



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

YVNNI MARIA SALES DE MEDEIROS E SILVA

**PLANEJAMENTO, AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DE DERIVADOS ESPIRO-
ACRIDÍNICOS COM POSSÍVEL ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

**CAMPINA GRANDE-PB
2021**

YVNNI MARIA SALES DE MEDEIROS E SILVA

**PLANEJAMENTO, AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DE DERIVADOS ESPIRO-
ACRIDÍNICOS COM POSSÍVEL ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura.

Coorientador: Prof. Me. Gleyton Leonel Silva Sousa

**CAMPINA GRANDE-PB
2021**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586p Silva, Yvnni Maria Sales de Medeiros e.
Planejamento, avaliação *in silico* e *in vitro* de derivados espiro-acridínicos com possível atividade leishmanicida [manuscrito] / Yvnni Maria Sales de Medeiros e Silva. - 2021.
104 p. : il. colorido.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.
"Orientação : Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

1. Farmacodinâmica. 2. Derivados acridínicos. 3. Leishmaniose. 4. Bioisosterismo. I. Título

21. ed. CDD 615.7

YVNNI MARIA SALES DE MEDEIROS E SILVA

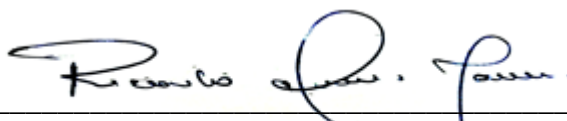
PLANEJAMENTO, AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DE DERIVADOS ESPIRO-
ACRIDÍNICOS COM POSSÍVEL ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

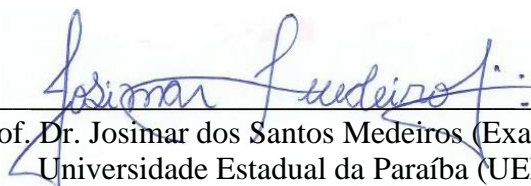
Área de concentração: Química Medicinal.

Aprovada em: 28/09/2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Josimar dos Santos Medeiros (Examinador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Me. Sonaly Lima Albino (Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

DEDICATÓRIA

*À minha mãe Niedja e minha avó Neusa, por todo amor,
dedicação e apoio incondicional,*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar forças todos os dias dessa jornada, principalmente naqueles que pareciam impossíveis de vencer e apenas ele foi capaz de acalmar meu coração e mente, sendo sempre minha fonte de energia, determinação e foco, que segue segurando minha mão e nunca me deixou desistir dos meus objetivos.

À minha mãe, Niedja, que é minha maior inspiração e desde muito cedo ensinou-me a importância da dedicação aos estudos, acima de tudo sempre me apoiou em todos os momentos. Sem dúvidas, a maior responsável pelos ensinamentos e valores que moldaram a pessoa que sou hoje, as palavras ainda não são suficientes para expressar minha gratidão e amor incondicional. À minha avó, Neusa, por todo amor, cuidado e incentivo, desde quando pegava na minha mão para me ajudar na escrita das minhas primeiras letras.

Aos meus amigos (*my chosen family*) pelo amor, apoio, incentivo, compreensão e leveza, sendo cada um especial a sua maneira, carregando vocês no coração.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Ricardo Olímpio, pela confiança, apoio e incentivo. Durante esses anos como orientanda a sua contribuição foi essencial para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal, muito obrigada!

Ao meu coorientador, Prof. Me. Gleyton Leonel, por toda dedicação, paciência e conhecimentos transmitidos durante a construção deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (LDSF), por todo companheirismo, acolhimento e apoio. Eu sou extremamente grata pelos ensinamentos e momentos compartilhados.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente e foram inspiração nessa jornada acadêmica, meu sincero agradecimento.

“On ne voit bien qu’avec le cœur. L’essentiel est invisible pour les yeux.”

*Antoine de Saint-Exupéry
Le Petit Prince*

RESUMO

Dentre as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), tem-se a leishmaniose visceral que é a forma mais severa e fatal em mais de 95% dos casos não tratados. Contudo, a maioria dos medicamentos inseridos na terapia são associados à alta toxicidade e mecanismos de resistência. Tendo em vista a necessidade do desenvolvimento de fármacos mais eficazes e seguros, as estratégias de planejamento de fármacos auxiliado por computador e de modificação molecular por bioisosterismo são amplamente utilizadas na seleção de candidatos a fármaco, como os derivados espiro-acridínicos que, conforme descrito na literatura, demonstram atividade leishmanicida frente à *Leishmania infantum*. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade leishmanicida e citotoxicidade através de estudos *in vitro*, traçar possível mecanismo de ação e prever o perfil farmacocinético de derivados espiro-acridínicos a partir de estudos *in silico*. A avaliação *in vitro* abrangeu a determinação da atividade promastigotocida em cepas de *L. infantum*, citotoxicidade em células Vero e verificação do potencial hemolítico, tendo a Anfotericina B como fármaco de referência. O estudo *in silico* de ancoragem molecular envolveu as estruturas cristalográficas da CYP51 (PDB ID: 3L4D), topoisomerase IB-DNA (PDB ID:2B9S) e tripanotona redutase (PDB ID: 4APN), obtidas através do *Protein Data Bank* e ancoragem realizada pelo programa Gold 5.8.1, os modelos preditivos online (*SwissADME* e *pkCSM*) forneceram informações acerca do perfil farmacocinético. O bioisosterismo de anel aplicado ao *scaffold* AMTAC-01, substituindo o benzilideno pelo indol (AMTAC-22), elevou o potencial leishmanicida do AMTAC-22 ($CI_{50} = 2.00 \pm 0.08 \mu M$) em relação ao AMTAC-01 ($CI_{50} = 6.27 \pm 0.66 \mu M$) e ambos não demonstraram potencial hemolítico, porém tem-se nefrotoxicidade, que não inviabiliza tais compostos devido a disponibilidade da tecnologia farmacêutica. Outros dois bioisómeros foram propostos, com o anel quinolina (AMTAC-21) e piridina (AMTAC-24), cujos estudos de ancoragem molecular enfatizaram que a modificação molecular realizada resultou em maior afinidade do AMTAC-21 à LTopo IB-DNA, devido a planaridade associada à quinolina com pontuações melhores que a camptotecina, já o AMTAC-22 na TR, demonstrou maior afinidade em comparação ao ligante diaril pirrol. De acordo com as previsões farmacocinéticas, todos os derivados apresentaram alta absorção gastrointestinal, com destaque para o AMTAC-24 que demonstrou alta permeabilidade em Caco-2. Logo, o bioisosterismo de anel e hibridação de núcleos heterocíclicos nitrogenados otimizaram o perfil farmacodinâmico e farmacocinético dos derivados espiro-acridínicos avaliados.

Palavras-chave: farmacodinâmica; derivados acridínicos; leishmaniose; bioisosterismo.

ABSTRACT

Among Neglected Tropical Diseases (NTDs), there is visceral leishmaniasis which is the most severe and fatal form in 95% of the untreated cases. However, most of the drugs inserted in therapy are associated with high toxicity and resistance mechanisms. In view of the need to develop more effective and safe drugs, Computer-aided drug design and molecular modifications by bioisosterism strategies are widely used in the selection of drug candidates, such as spiro-acridine derivatives that as described in the literature, they demonstrate leishmanicidal activity against *Leishmania infantum*. This study aimed to evaluate the leishmanicidal activity and cytotoxicity through *in vitro* studies, trace possible mechanism of action and predict the pharmacokinetic profile of spiro-acridine derivatives from *in silico* studies. *In vitro* evaluation covered the determination of the activity against *L. infantum* promastigote strains, cytotoxicity in Vero cells and verification of hemolytic potential, with Amphotericin B as a reference drug. The *In silico* studies of molecular docking involved the crystallographic structures of CYP51 (PDB ID: 3L4D), topoisomerase IB-DNA (PDB ID: 2B9S) and trypanothione reductase (PDB ID: 4APN), obtained from *Protein Data Bank* and docking was performed by the Gold 5.8.1 program, the online predictive models (*SwissADME* and *pkCSM*) provided information on the pharmacokinetic profile. The ring bioisosterism applied to the scaffold AMTAC-01, replacing benzilidene by indole (AMTAC-22) raised antileishmanial potential of AMTAC-22 ($CI_{50} = 2.00 \pm 0.08 \mu M$) compared to AMTAC-01 ($CI_{50} = 6.27 \pm 0.66 \mu M$) and both did not demonstrated hemolytic potential, however there are nephrotoxicity that does not prevent the use of such compounds due to the availability of pharmaceutical technology. Two Others bioisosteres were proposed, with quinoline ring (AMTAC-21) and pyridine (AMTAC-24), whose molecular docking studies emphasized that the molecular modification performed resulted in greater affinity of AMTAC-21 to LTopo IB-DNA, due to the associated planarity of quinoline, presenting better score than camptothecin, whereas AMTAC-22 in TR showed greater affinity compared to the ligand diaryl pyrrole. According to pharmacokinetic predictions, all derivatives presented high gastrointestinal absorption, especially AMTAC-24, which demonstrated high permeability in Caco-2. Thus, ring bioisosterism and hybridization of nitrogen heterocyclic nuclei optimized the pharmacodynamic and pharmacokinetic profile of the evaluated spiro-acridine derivatives.

