Investigação *in silico* de compostos bioativos de *Croton linearifolius* Müll.Arg com atividade antidepressiva

In silico investigation of bioactive compounds of *Croton linearifolius* Müll.Arg with antidepressant activity

Gabriel Guimarães Tavares¹, Suzana Ferreira Alves^{1,2}, Leonardo Luiz Borges^{1,3}

¹ Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás

² Faculdades Objetivo – IUESO

³ Universidade Estadual de Goiás – UEG

Resumo

A depressão está entre as maiores causas de incapacidade em todo o mundo. Portanto, a busca de inovações terapêuticas é necessária e, neste contexto, os estudos *in silico* constituem uma ferramenta fundamental para o desenvolvimento de novos medicamentos de maneira mais rápida e ampla. No presente trabalho investigou-se moléculas selecionadas nas bases de dados PubMed, ScienceDirect e SciELO. Os servidores PASS online e SwissADME foram usados para análise de biodisponibilidade oral e Pred-HERG e ToxTree para prever toxicidades cardíacas e sistêmicas. As atividades biológicas foram analisadas no PASS online e os alvos moleculares no SwissTargetPrediction. Em acréscimo foram realizadas, foram realizadas análises farmacofóricas e acoplamento molecular. Para corroborar o modelo empregado no acoplamento molecular, foi realizado um redocking. Dentre as moléculas avaliadas o α -pineno, derivado de monoterpenos naturais, pode ser encontrado na região sul brasileira, extraído de *Croton linearifolius* Müll.Arg. A atividade biológica no PASS online e SwissADME mostra efeitos corroboradores como antidepressivo. A verificação desse efeito foi analisada por acoplamento do α -pineno com a estrutura cristalográfica transportador de serotonina (SERT) que foi selecionado do (PDB ID: 5I6X). A análise de redocking feita com o complexo do transportador com a paroxetina estabeleceu os parâmetros do modelo de interação. O α -pineno é competidor pelo receptor do transportador de serotonina promissor, demonstrado pelo modelo farmacofórico e pela análise de acoplamento molecular. Esse estudo contribui como fundamento de perspectiva dessa molécula como um futuro fármaco antidepressivo.

Palavras-Chave: Plantas medicinais, α -pineno, Ferramentas *in silico*, Antidepressivos.

Abstract

Depression is among the biggest causes of disability worldwide. Therefore, the search for therapeutic innovations is necessary and, in this context, *in silico* studies are a fundamental tool for the development of new drugs more quickly and broadly. The investigated molecules were selected from the PubMed, ScienceDirect and SciELO databases. PASS online and SwissADME servers were used for analysis of oral bioavailability and Pred-HERG and ToxTree to predict cardiac and systemic toxicities. The biological activities were analyzed in the PASS online and the molecular targets in the SwissTargetPrediction. Finally, pharmacophoric analyzes and molecular coupling were performed. To corroborate the model used in molecular coupling, a redocking was performed. A-pinene, a derivative of natural monoterpenes, can be found in southern Brazil, extracted from *Croton linearifolius* Müll.Arg. The biological activity in PASS online and SwissADME shows corroborating effects as an antidepressant. The verification of this effect was analyzed by coupling α -pinene with the serotonin transporter crystallographic structure (SERT) that was selected from (PDB ID: 5I6X). The redocking analysis carried out with the paroxetine carrier complex established the parameters of the interaction model. A-pinene is a competitor for the

Contato para correspondência:

Leonardo Luiz Borges

E-mail:

leonardo.cbb@pucgoias.edu.br

Conflito de interesse: Não

Financiamento: Recursos próprios

Recebido: 12/10/2020

Aprovado: 07/11/2020

promising serotonin transporter receptor, demonstrated by the pharmacophoric model and molecular coupling analysis. This analysis helps to clarify its use as a possible antidepressant.

Keywords: Medicinal plants, α -pinene, In silico study, Antidepressant.

