diagnostic and therapeutic challenge. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, n. 3, p. 366-368, 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/534SPcHHNk5CcGgLJ9Tfzrq/>. Acesso em 18 de maio de 2024.

SHAKER, Bilal et al. In silico methods and tools for drug discovery. **Computers in biology and medicine**, v. 137, p. 1-15, 2021. Disponível em: <https://encurtador.com.br/XQwN9>. Acesso em 16 de maio de 2024.

SUAY-GARCIA, Beatriz et al. Quantitative structure–activity relationship methods in the discovery and development of antibacterials. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 10, n. 6, p. 1-13, 2020. Disponível em: <https://encurtador.com.br/5iQBS>. Acesso em 16 de maio de 2024.

YENI, Yeni; RACHMANIA, Rizky Arcinthya. The prediction of pharmacokinetic properties of compounds in Hemigraphis alternate (Burm. F.) t. ander leaves using pkCSM. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 1081-1089, 2022. Disponível em: <https://journal.ugm.ac.id/ijc/article/view/73117>. Acesso em 16 de maio de 2024.