Keywords: pharmacodynamic; acridine derivatives; leishmaniasis; bioisosterism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Hospedeiros invertebrados de <i>Leishmania sp.</i> : (A) <i>Phlebotomus papatasi</i> (B) <i>Lutzomyia longipalpis</i>	21
Figura 2 -	Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania sp.</i>	22
Figura 3 -	(A) Formas promastigotas (B) Formas amastigotas.....	22
Figura 4 -	Compostos antimoniais pentavalentes: Antimoniato de meglumina (A) e Estibogluconato de sódio (B).....	27
Figura 5 -	Estrutura química da Anfotericina B (AmbB).....	28
Figura 6 -	Estrutura química da Pentamidina.....	29
Figura 7 -	Estrutura química da Miltefosina.....	30
Figura 8 -	Estrutura química da Paromomicina.....	31
Figura 9 -	Estrutura do núcleo acridínico.....	33
Figura 10 -	Estruturas dos derivados 9-aminoacridina.....	33
Figura 11 -	Estrutura da Clorpromazina (A) e Quinacrina (B).....	34
Figura 12 -	Estrutura do composto 14.....	34
Figura 13 -	Estruturas dos derivados A27, A75 e B'52.....	35
Figura 14 -	Estruturas dos compostos A2, B16 e C20.....	35
Figura 15 -	Estrutura dos compostos 2a (A) e 3a (B).....	36
Figura 16 -	Estruturas dos compostos BG-203 (A) e BG-237 (B).....	36
Figura 17 -	Estruturas dos compostos ACS01 e ACS02.....	37
Figura 18 -	Estruturas dos compostos AMTAC-01 (A) e AMTAC-11 (B).....	38
Figura 19 -	Isósteros clássicos dos anéis aromáticos.....	40
Figura 20 -	Compostos inibidores dos alvos selecionados para ancoragem molecular.....	43
Figura 21 -	Atuação da TR envolvendo a redução de tripanotiona dissulfeto (forma oxidada) em tripanotiona ditiol (forma reduzida).....	44
Figura 22 -	Formação do complexo Topo I-DNA.....	45
Figura 23 -	Derivados espiro-acridínicos avaliados por ancoragem molecular.....	56
Figura 24 -	Ligante fluconazol cocristalizado (verde) e ligante fluconazol redocado (laranja) no alvo esterol 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D).....	58
Figura 25 -	Ligante diaril pirrol cocristalizado (verde) e ligante diaril pirrol redocado (rosa) no alvo tripanotiona redutase (PDB ID: 4APN).....	58

Figura 26 -	Representação 2D do ligante fluconazol ancorado no alvo estero1 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D).....	60
Figura 27 -	Representação 2D do composto AMTAC-01 ancorado no alvo estero1 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D).....	60
Figura 28 -	Representação 2D do cetozonazol ancorado no alvo estero1 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D).....	61
Figura 29 -	Representação comparativa entre ligante fluconazol (laranja) e AMTAC-01 (roxo) ancorados no sítio de ligação do alvo estero1 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D).....	62
Figura 30 -	Camptotecina (verde) e AMTAC-21 (cinza) ancorados no sítio de ligação do alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S).....	63
Figura 31 -	Representação 2D do AMTAC-21 ancorado no alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S).....	63
Figura 32 -	Representação 2D da camptotecina ancorada no alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S).....	64
Figura 33 -	Representação 2D do diflomotecano ancorado no alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S).....	65
Figura 34 -	Representação 3D dos derivados espiro-acridínicos: AMTAC-01 (roxo), AMTAC-21 (branco), AMTAC-22 (laranja) e AMTAC-24 (amarelo) ancorados no alvo tripantotona redutase (PDB ID:4APN).....	66
Figura 35 -	Representação 2D do AMTAC-21 ancorado no alvo tripantotona redutase (PDB ID: 4APN).....	67
Figura 36 -	Representação 2D do AMTAC-22 ancorado no alvo tripantotona redutase (PDB ID: 4APN).....	67
Figura 37 -	Representação comparativa entre mepacrina (azul) e AMTAC-22 (laranja) ancorados no sítio de ligação do alvo tripantotona redutase (PDB ID: 4APN).....	68
Figura 38 -	Representação comparativa entre perfenazina (amarelo) e AMTAC-21 (branco) ancorados no sítio de ligação do alvo tripantotona redutase (PDB ID: 4APN).....	69
Figura 39 -	Representação 2D da mepacrina ancorada no alvo tripantotona redutase (PDB ID: 4APN).....	69

Figura 40 - Representação 2D da perfenazina ancorada no alvo tripartotona redutase (PDB ID:4APN).....	70
Figura 41 - Representação 2D do ligante diaril pirrol ancorado no alvo tripartotona redutase (PDB ID: 4APN).....	71
Figura 42 - Modelo <i>Boiled-Egg</i> dos derivados espiro-acridínicos.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alvos selecionados para o estudo de ancoragem molecular.....	51
Tabela 2 - Novos derivados espiro-acridínicos analisados por ancoragem molecular.....	52
Tabela 3 - Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI ₅₀) dos compostos avaliados frente às formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	54
Tabela 4 - Concentração capaz de promover 50% de hemólise (HC ₅₀) de derivados espiro-acridínicos e Anfotericina B.....	55
Tabela 5 - Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI ₅₀) de promastigotas (<i>L. infantum</i>), Concentração citotóxica para 50% das células (CC ₅₀) e índice de seletividade (IS= CC ₅₀ / CI ₅₀) de derivados espiro-acridínicos.....	55
Tabela 6 - Valores de score relativos à ancoragem molecular nos alvos em estudo.....	57
Tabela 7 - Perfil de solubilidade aquosa, lipofilicidade, absorção no trato gastrointestinal (TGI), absorção intestinal e permeabilidade Caco-2 dos derivados espiro-acridínicos.....	72
Tabela 8 - Parâmetros considerados como critérios de <i>druglikeness</i>	74

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Planejamento dos derivados espiro-acridínicos.....	47
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME-Tox	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AQP-1	Aquagliceroporina-1
ATP	Adenosina Trifosfato
BHE	Barreira Hematoencefálica
Caco-2	Linhagem Celular de Adenocarcinoma de Cólon Humano
CADD	Planejamento de Fármacos Auxiliado por Computador
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das Células
CE ₅₀	Concentração em que o fármaco produz 50% do efeito máximo
CI ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento
CYP51	Esterol 14 α -Desmetilase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
HC ₅₀	Concentração capaz de causar 50% de hemólise
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IS	Índice de Seletividade
K _i	Constante de Inibição
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LM	Leishmaniose Mucosa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
Log P	Lipofilicidade pelo coeficiente de partição n-octanol/água
Log S	Solubilidade Aquosa
LPG	Lipofosfoglicano
L Topo IB-DNA	Topoisomerase IB de <i>Leishmania</i> em complexo com DNA
LV	Leishmaniose Visceral
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NET	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NK	Células <i>Natural Killer</i>

NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
P-gp	Glicoproteína P
PRP1	Proteína de Resistência a Pentamidina 1
PSA	Área de Superfície Polar
RNS	Espécies Reativas Nitrogenadas
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RRPS	Receptores de Reconhecimento de Padrões
SBDD	Planejamento de Fármacos Baseados na Estrutura
Sb III	Composto Antimonial Trivalente
Sb V	Composto Antimonial Pentavalente
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento
TGI	Trato Gastrointestinal
Th	Linfócitos T Auxiliares (<i>help</i>)
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-Alfa
TPSA	Área de Superfície Polar Topológica
TR	Tripanotiona Redutase
Transportadores ABC	Transportadores Cassetes de Ligação ao ATP
TXNPx	Triparedoxina Peroxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1	Aspectos gerais sobre as leishmanioses	21
3.2	Imunogenicidade	25
3.3	Opções de tratamento	27
3.3.1	<i>Antimoniais</i>	27
3.3.2	<i>Anfotericina B</i>	28
3.3.3	<i>Outros fármacos leishmanicidas</i>	29
3.4	Mecanismos de Resistência	31
3.5	Novas opções de tratamento	32
3.5.1	<i>Derivados acridínicos</i>	33
3.6	Estratégias de planejamento	38
3.6.1	<i>Bioisosterismo</i>	38
3.6.2	<i>Ferramentas in silico</i>	40
3.6.2.1	<i>Estudo do perfil farmacocinético e toxicidade (ADME-Tox) e druglikeness</i>	40
3.6.2.2	<i>Ancoragem molecular</i>	41
3.7	Alvos terapêuticos	41
3.7.1	<i>Tripanotiona redutase</i>	43
3.7.2	<i>Esterol 14α-desmetilase (CYP51)</i>	44
3.7.3	<i>Topoisomerase I</i>	45
4	METODOLOGIA	47
4.1	Planejamento do novo derivado híbrido espiro-acridínico indólico e bioisósteros- delineamento da pesquisa	47
4.2	Síntese do derivado híbrido espiro-acridínico indólico (AMTAC-22)	48
4.3	Atividade biológica em cepas de <i>Leishmania infantum</i>	48
4.3.1	<i>Manutenção das culturas</i>	48
4.3.2	<i>Cultivo dos parasitos</i>	48
4.3.3	<i>Avaliação da atividade promastigotocida</i>	48

4.3.4	<i>Análise de citotoxicidade</i>	49
4.3.4.1	<i>Cultivo das células Vero</i>	49
4.3.4.2	<i>Análise de citotoxicidade em células Vero</i>	49
4.3.4.3	<i>Análise de citotoxicidade em hemácias</i>	50
4.3.4.4	<i>Determinação do índice de seletividade</i>	51
4.4	Avaliação <i>in silico</i> do derivado híbrido espiro-acridínico indólico e seus bioisómeros	51
4.4.1	<i>Estudo de ancoragem molecular</i>	51
4.4.2	<i>Predição do perfil farmacocinético e de toxicidade</i>	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Avaliação da atividade promastigotocida	54
5.2	Avaliação da citotoxicidade do derivado híbrido espiro-acridínico indólico	55
5.2.1	<i>Análise do potencial hemolítico</i>	55
5.2.2	<i>Citotoxicidade em células Vero</i>	55
5.3	Estudo de ancoragem molecular	56
5.4	Predição do perfil farmacocinético e de toxicidade (ADME-Tox)	71
6	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICES	87

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são associadas a vulnerabilidade socioeconômica e ocorrem predominantemente em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Atualmente, as DTNs priorizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) compreendem um grupo diverso de 20 condições de origem parasitária, bacteriana, viral, fúngica e não transmissíveis que afetam mais de 1 bilhão de pessoas no mundo. O Brasil apresenta o maior contingente de pessoas que vivem com as DTNs no hemisfério ocidental, com destaque para a leishmaniose visceral e esquistossomose (FONSECA; ALBUQUERQUE; ZICKER, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021c).

Dentre as DTNs, tem-se a leishmaniose que é causada por mais de 20 espécies do protozoário *Leishmania* e mais de 90 espécies de flebotomíneos atuam na transmissão desses parasitos. Em humanos são conhecidas quatro formas principais da doença, a Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Visceral (LV) (MARHADOUR *et al.*, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021a).

Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de leishmaniose visceral ocorram anualmente no mundo, sendo a maioria no Brasil, Leste Africano e Índia. Já a forma mais comum da leishmaniose, que é a cutânea, apresenta estimativas de 600.000 a 1 milhão de novos casos anualmente no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021a).

Em uma perspectiva mundial, nos 88 países considerados endêmicos foram registrados 251.553 casos de leishmaniose cutânea, em 2018. Os casos notificados no Brasil, neste mesmo período, representam 6,5% do total de ocorrências (RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020).

No período de 2001 a 2018 foram relatados 989.096 casos de leishmaniose cutânea e mucosa em 17 dos 18 países americanos que são endêmicos, totalizando uma média anual de 54.950 casos, sendo que, apenas em 2018, 35,7% dos casos ocorreram no Brasil (16.432/46.041). Ainda assim, a taxa de incidência no Brasil foi de 15,82 casos a cada 100.000 habitantes, número inferior à Guiana (21,51), Peru (25,63), Colômbia (26,17), Costa Rica (26,81), Panamá (29,76), Honduras (31,22), Guatemala (39,17), Bolívia (54,71), Nicarágua (82,14) e Suriname, que atingiu 137,09 casos a cada 100.000 habitantes (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019).

Em relação à leishmaniose visceral que representa a forma mais severa e fatal em mais de 95% dos casos não tratados, no mundo tem-se 78 países considerados endêmicos, nos quais foram registrados 17.082 casos, apenas em 2018. Neste ano, o Brasil registrou 3.466 pessoas

contaminadas, o que representa 20,3% de todos os casos acompanhados pela Organização Mundial da Saúde. Além disso, entre os países considerados endêmicos, a mortalidade por calazar no Brasil em 2018 (10,6%, 368/3.466) só foi menor do que a do Paraguai (26,3%,5/19). Não foi considerada a mortalidade de 100% registrada na Jordânia, pois foi um único caso, que resultou em óbito; além disso, foi um caso importado (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019; RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020).

Apesar dos consideráveis dados de incidência e mortalidade associados à leishmaniose, aponta-se baixo incentivo para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas. Em consequência da falta de vacinas eficazes, a quimioterapia é a principal forma de tratamento, incluindo os antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), anfotericina B, miltefosina, pentamidina e paromomicina. A maioria dos medicamentos disponíveis apresentam alta toxicidade e efeitos colaterais, além do surgimento de cepas resistentes devido à escassez terapêutica, sendo necessário o desenvolvimento de compostos mais eficazes e seguros (ALBINO *et al.*, 2020; CARVALHO *et al.*, 2020; SUNDAR; AGRAWAL; SINGH, 2019).

A identificação de alvos moleculares é uma prática aplicada ao desenvolvimento de novos fármacos e, através de estratégias como a modelagem molecular, que é uma ferramenta aplicada no Planejamento de Fármacos Auxiliado por Computadores (*Computer-aided drug design-CADD*), é possível prever a afinidade entre ligantes e alvos biológicos, permitindo a realização de *screening* virtual a partir de quimiotecas. Os estudos *in silico* envolvem também a predição do perfil farmacocinético, cuja realização nas fases iniciais de descoberta de novos fármacos, resulta na redução drástica de falhas nas fases clínicas. Tais ferramentas visam acelerar a identificação de candidatos a fármacos que são selecionados para os testes, reduzindo o tempo e recursos destinados à pesquisa (CHEN, 2015; DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; PIERRI; PARISI; PORCELLI, 2010).

Dentre os alvos selecionados para a avaliação da atividade *multi-target* direcionada ao tratamento de leishmaniose, priorizam-se aqueles com ação mais específica. Como por exemplo, a topoisomerase I (topo I) que é uma enzima essencial envolvida no relaxamento da tensão, através da quebra e religação de uma única fita de DNA; sua utilização como alvo terapêutico para leishmaniose é justificada pela expressão diferencial durante a infecção e contraste estrutural entre a topo I do hospedeiro e de *Leishmania* sp, assim como a enzima esterol 14 α -desmetilase (CYP51), que participa da biossíntese de ergosterol constituinte na membrana do parasito. Adicionalmente, outro alvo interessante é a tripanotiona redutase que possui função antioxidante no metabolismo e sua presença é exclusiva no parasito (DAVIES *et*

al., 2006; HARGROVE *et al.*, 2011; REGUERA *et al.*, 2019; REVUELTO *et al.*, 2019; SÁENZ, 2016).

Ao longo dos anos, compostos sintéticos e naturais foram testados para a avaliação de seu potencial leishmanicida, destacando-se a presença de heterocíclicos nitrogenados em suas estruturas, como por exemplo a acridina (CHTITA *et al.*, 2016). Os derivados espiro-acridínicos já foram relatados na literatura devido seu potencial antiproliferativo, interação com DNA e inibição de topoisomerase (ALMEIDA *et al.*, 2016; GOUVEIA *et al.*, 2018). Recentemente, demonstraram atividade leishmanicida frente às formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum* (ALMEIDA *et al.*, 2021).