Introdução

A depressão segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) é um transtorno mental caracterizado por tristeza persistente e pela perda de interesse em atividades que normalmente são prazerosas, acompanhadas da incapacidade de realizar atividades diárias, durante pelo menos duas semanas, as causas possíveis incluem uma combinação de origens biológicas, psicológicas e sociais de angústia e esses fatores podem causar mudanças na função cerebral, incluindo alteração na atividade de determinados circuitos neuronais no cérebro¹. A depressão pode ser classificada como leve, moderada ou grave, a depender da intensidade dos sintomas.

De forma que o indivíduo com um episódio depressivo leve, terá que se esforçar para continuar um trabalho simples e também afetará atividades sociais, mas sem grande dano ao funcionamento geral. Já durante um episódio depressivo grave, é improvável que a pessoa afetada possa continuar com as atividades cotidianas, seja no trabalho, domésticas ou sociais. Existe uma distinção que é feita entre depressão em pessoas que já tiveram ou não um histórico que envolvesse episódios de mania. Ambos os tipos tendem a ser crônicos, com recaídas, especialmente se não forem tratados².

Segundo a OMS, a depressão atualmente representa 4,3% da carga global de doenças e está entre as maiores causas de incapacidade em todo o mundo, 11% de pessoas de todas as idades vivem com incapacidade, envolvendo principalmente mulheres. As consequências econômicas dessas perdas de saúde são igualmente grandes, um estudo recente estimou que o impacto global acumulado dos transtornos mentais em termos de produção econômica perdida será de US \$ 16,3 milhões entre 2011 e 2030. Mesmo com esses números, entre 76% e 85% das pessoas com transtornos mentais graves não recebem tratamento nos países de baixa e média renda; a faixa correspondente para os países de alta renda também é alta: entre 35% e 50%. Os gastos anuais em saúde mental são inferiores a US \$ 2 por pessoa e inferiores a US \$ 0,25 por pessoa em baixa renda países, com 67% desses recursos financeiros alocados em hospitais psiquiátricos independentes³.

A serotonina representada na Figura 1 é um neurotransmissor e regulador bioquímico, sintetizado a partir do aminoácido essencial L-triptofano, atua como um transmissor local nas sinapses e como um modulador parácrino ou hormonal dos

circuitos após a difusão, permitindo uma ampla variedade de respostas comportamentais a diferentes estímulos. Alguns dos efeitos da serotonina incluem a modulação do sono, o estado de excitação e o comportamento sexual, e as deficiências do sistema serotoninérgico causam distúrbios como depressão, transtorno obsessivo-compulsivo, fobias, estresse pós-traumático distúrbio, epilepsia e transtorno de ansiedade generalizada. A serotonina possui três modos diferentes de ação no sistema nervoso: como transmissor, agindo localmente nos botões sinápticos; mediante a difusão a distância de seus locais de liberação produz efeitos parácrinos e circulando na corrente sanguínea, produzindo efeitos hormonais. Os três modos podem afetar um único circuito neuronal⁴.

Figura 1. Estrutura 2D da serotonina.

Para a investigação de novas moléculas bioativas, estudos in silico vêm se apresentando cada vez mais alvo de grande atenção por parte da indústria farmacêutica na predição de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção (ADME), toxicidade e predições de alvos de moléculas que podem ter grande probabilidade de serem candidatas nas fases de desenvolvimento clínico. Existe uma gama de propriedades que é possível de ser analisadas, dentre elas a absorção oral, biodisponibilidade, penetração na barreira hematoencefálica, depuração e volume de distribuição, essas e outras propriedades do estudo in silico reduz o risco de problemas nos estágios finais, otimizando a triagem e testando moléculas de maneira mais clara e objetiva⁵.

Plantas medicinais, são uma fonte interessante para a investigação *in silico*, por apresentar inúmeros metabólitos provenientes da biossíntese vegetal importantes para o vegetal, o que instiga a descoberta para potenciais fármacos. O gênero *Croton* em sua maioria apresenta substâncias com potencial medicinal, porém as atividades de comum uso são de inseticida, antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, dentre outras⁶. A espécie *Croton linearifolius* Müll.Arg. está distribuída na região sul do Brasil, mais precisamente no Paraná e Santa Catarina, é conhecida popularmente como velame pimenta e mais usada popularmente como inseticida, porém em sua constituição há uma grande concentração de monoterpenos⁷.

Devido ao aumento dos da incidência da depressão no Brasil e no mundo, esse trabalho tem como objetivo a busca por meio de técnicas *in silico* de novas moléculas com potencial antidepressivo a partir da espécie *Croton linearifolius* Müll.Arg.

Métodos

Triagem de compostos presentes em *Croton linearifolius* Müll.Arg

As moléculas investigadas neste artigo foram selecionadas em bases de dados como PubMed, ScienceDirect, Google Acadêmico e *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) de espécies de plantas medicinais com potencial, dentre as plantas pesquisadas foi seleciona a espécie *Croton linearifolius* Müll.Arg. por apresentar grande quantidade de substâncias dentre as de sua espécie. Nove compostos monoterpenos (Tabela 1), dispostos no óleo essencial foi encontrado no mesmo gênero, foram selecionados para avaliação *in silico*⁷.

Tabela 1. Compostos identificados a partir do óleo essencial da espécie *Croton linearifolius* Müll.Arg para avaliação *in silico*.

Substâncias	Ocorrências	
	Folha	Caule
α -Tujeno	x	
α -Pino	x	x
β -Pino	x	x
Mirceno	x	x
α -Terpino	x	
o-Cimeno	x	x
γ -Terpino	x	
β -Cimeno	x	x
Terpinoleno	x	

Investigação farmacocinética *in silico* dos compostos de *Croton linearifolius*

A classificação druglikeness é usada para classificação e predição de alguns parâmetros farmacocinéticos das substâncias. O conceito druglikeness advém da publicação de Lipinski, (1997), que lança a 'Regra dos 5' (Ro5), amplamente difundida e usada como parâmetro na avaliação de novas moléculas quanto a seu potencial de absorção⁸. Essa avaliação tem como características o princípio que não poder ter mais do que 5 ligações de doadoras de hidrogênio, não mais que 10 a de ligação de hidrogênio, uma massa molecular inferior a 500 Da e LogP que seja menor que 5. As propriedades que são consideradas por Lipinski, principalmente hidrofobicidade, distribuição eletrônica, características de ligação de hidrogênio, tamanho e flexibilidade das moléculas e presença de características farmacofóricas, influem o comportamento da substância no organismo, somando a biodisponibilidade, propriedades de transporte, afinidade de proteínas, reatividade, toxicidade e estabilidade⁹. Foi verificado a conformidade com a regra dos cinco de Lipinski pelo servidor SwissADME (<http://www.swissadme.ch>)¹⁰. A análise de predição de toxicidade foi realizada ToxTree (<http://toxtree.sourceforge.net>)¹¹, que analisa toxicidade por similaridade molecular, em que prevê a toxicidade aguda, hepatotoxicidade, citotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, imunotoxicidade.

Predição das propriedades biológicas *in silico*

Para prever atividades biológicas, foi utilizado o servidor PASS (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>)^{12,13} e o SwissADME. A partir da estrutura das moléculas, na forma de SMILES, foram encontrados os efeitos farmacológicos, mecanismos de ação, efeitos tóxicos e adversos, interação com enzimas e transportadores metabólicos, influência na expressão gênica e outras características.

Predição de alvos moleculares

A molécula avaliada pela plataforma SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>)¹⁴ é submetida a uma triagem de alvos moleculares por meio de análises de similaridade 2D e 3D e comparando a molécula com uma biblioteca de 280.000 compostos ativos¹³. Por meio de similaridade é possível analisar se a molécula tem ligação de alvo comum para determinada proteína. Pois o método do PharmMapper procura possíveis farmacóforos e relata os de maior pontuação em critério de comparação das configurações 2D e 3D com bases de dados das moléculas que já são relatadas a ligação na proteína alvo¹⁵⁻¹⁷. A biblioteca eletrônica utilizada para obter as proteínas alvo foram foi a do Protein Data Bank (PDB)(<https://www.rcsb.org/search>)¹⁸.