Desse modo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade leishmanicida e citotoxicidade de um novo derivado híbrido espiro-acridínico indólico através de estudos *in vitro*. Assim como, realizar a correlação *in vitro* e *in silico*, com o auxílio de estudos de ancoragem molecular nos alvos selecionados para traçar um possível mecanismo de ação e prever o perfil farmacocinético e de toxicidade por meio de modelos computacionais. Adicionalmente, propor a obtenção de novos compostos partindo do derivado em estudo, com aplicação da estratégia de bioisosterismo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar atividade leishmanicida e citotoxicidade através de estudos *in vitro*, traçar o possível mecanismo de ação e prever o perfil farmacocinético por meio de estudos *in silico* de um novo derivado híbrido espiro-acridínico indólico e propor novos bioisómeros.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar atividade antipromastigota de um novo derivado híbrido espiro-acridínico indólico em cepas de *Leishmania infantum*.
- Verificar a citotoxicidade dos derivados espiro-acridínicos pela ação frente às células VERO e potencial hemolítico.
- Realizar estudo de ancoragem molecular em alvos relevantes à doença e prever o perfil farmacocinético do derivado híbrido através de modelos computacionais;
- Propor, por meio de bioisosterismo de anel, novos híbridos, realizar estudos de ancoragem molecular e avaliar perfil farmacocinético *in silico*.

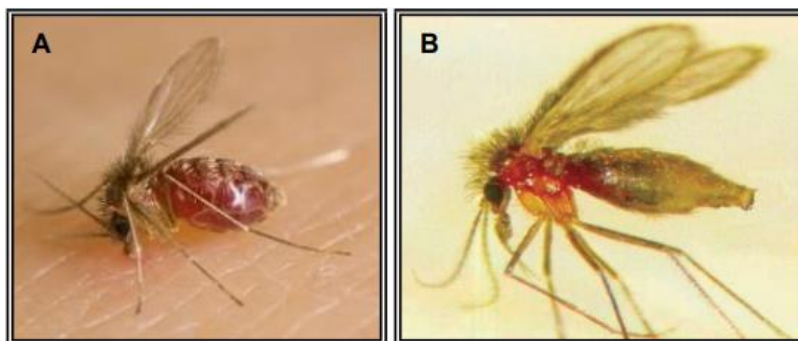
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Aspectos gerais sobre as leishmanioses

As Leishmanioses são doenças transmitidas por vetores do parasito de gênero *Leishmania* que tratam-se de protozoários da família Trypanosomatidae pertencentes à ordem Kinetoplastida e envolvem mais de 20 espécies diferentes. O gênero *Leishmania* é classificado em dois subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*), baseando-se em diferenças anatômicas dos sítios de desenvolvimento do parasito dentro do intestino do flebotomíneo, de modo que *Leishmania* é encontrado no novo mundo (as américas) e velho mundo (Europa, Ásia e África) e *Viannia* apenas no novo mundo (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; PACE, 2014).

Através do ciclo de vida digenético (heteroxênico), o parasito apresenta-se em hospedeiros vertebrados e insetos vetores como a fêmea de flebotomíneo hematófago do gênero *Phlebotomus* sp. no velho mundo e *Lutzomyia* sp. no novo mundo (figura 1). A perpetuação do parasito ocorre através da transmissão zoonótica ou antroponótica entre o vetor flebotomíneo e o hospedeiro mamífero. Várias espécies de animais domésticos têm sido encontradas infectadas, entre elas cavalos, burros e cães. Adicionalmente, destaca-se os ciclos silvestres, que envolvem roedores, marsupiais, edentados, procionídeos, canídeos, primatas e ungulados, de modo que os seres humanos são os hospedeiros finais quando infectados (AKHOUNDI *et al.*, 2016; BENASSI, 2015; BRASIL, 2014; GONTIJO; CARVALHO, 2003; PACE, 2014).

Figura 1- Hospedeiros invertebrados de *Leishmania* sp.: (A) *Phlebotomus papatasi* (B) *Lutzomyia longipalpis*

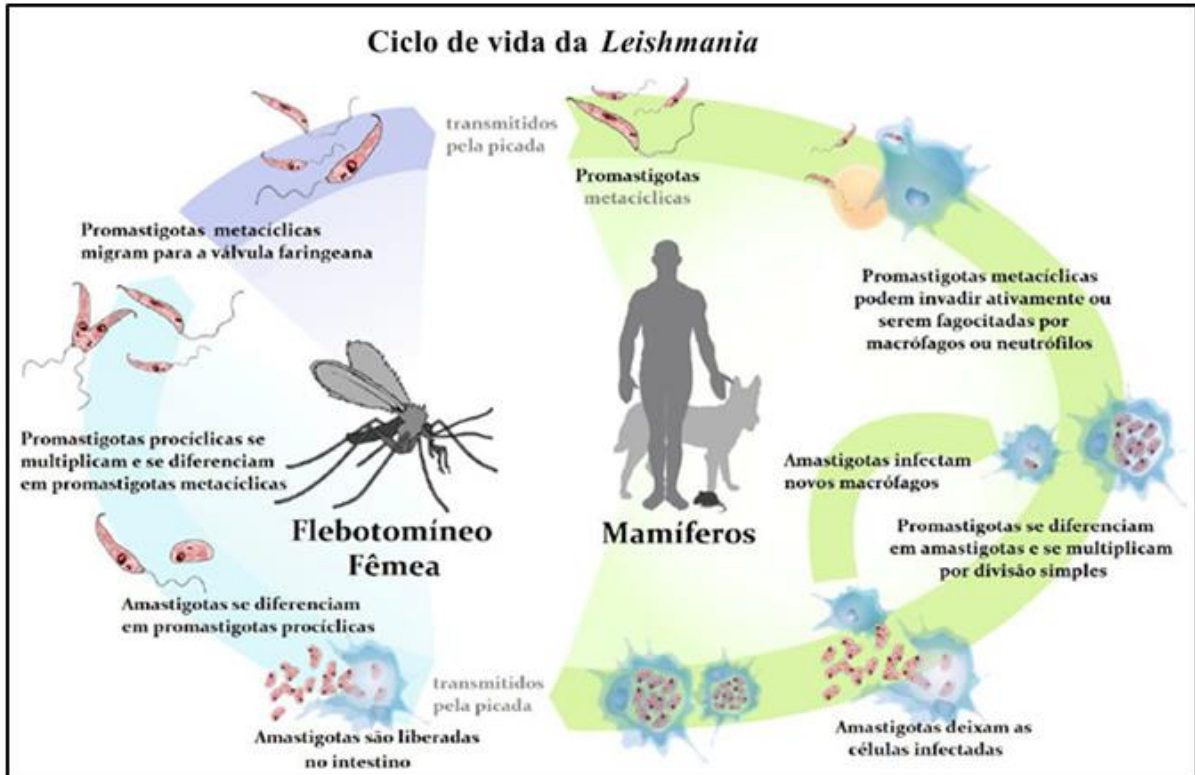


Fonte: Almeida (2018)

O parasito pode se apresentar em duas formas morfológicas principais no seu ciclo de vida que é demonstrado na figura 2, amastigotas intracelulares que são ovoides, imóveis e sem flagelos, encontradas dentro de linhagens fagocíticas mononucleares dos mamíferos hospedeiros ou em sua forma promastigota que são alongadas, flageladas e móveis encontradas no intestino do vetor (figura 3). Durante a picada, ocorre a inoculação das formas infectantes

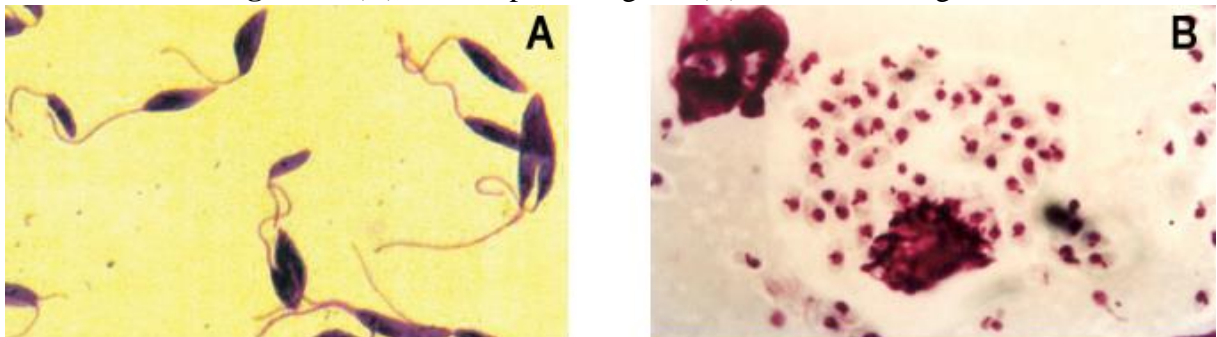
promastigotas metacíclicas que são fagocitadas por macrófagos ou neutrófilos recrutados para o sítio. Após a internalização das formas promastigotas, tem-se a diferenciação em pequenas formas amastigotas no fagolisossomo que se proliferam por divisão binária e são capazes de invadir outros macrófagos, assim como outras células fagocíticas ou não fagocíticas (FREITAS, 2010; PACE, 2014; STEVERDING, 2017).