Docking molecular

Procedeu-se o *docking* no software GOLD Suite 5.7.0 associado à interface gráfica Hermes¹⁹. A região de interesse usada para o encaixe Gold foi definida com todos os resíduos de proteínas dentro dos 10Å dos ligantes de referência que acompanharam os complexos de proteínas já existentes. O valor padrão de todos os outros parâmetros foi utilizado e os complexos foram submetidos a 10 execuções de algoritmos genéticos usando a função de *score* ChemPLP.

Resultados e Discussão

Na pesquisa de plantas populares com uso medicinal, foi selecionada a espécie *Croton linearifolius* Müll.Arg. Selecionada pelo teor do α -pineno analisada ser maior dentre as da sua espécie²⁰. O gênero *Croton* é um dos maiores e mais diversos da família Euphorbiaceae, sendo distribuída em sua maioria nas regiões tropicais do mundo, possuindo aproximadamente 1.200 espécies⁷. No Brasil, estimasse cerca de 350 espécies, tendo a maior diversidade do gênero nas regiões Sudeste e Nordeste do país²¹.

O gênero *Croton* dentre os principais compostos biologicamente ativos destacam-se os terpenoides, fenilpropanoides, flavonoides, alcaloides e tocoferóis⁷. O α -pineno foi selecionado dentro dos monoterpenos por ser encontrado em grande concentração e possuir os efeitos desejados, ao prever a atividade dessa substância nos servidores PASS online e SwissTargetPrediction¹³⁻¹⁵, foram encontrados efeitos anti-discinesia, antineurótico, no tratamento de distúrbios fóbicos, antagonista nicotínico do receptor alfa 6, beta 3, beta 4, alfa 5, agonismo no transportador de serotonina, no transportador de noradrenalina, no receptor muscarínico de acetilcolina M2 e no receptor canabinoide 2, que em soma corroboraram para um possível efeito antidepressivo.

A toxicidade do α -pineno quando submetida a avaliação pelo servidor Toxtree apresentou a toxicidade classe 1, sendo essa a mais baixa, não houve nenhum parâmetro violado dentro das leis de Cramer¹². Quanto a toxicidade cardíaca pelo servidor Pred-HERG^{22,23} resultou em 60% de probabilidade de toxicidade fraca ou moderada, tendo o valor 0.19, sendo o limite aceitável 0.26 para cardiotoxicidade, permitindo assim, concluir que o composto não é tóxico e apto ao estudo *in silico*.

O transportador de serotonina (SERT) que foi selecionado do site PDB (Protein Data Bank: PDB ID: 5I6X) é um alvo para medicamentos antidepressivos e psicoestimulantes que bloqueiam a recaptação e prolongam a sinalização de neurotransmissores. O SERT tem como função terminar a sinalização serotoninérgica por meio da recaptação dependente de sódio e cloreto do neurotransmissor nos neurônios pré-sinápticos

de serotonina. A estrutura do SERT humana utilizada tem resolução de 3,15 Å e está ligada ao antidepressivo paroxetina, foi utilizado a metodologia de difração de raio-x para a categorização e elucidação do complexo²⁴. Tendo em vista que a paroxetina é um antidepressivo consolidado como um bloqueador da recaptação de serotonina, a utilização desse complexo que comprova tal mecanismo, corrobora para analisar se a atividade do α -pineno se assemelha com o mecanismo realizado pela paroxetina.

Para corroborar a análise de ancoragem, o redocking realizado mostrou que os valores do Root Mean Square deviation (RMSD), utilizados para medir a distância entre as 3 melhores poses e a estrutura ligante co-cristalizada, foram inferiores a 1 (Figura 2). Este resultado mostra que o modelo foi adequado para prever o perfil de encaixe entre a molécula ligante e o sítio ativo do alvo selecionado.

Para explorar as principais interações entre o α -pineno e o transportador de serotonina humana a partir da visualização das interações intermoleculares ligante-receptor, foram realizadas simulações de acoplamento molecular utilizando uma estrutura cristalina do transportador de serotonina e a estrutura do α -pineno no software GOLD (PDB ID: 5I6X)²⁵. O acoplamento molecular foi realizado para ilustrar o modo de ligação do monoterpeno selecionado e o alvo. Como pode ser visto na Figura 3, o α -pineno se encaixa no sítio de ligação do receptor do transportador de serotonina, gerando 10 interações, aumentando a hipótese de que este composto possa servir como um competidor pelo receptor desse transportador, explicando seus efeitos antidepressivos, por bloquear a recaptação de serotonina²⁶.

Como pode ser observado na Figura 4, o α -pineno apresenta ligações, Van der Waals, Alquila e π -alquila, as interações de Van der Waals com os resíduos de glicina Gly442 e Gly338, serina Ser439 e com a valina Val343 garante e contribui para estabilizar o encaixe e estabilizar o ligante no sítio ativo do transportador de serotonina.

O α -pineno apresenta as interações com os seguintes resíduos de aminoácidos da molécula transportadora de serotonina: Ser438, Ile172, Phe341, Tyr176, Asp98 e Ser439. Essas interações foram semelhantes as encontradas no estudo de Coleman, J.A. e colaboradores de 2016 sobre o complexo do transportador de serotonina e a paroxetina, o que corrobora na hipótese que o α -pineno pode apresentar uma ancoragem semelhante²⁶. Referente as interações encontradas no docking da molécula, observamos uma apolaridade que determina um possível mecanismo de ação competitiva pelo receptor, pois as ligações de Van der Waals, Alquila e π -alquila não apresenta interações muito fortes, porém suficientes para a ancoragem.

Figura 2. Melhores poses no redocking para o ligante co-cristalografado (paroxetina) com alvo 516X (valores de RMSD menores que 1Å).

Figura 3. Pose 1 ancorada de α -pineno no local ativo do transportador de serotonina. Imagem gerada com o software Discovery Studio 3.5 Visualizer.

Figura 4. O diagrama de interação 2D do α -pineno no sítio ativo do transportador de serotonina. Imagem gerada com o Discovery Studio 3.5 Visualizer.

Conclusão

A depressão vem se mostrando cada vez mais frequente, alcançando grandes índices, englobando todas as idades, em conjunto com a frequência, cresce o interesse por novos tratamentos e dentre eles com plantas medicinais, pelos seus derivados sendo metabólitos primários e secundários. A abordagem utilizada demonstrou que o α -pineno é um monoterpene promissor, para se ligar competitivamente com o transportador de serotonina e compartilha características químicas importantes com bloqueadores de recaptação de serotonina relatados na literatura. Esses estudos podem ajudar a elucidar efeitos relevantes dos extratos de *Croton linearifolius* Müll.Arg., que são ricos neste monoterpene, para o tratamento da depressão e incentivar novos estudos com outras plantas que possui o α -pineno com relação a essa atividade. Então, o α -pineno pode ser um ponto de partida no desenvolvimento novas opções terapêuticas contra a depressão, pois apresenta pouca cardiotoxicidade e um mecanismo atípico de ação, apresentado em medicamentos já consagrados na literatura, como por exemplo na Risperidona e Olanzapina. Por fim, este artigo fornece informações para ajudar na elaboração de mais

ensaios in vitro e in vivo com este monoterpene e um incentivo na pesquisa de novas formas de tratamento da depressão.