Figura 2- Ciclo de vida do parasito *Leishmania* sp.



Fonte: Castro (2017)

Figura 3- (A) Formas promastigotas (B) Formas amastigotas



Fonte: Adaptado de BRASIL (2014)

Ao realizar o repasto em um hospedeiro infectado, o vetor ingere formas amastigotas intracelulares que são liberadas no intestino e se transformam em promastigotas procíclicas.

Após múltiplas divisões, diferenciam-se em promastigotas metacíclicas (metaciclogênese) que são formas flageladas altamente móveis e realizam a migração para a válvula faríngea, ocorrendo a transmissão durante o repasto da fêmea de flebotomíneo que se alimenta várias vezes de um mesmo hospedeiro, como um mecanismo adaptativo que visa aumentar as chances de sucesso da infecção (AKHOUNDI *et al.*, 2016; BATES, 2018; FREITAS, 2010; PACE, 2014; STEVERDING, 2017).

O desenvolvimento das formas clínicas causadas pelas diferentes espécies de *Leishmania* sp. depende dos tipos de células fagocíticas que foram invadidas. Quando ocorre a infecção de macrófagos residentes da pele, cujas células estão cheias de parasitos, tem-se o rompimento da célula e liberação das formas amastigotas que infectam outros macrófagos, evento presente na forma cutânea. Já quando ocorre a liberação das formas amastigotas na circulação sanguínea, tem-se a propagação da infecção no sistema fagocítico mononuclear (sistema reticuloendotelial) do fígado, baço, medula óssea, gânglios linfáticos e intestino, que é característico da forma visceral (STEVERDING, 2017).

A Leishmaniose Cutânea (LC) representa a manifestação clínica mais frequente, cujas lesões são exclusivamente cutâneas e tendem à cicatrização, iniciando como uma pápula indolor no local da picada do vetor flebotomíneo e ao passar de semanas a meses transforma-se em um nódulo, com ulceração delimitada de formato arredondado ou ovalado e bordas levantadas ou lesões abertas (lesões molhadas) e são localizadas geralmente em áreas expostas da pele sendo suscetíveis à infecções secundárias; esta última pode ser associada a linfadenite ou linfadenopatia. As lesões cutâneas podem disseminar-se e se transformar em múltiplas lesões com diversos aspectos, apresentando variação na severidade conforme o grau de ativação da resposta imunológica, com a possibilidade de tornar-se mais inflamadas, dolorosas e purulentas, devido à infecção bacteriana secundária. Em pacientes com a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), existe maior probabilidade da ocorrência de disseminação e ineficácia dos esquemas quimioterápicos utilizados (BRASIL, 2017; PACE, 2014; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

A Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) é caracterizada pela acentuada proliferação dos parasitos, devido à ausência de resposta celular específica (anergia) direcionada aos antígenos de *Leishmania* sp., logo tem-se multiplicação descontrolada, resultando em elevada distribuição na superfície corporal. No Brasil, esta forma está associada exclusivamente à infecção causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, com o desenvolvimento de múltiplas pápulas e nódulos espalhados que se assemelham a pacientes portadores de lepra lepromatosa, adicionalmente tem-se resultado negativo para Intradermorreação de Montenegro (IDRM) e má

resposta ao tratamento com recidivas praticamente inevitáveis. A LCD difere da LC disseminada, pois esta ocorre em indivíduos capazes de montar uma resposta imune celular contra *Leishmania* sp., associado a boa resposta terapêutica (BRASIL, 2017; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

Em contraste com forma mencionada anteriormente, a Leishmaniose Mucosa (LM) apresenta excessiva resposta celular imunológica direcionada ao parasito que não é capaz de controlar a doença e é provável responsável pelas manifestações clínicas, porém tem-se a escassez de parasitos nas lesões, em consequência do controle da multiplicação parasitária. No novo mundo, a Leishmaniose Mucocutânea (LMC) é caracterizada pela presença de nódulos e infiltrados na cartilagem nasal, acarretando bloqueio da entrada de ar, destruição do septo nasal e finalmente o colapso. Adicionalmente, tem-se o envolvimento da faringe, lábio superior, palato, laringe, bochechas e raramente traqueia e genitália que resulta em destruição tissular e desfiguramento, com maior número de casos sendo associados a *Leishmania (Viannia) braziliensis* na América do sul. A resposta à terapia não é boa, apesar da regressão ou desaparecimento das lesões, as recidivas são frequentes (BRASIL, 2017; PACE, 2014; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

No novo mundo, o parasito *Leishmania (Leishmania) infantum* também identificado como *Leishmania (Leishmania) chagasi* ocasiona a Leishmaniose Visceral (LV), popularmente conhecida como calazar, que é a forma mais severa da doença, cuja transmissão está associada a duas espécies de vetores flebotômíneos: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, sendo a primeira considerada transmissora majoritária do agente etiológico no Brasil e a segunda foi identificada no estado de Mato Grosso do Sul. Tem-se que o período de incubação no homem é em média de 2 a 6 meses, podendo atingir até 2 anos, enquanto no cão que é o principal reservatório na zona urbana é em média de 3 a 7 meses e no máximo vários anos (AKHOUNDI *et al.*, 2016; BRASIL, 2014; PACE, 2014).

A leishmaniose visceral trata-se de uma doença sistêmica que afeta órgãos internos, particularmente o baço, fígado e medula óssea, visto que a disseminação dos parasitos acarreta acúmulo nas células fagocíticas mononucleares dentro dos órgãos invadidos e hiperplasia secundária das células reticuloendoteliais, resultando em quadros clínicos constituídos principalmente por esplenomegalia, hepatomegalia e palidez. Apesar da administração do tratamento apropriado, a recaída pode ocorrer dentro de 6 a 12 meses depois e quando não tratada, a doença resulta em morte num período de 2 a 3 anos. Em casos de coinfeção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é observada a elevação da replicação dos patógenos, com progresso acelerado de ambas as doenças, visto que possuem mecanismo imunopatológico

convergente que envolve células dendríticas e macrófagos (AKHOUNDI *et al.*, 2016; BRASIL, 2014; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; PACE, 2014).

3.2 Imunogenicidade

Os primeiros momentos após a inoculação das formas promastigostas metacíclicas de *Leishmania* no hospedeiro são extremamente importantes, no que diz respeito à fagocitose que leva à colonização. Inicialmente, através das propriedades pró-inflamatórias da saliva do vetor flebotomíneo, tem-se o efeito quimiotático de fagócitos. A resposta inicial desencadeada pela identificação do parasito por meio dos Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs) e do complemento expressados pelas células inflamatórias localizadas no sítio da infecção, ocasionam o recrutamento de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e *Natural Killer* (NK) que, por sua vez, constituem a imunidade inata e reconhecem os parasitos através dos receptores *Toll-like* (TLRs). Os TLRs induzem as vias de sinalização intracelulares necessárias para o início da resposta inata que está associada à fagocitose e morte do parasito (MARAN *et al.*, 2016; ROSSI; FASEL, 2018).

Os neutrófilos e macrófagos são as primeiras células presentes do sítio de inoculação; a atuação dos neutrófilos na resposta inicial envolve fagocitose e liberação de Armadilhas Extracelulares (*Neutrophil Extracellular Traps*- NET) que promovem a retenção dos parasitos, facilitando a fagocitose. Porém, os parasitos se adaptaram a estes mecanismos ao ponto que se beneficiam deles, como por exemplo, possuem a capacidade de manter-se viáveis dentro dos neutrófilos após a fagocitose e inclusive desencadear a colonização de macrófagos por meio de neutrófilos infectados que funcionam como “cavalos de troia” ao serem fagocitados por macrófagos. Adicionalmente, algumas espécies (*L. donovani* e *L. infantum*) são resistentes à retenção das NETs liberadas (ELMAHALLWY; ALKHALDI; SALEH, 2021; HURREL; REGLI; TACCHINI-COTTIER, 2016; MARAN *et al.*, 2016; ROSSI; FASEL, 2018).

Mecanismos adaptativos também são observados após a fagocitose das formas promastigotas pelos macrófagos, pois a superfície do parasito é recoberta por uma camada espessa de Lipofosfoglicanos (LPG), interferindo na fusão do vacúolo parasitóforo e lisossomos da célula do hospedeiro. Deste modo, o parasito continua viável e realiza a transformação para sua forma amastigota dentro do fagolisossomo, desencadeando replicação e propagação no sistema reticuloendotelial (ELMAHALLWY; ALKHALDI; SALEH, 2021; ROSSI; FASEL, 2018).