Referências

1. Organização Pan-Americana da Saúde. Depressão: o que você precisa saber. 2017. Acesso em 22 de julho de 2020. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=1095https://www.who.int/mental_health/action_plan_2013/bw_version.pdf?ua=1.
2. Organização Pan-Americana da Saúde. Folha informativa - Depressão. acesso em 22 de julho de 2020. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=1095https://www.who.int/mental_health/action_plan_2013/bw_version.pdf?ua=1.
3. World Health Organization. Switzerland: Mental Health Action Plan 2013-2020. Acesso em 22 de julho de 2020. Disponível em: https://www.who.int/mental_health/action_plan_2013/bw_version.pdf?ua=1.
4. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Serotonin, CID=5202, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Serotonin> (accessed on July 22, 2020).
5. Van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:192-204.
6. Silva VA, Oliveira CRM, Pessoa HLF, Pereira MSV. Antimicrobial efficacy of the extract of *Croton sonderianus* Mull. On bacteria that cause dental caries. *Revista de Odontologia da UNESP.* 2011;40(2):69-72.
7. Feliu DA. Análise de terpenóides de espécies de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Mull. Arg.) Pax (Euphorbiaceae). São Paulo, 2011.
8. Walters P. Indo além da regra de Lipinski no design de medicamentos, *Expert Opinion on Drug Discovery.* 2012;7(2):99-107.
9. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Abordagens experimentais e computacionais para estimar a solubilidade e permeabilidade em ambientes de descoberta e desenvolvimento de medicamentos. *Adv. DrugDeliv.* 2001;46(1-3):3-26.
10. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* 2017;7:42717.
11. Patlewicz G, Jeliaskova N, Safford RJ, Worth AP, Aleksiev B. An evaluation of the implementation of the Cramer classification scheme in the Toxtree software. *SAR QSAR Environ Res.* 2008;19(5-6):495-524.
12. Poroikov VV, Filimonov DA, Borodina YV, Lagunin AA, Kos A. Robustness of biological activity spectra predicting by computer program PASS for noncongeneric sets of chemical compounds. *J Chem Inf Comput Sci.* 2000;40:1349-55.
13. Poroikov VV, Filimonov DA. How to acquire new biological activities in old compounds by computer prediction. *J Comput Aided Mol Des.* 2002;16:819-24.
14. SwissTargetPrediction: dados atualizados e novos recursos para previsão eficiente de alvos proteicos de moléculas pequenas, *Nucl. Acids Res.* 2019.
15. Liu X, Ouyang S, Yu B, Huang K, Liu Y, Gong J, et al. PharmMapper Server: um servidor da Web para identificação de possíveis alvos de medicamentos por meio do mapeamento de farmacóforo. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:W609-W614.
16. Wang X, Pan C, Gong J, Liu X, Li H. Aprimorando o enriquecimento da previsão de alvos baseados em farmacóforos para os perfis polifarmacológicos de drogas. *J. Chem. Inf. Modelo.* 2016;56:1175-83.
17. Wang X, Shen Y, Wang S, Li S, Zhang W, Liu X, et al. Atualização PharmMapper: um servidor web para identificação de possíveis alvos de medicamentos com um banco de dados abrangente de farmacóforos. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:W356-W360.
18. PDB. Pesquisa de ácidos nucléicos; 2019.
19. Cole JC, Nissink JWM, Taylor R. Protein-ligand Docking and Virtual Screening with GOLD in Virtual Screening in Drug Discovery; Shoichet, B., Alvarez, J., Eds.; Taylor & Francis CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2005.
20. Berry PE, Hipp AL, Wurdack KJ, Van EEB, Riina R. Molecular phylogenetics of the giant's genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu strictu) using ITS and trnL-trn-F DNA sequence data. *American Journal of Botany.* 2005;9:1520-34.
21. Carneiro-Torres DS. Diversidade de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no bioma Caatinga. 296 f. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.
22. Braga RC, Alves VM, Silva MFB, Muratov E, Fourches D, Liao L, et al. Pred-HERG: A novel web-accessible computational tool for predicting cardiac toxicity. *Mol. Inform.* 2015;34(10):698-701.
23. Braga RC, Alves VM, Silva MFB, Muratov E, Fourches D, Tropsha A, et al. Tuning HERG out: antitarget QSAR

- models for drug development. *Top. Med. Chem.* 2014;14(11):1399-415.
24. Coleman JA, Green EM, Gouaux E. X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter. *Nature*. 2016;532:334-9.
25. Lange UEW, Baucke D, Hornberger W, Mack H, Seitz W, Hoeffken HW. Orally active thrombin inhibitors. Part 2: optimization of the P2-moiety. *Bioorgmedchemlett*. 2006;16:2648-53.
26. Moreno RA, Moreno DH, Soares MBM. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 1999;21:1.
27. Jonathan AC, Evan MG, Eric G. X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter. California, USA. Macmillian Publishers Limited; 2016.