Durante o processo de exposição a patógenos, os linfócitos T help CD4⁺ promovem respostas adaptativas conforme cada caso específico. As Células T Help 1 (Th1) produzem IFN-

γ (Interferon-gama) e são associadas à proteção contra patógenos intracelulares, enquanto as Células T Help 2 (Th2) estão envolvidas na produção de Interleucina 4 (IL-4), IL-5, IL-10 e IL-13 direcionadas a processos alérgicos e proteção contra agentes extracelulares. Logo, a eliminação do parasito é favorecida pela via associada à resposta induzida por linfócitos Th1, devido à ativação de macrófagos M1, produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Espécies Reativas Nitrogenadas (RNS) e elevação dos níveis da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS), cuja atuação é essencial na morte do parasito, pois catalisa a síntese de Óxido Nítrico (NO) a partir do substrato L-arginina. Além das citocinas mencionadas anteriormente, destaca-se a importância de IL-12, IL-1, Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), IFN- α e IFN- β que promovem o *upregulation* de iNOS e síntese de NO (BRASIL, 2017; ELMAHALLWY; ALKHALDI; SALEH, 2021; ROSTAMI; KHAMESIPOUR, 2021).

Em contraste, a via associada à resposta induzida por linfócitos Th2, desencadeia liberação de citocinas como IL-4 e IL-13, em consequência tem-se a ativação de macrófagos M2 e adicional biossíntese de poliaminas estimulada por IL-4 com posterior *upregulation* de arginase, favorecendo a sobrevivência do parasito dentro dos macrófagos e progresso da leishmaniose, além da redução da produção de NO, desencadeada pela competição entre arginase e iNOS pelo substrato L-arginina, que integra a síntese de poliaminas e ureia. Existe uma conexão das vias de poliaminas e da tripanotona, visto que a tripanotona é formada a partir de duas moléculas de glutatona e uma de espermidina, cuja manutenção da forma reduzida é dependente da tripanotona redutase, constituindo o arsenal de proteção do parasito frente à produção de ROS durante a infecção (ELMAHALLWY; ALKHALDI; SALEH, 2021; ILARI *et al.*, 2017; ROSSI; FASEL, 2018; ROSTAMI; KHAMESIPOUR, 2021).

Os macrófagos infectados por *Leishmania* têm suas funções desativadas devido à influência de citocinas, como Fator de Transformação do Crescimento (TGF- β) e IL-10; esta exibe ação supressora de citocinas inflamatórias, mais especificamente, TNF- α . Desse modo, o parasito direciona a via de ativação do macrófago M2 para sua sobrevivência e proliferação (ELMAHALLWY; ALKHALDI; SALEH, 2021; ROSSI; FASEL, 2018; ROSTAMI; KHAMESIPOUR, 2021).

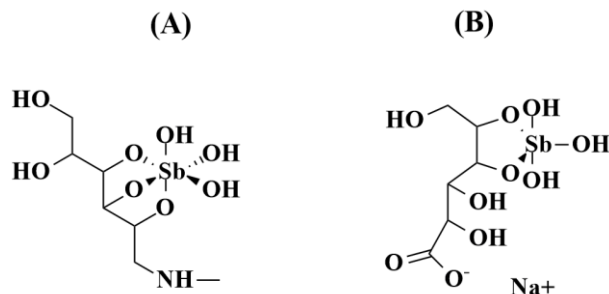
Além do mecanismo estabelecido por Th1 e Th2, enfatiza-se participação de Th17 na eliminação de microrganismos, atuando principalmente através da liberação de IL-17, que é uma citocina pró-inflamatória de ampla atuação, cuja presença é essencial na ativação e recrutamento de neutrófilos para mediar respostas inflamatórias, sendo crucial na proteção do hospedeiro frente à infecção por *L. infantum*, devido a atuação em conjunto com IFN- γ (FLORES *et al.*, 2020).

3.3 Opções de Tratamento

3.3.1 Antimoniais

Os compostos antimoniais, sob a forma de sais trivalentes, foram utilizados no Brasil pela primeira vez por Gaspar Vianna no tratamento de leishmaniose tegumentar em 1913, enquanto para a leishmaniose visceral tem-se registro da utilização desses compostos apenas dois anos após na Itália. A elevada toxicidade associada à forma trivalente intensificada pelo maior acúmulo no corpo, devido ao tempo de meia-vida mais prolongado influenciou na obtenção dos derivados pentavalentes (SbV), que só foram aplicados com tal finalidade na década de 40, sendo considerados fármacos de primeira escolha no tratamento dessa protozoose. Atualmente, tem-se as formulações de Estibogluconato de sódio e Antimoniato de meglumina (figura 4) disponíveis no mercado que demonstraram efeitos colaterais severos, como pancreatite, toxicidade renal e cardíaca, sendo administrados apenas por injeção, uma vez que não existem preparações orais acessíveis (BRASIL, 2014; CAPELA; MOREIRA; LOPES, 2019; WINSHIP, 1987).

Figura 4- Compostos antimoniais pentavalentes: Antimoniato de meglumina (A) e Estibogluconato de sódio (B)



Fonte: Adaptado de Frézard, Demicheli e Ribeiro (2009)

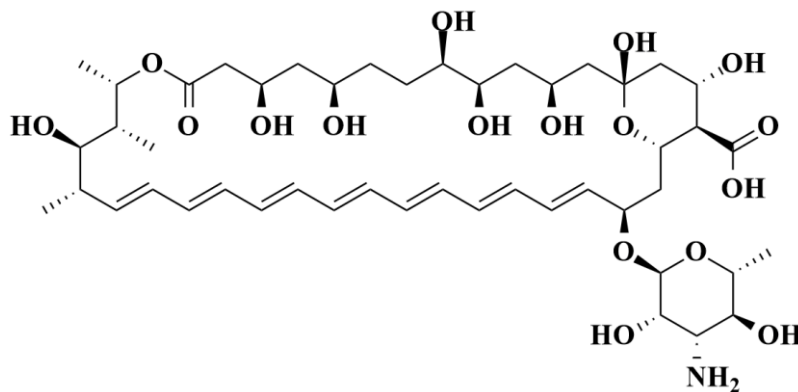
O mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado, porém estudos sugerem a possibilidade dos compostos antimoniais pentavalentes (SbV) entrar nas células do hospedeiro e ao passar pela membrana fagolisossomal, ocorre a conversão em antimônio trivalente (SbIII) que por sua vez atua frente às formas amastigotas ao comprometer o potencial redox, induzindo o efluxo de tióis intracelulares e realizando a inibição da enzima Tripanotona Redutase (TR). Assim como, a literatura demonstra que a exposição *in vitro* de *L. (L.) mexicana* ao Estibogluconato de sódio resulta na inibição de enzimas glicolíticas e os componentes da via de oxidação de ácidos graxos, sem alteração da via da hexose monofosfato e ciclo do ácido cítrico, acarretando esgotamento dos níveis intracelulares de Adenosina Trifosfato (ATP). Adicionalmente, podem atuar a nível de DNA, por meio da indução de lesões *in vivo* e inibição

da topoisomerase I (BRASIL, 2014; CAPELA; MOREIRA; LOPES, 2019; FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2018).

3.3.2 Anfotericina B

A Anfotericina B é um antibiótico produzido por *Streptomyces nodosus* constituído por uma estrutura de poliênio macrolídeo, representado na figura 5, que demonstra alta seletividade e afinidade por ergosterol. O ergosterol é um componente predominante em *Leishmania* sp. e fungos em detrimento das membranas celulares de mamíferos, sua toxicidade envolve a capacidade de ligar-se a esteróis que contêm uma substituição metílica no carbono 24 (episterol e ergosterol) na membrana celular do parasito, ocorrendo a formação de poros, alteração do equilíbrio iônico, na permeabilidade celular e, posteriormente, ocasiona morte celular. A sua utilização como um fármaco livre é prejudicada por fatores como baixa solubilidade em água, absorção reduzida no Trato Gastrointestinal (TGI) e baixa biodisponibilidade, tem-se que a elevação dos níveis de Colesterol LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade) acarreta modificação da farmacocinética e aumento da toxicidade renal (CRUZ *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2018; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

Figura 5- Estrutura química da Anfotericina B (AmbB)



Fonte: Pubchem

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

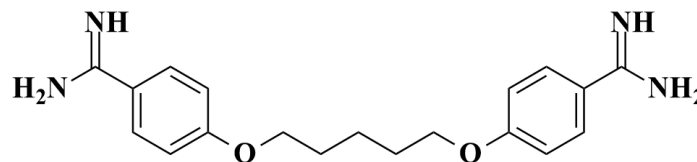
Desse modo, visando aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade renal, foram desenvolvidas novas formulações complexadas com lipídios direcionadas para o tratamento efetivo de leishmaniose visceral. AmBisome é uma formulação lipossomal de administração intravenosa amplamente utilizada por apresentar menor nefrotoxicidade que a forma convencional (Anfotericina B desoxicolato), porém, apesar de demonstrar alta taxa de cura (mais de 95% de eficácia em casos de leishmaniose visceral), AmBisome ainda induz

nefrotoxicidade e hematotoxicidade, bem como seu uso é limitado devido ao alto custo. Adicionalmente, tem-se outras formulações que foram desenvolvidas com a Anfotericina B, como por exemplo, Abelcet (complexo lipídico), Amphocil (dispersão coloidal) e Amphotec (complexo lipídico de sulfato de colesterol) (CRUZ *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2018; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

3.3.3 Outros fármacos leishmanicidas

A pentamidina é uma diamina aromática (figura 6), disponibilizada na forma de sais de isotionato e metanosulfato, cuja utilização foi priorizada inicialmente como uma opção secundária no tratamento de leishmaniose visceral, em regiões específicas como Bahir na Índia, nos casos de cepas resistentes ao tratamento com antimoniais, porém, devido à baixa eficácia e toxicidade, sua aplicação em monoterapia foi descontinuada na região. O mecanismo de ação desse fármaco não foi elucidado ainda, porém alguns foram propostos, como a atuação na mitocôndria do parasito acompanhado do efeito prejudicial ao complexo DNA do cinetoplasto-mitocôndria, adicionalmente sugeriu-se que através de transportadores de arginina e poliaminas tem-se a entrada do fármaco em formas promastigotas do parasito, afetando o potencial da membrana mitocondrial (CRUZ *et al.*, 2009; EJAZI; ALI, 2013).

Figura 6- Estrutura química da Pentamidina



Fonte: Pubchem

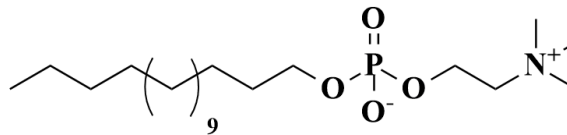
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Em pH fisiológico, a pentamidina assume uma estrutura catiônica que tende a realizar interações com múltiplos alvos do parasito e hospedeiro, resultando em cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, pancreatite e casos irreversíveis de diabetes mellitus insulino-dependente. Atualmente, esse fármaco está inserido principalmente no tratamento de casos de leishmaniose visceral de pacientes imunodeprimidos ou em combinação com outros fármacos (CRUZ *et al.*, 2009; EJAZI; ALI, 2013).

A miltefosina foi originalmente desenvolvida na linha de pesquisa de agentes antineoplásicos e pertence à classe dos alquilfosfolipídios (hexadecilfosfocolina), com estrutura

química representada na figura 7, mas destacou-se através de seu potencial leishmanicida, sendo o primeiro fármaco de administração oral no tratamento de leishmaniose visceral para crianças e adultos, incluindo pacientes refratários à terapia com antimoniais. Porém, seu uso é limitado devido ao seu potencial teratogênico e abortivo natural. Por fim, tem-se que sua atuação envolve a alteração do metabolismo fosfolipídico da membrana plasmática do parasito, assim como o potencial da membrana mitocondrial, acarretando morte por apoptose (CRUZ *et al.*, 2009; DORLO *et al.*, 2012; EJAZI; ALI, 2013; KAPIL; SINGH; SILAKARI, 2018; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

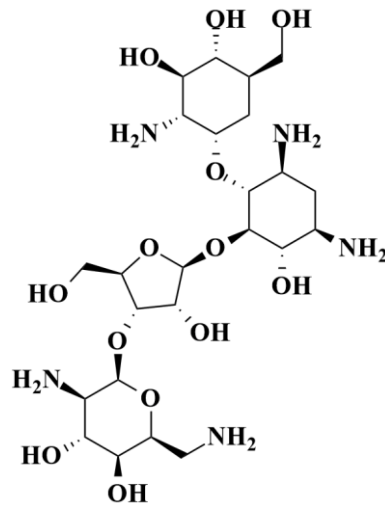
Figura 7- Estrutura química da Miltefosina



Fonte: Pubchem

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

A Paromomicina é um antibiótico aminoglicosídico (figura 8) isolado de *Streptomyces krestomuceticus* e demonstra atividade antibacteriana e leishmanicida, incluso no tratamento de leishmaniose visceral e cutânea, porém sua biodisponibilidade limitada restringe seu uso em regiões endêmicas. A ação leishmanicida atribuída a este fármaco possui mecanismo de ação não elucidado completamente, sugere-se o impedimento do potencial na membrana mitocondrial levando a morte por apoptose, inibição de síntese proteica ao ligar-se à subunidade 30S ribossômica. Adicionalmente, indução da disfunção respiratória, alteração da fluidez da membrana e do metabolismo lipídico (CRUZ *et al.*, 2009; FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012; KAPIL; SINGH; SILAKARI, 2018; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012)

Figura 8- Estrutura química da Paromomicina

Fonte: Davidson, Den Boer e Ritmeijer (2009).

3.4 Mecanismos de resistência

A Resistência farmacológica é um fenótipo da suscetibilidade reduzida em relação a determinado fármaco, resultante da exposição a outros fármacos, assim como variação natural entre as espécies e casos clínicos isolados de *Leishmania* sp., cuja alta plasticidade do genoma influencia no seu mecanismo adaptativo. O surgimento de resistência e mutações genéticas direcionam a reação do parasito a determinados fármacos, desencadeando um processo de seleção. O desenvolvimento de mecanismos de resistência trata-se de um dos principais problemas relacionados ao uso dos fármacos leishmanicidas disponíveis (JAIN; JAIN, 2018; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2016).

Os compostos antimoniais pentavalentes constituem o tratamento padrão de leishmanioses no mundo por quase 100 anos, porém o surgimento de mecanismos de resistência que foram difundidos nos últimos 25 anos resultou no comprometimento de sua ação clínica principalmente na Índia. O desenvolvimento da resistência e falha no tratamento pode ser expresso através de alguns fatores que desencadeiam redução da concentração do fármaco dentro do parasito, como por exemplo, elevação do efluxo ou declínio da captação. Adicionalmente, tem-se a inibição da ativação do fármaco, inativação do fármaco ativo e amplificação do gene (CAPELA; MOREIRA; LOPES, 2019).

O desenvolvimento de resistência *in vivo* aos compostos antimoniais, demonstram a inibição da ativação de antimônio pentavalente e redução da captação de sua forma ativa trivalente, ocasionada pelas formas amastigotas no metabolismo do tiol, destaca-se elevação dos níveis de tiol intracelular e expressão excessiva de triparedoxina peroxidase (TXNPx), ornitina descarboxilase e γ -glutamylcisteína sintetase associados ao mecanismo exposto.

Durante este processo, tem-se o declínio da expressão dos genes da Aquagliceroporina-1 (AQP-1) que atua no transporte transmembrana de amastigotas, possibilitando a entrada de metaloides trivalentes, apesar de uma menor proporção da forma ativa (SbIII) seja reduzida ainda no fagolisossomo do macrófago e a maioria dentro do parasito, tal via também contribui para a estruturação da resistência (CAPELA; MOREIRA; LOPES, 2019; POLONIO; EFFERTH, 2008; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2016).

Através de mecanismos de efluxo tem-se a consolidação da resistência, ressalta-se a superexpressão de Transportadores Cassetes de Ligação ao ATP (*ATP-binding cassette transporter*) ou transportadores ABC que abrangem proteínas transmembrana responsáveis pelo transporte de uma grande variedade de moléculas utilizando a energia resultante da hidrólise de ATP, incluindo ABCI4 e ABCG2 que contribuem para a resistência aos compostos antimoniais, devido ao efluxo do fármaco na forma de conjugados Sb-tiol. Adicionalmente, estudos demonstram que em casos de *L. donovani* resistente aos compostos antimoniais, tem-se a indução de *upregulation* das Proteínas de Resistência a Múltiplas Drogas (Multidrug resistance-related protein 1- MRP1), dentre elas a Glicoproteína-P (P-gp) associada à extrusão de compostos tóxicos da célula (CAPELA; MOREIRA; LOPES, 2019; MANZANO *et al.*, 2013; GARCÍA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015; MOREIRA, 2012; POLONIO; EFFERTH, 2008; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; RUGANI *et al.*, 2019).

Tal como exposto para os compostos antimoniais, os mecanismos de resistência associados a pentamidina envolvem o efluxo, através da P-gp e Proteína de Resistência a Pentamidina 1 (PRP1) inclusa na superfamília dos transportadores ABC (ABCC7). Adicionalmente, após a internalização da paromomicina por meio de endocitose, observa-se a ocorrência de efluxo. Outras hipóteses também são sugeridas para a construção da resistência, como por exemplo, modulação das taxas de tradução, interação com o tráfico mediado por vesículas, elevação do metabolismo energético por meio da glicólise e proteção efetiva realizada pelas chaperonas ou proteínas associadas ao estresse (CAPELA; MOREIRA; LOPES, 2019; POLONIO; EFFERTH, 2008; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2016).

3.5 Novas opções de tratamento

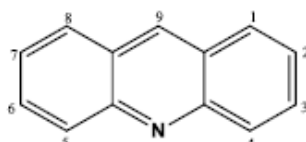
Os heterocíclicos são estruturas moleculares encontradas em fármacos e produtos naturais, ocupando um espaço de evidência na pesquisa e desenvolvimento de fármacos, pois as moléculas com potencial biológico geralmente apresentam tais estruturas que, em sua maioria, são constituídos pelos heteroátomos N-, O- e S-. Tem-se que os heterocíclicos representam mais de 90% dos fármacos utilizados na terapia em geral e, destes, 95% apresentam

ao menos um átomo de nitrogênio em sua composição (ALBINO *et al.*, 2020; PAWLOWSKI; STANEK; STODULSKI, 2019).

3.5.1 Derivados acridínicos

A acridina (figura 9) exibe ampla variedade farmacológica desde sua descoberta nos anos 1880. Já no início do século XX foi observada sua aplicação como agente antibacteriano, mas destacou-se em consequência de sua propriedade antiproliferativa direcionada a protozoários e células tumorais, por exemplo. Desse modo, ao longo dos anos tais compostos vêm sendo empregados como antiparasitários e a literatura relata o surgimento de novos derivados acridínicos sintetizados com potencial atividade leishmanicida (CHTITA *et al.*, 2016).

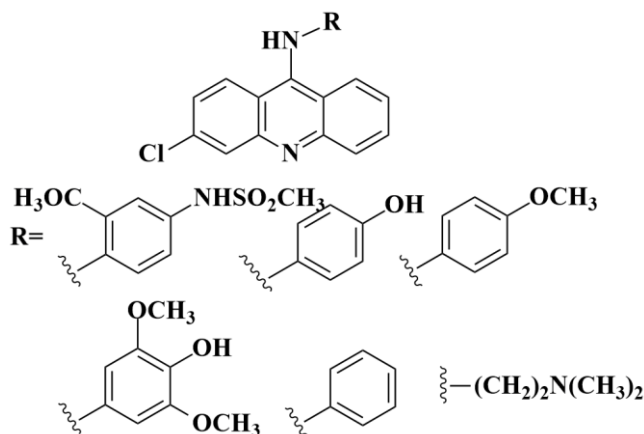
Figura 9- Estrutura do núcleo acridínico



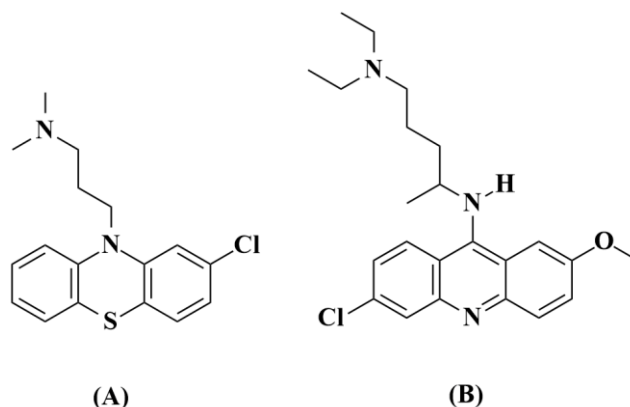
Fonte: Sánchez *et al.* (2006)

Os derivados de 9-aminoacridina representados na figura 10 foram planejados a partir dos compostos antileishmaniais quinacrina e clorpromazina (figura 11) e demonstraram atividade promastigotocida frente *L. donovani* e *L. infantum* em concentrações menores ou iguais a 25 μ M (WERBOVETZ *et al.*, 1992).

Figura 10- Estruturas dos derivados 9-aminoacridina

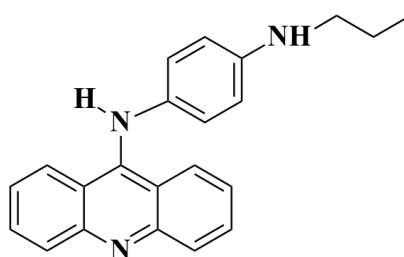


Fonte: Werbovetz *et al.* (1992)

Figura 11- Estrutura da Clorpromazina (A) e Quinacrina (B)

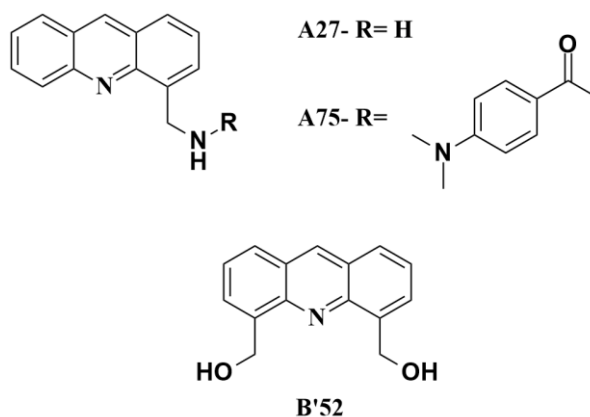
Fonte: Werbovetz *et al.* (1992)

Mauel e colaboradores (1993) avaliaram compostos portando o *scaffold* 9-anilinoacridina em formas amastigotas de *L. major*, bem como sua toxicidade em células jurkat. O composto 14 (1'-Hexilamino-9-anilinoacridina) exibido na figura 12 foi o menos tóxico frente às linhagens de células humanas jurkat ($CI_{50} = 17.0 \mu M$) e demonstrou atividade leishmanicida em mais de 80% dos parasitos intracelulares na concentração de $1 \mu M$.

Figura 12- Estrutura do composto 14

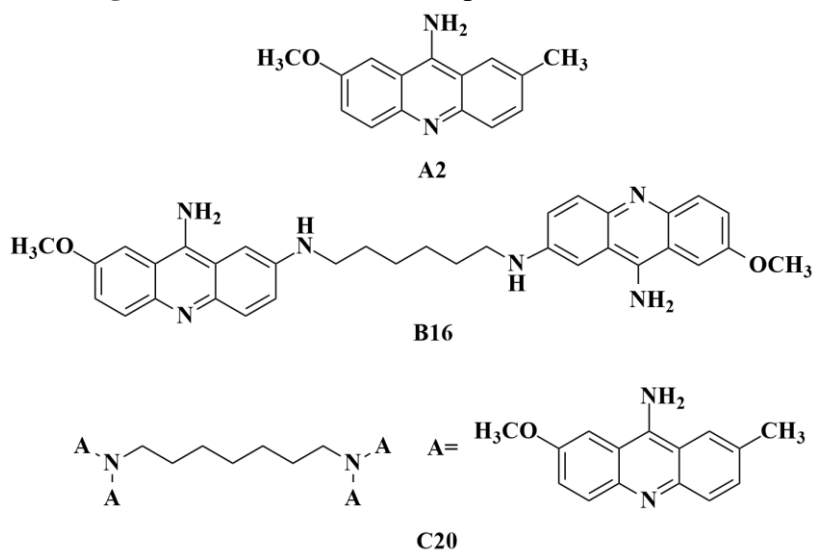
Fonte: Mauel *et al.* (1993)

Carole e colaboradores (2005) realizaram a síntese de derivados acridínicos 4,5-dissubstituídos e seus homólogos 4-monossubstituídos (figura 13) com posterior avaliação do potencial leishmanicida em formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* e citotoxicidade em monócitos humanos. Para a série de derivados acridínicos 4-monossubstituídos destacaram-se A27 frente às formas promastigotas ($CI_{50} = 1.7 \mu M$) e A75 devido sua seletividade para as formas amastigotas ($SI > 30$), dentre os 4,5-dissubstituídos tem-se que o composto B'52 4,5-bis(hydroxymethyl)acridine demonstrou atividade específica para as formas intracelulares, exibindo $CI_{50} = 0.6 \mu M$ e índice de seletividade maior que 200.

Figura 13- Estruturas dos derivados A27, A75 e B'52

Fonte: Carole *et al.* (2005)

Também com estudos direcionados para *L. infantum*, Di Giorgio *et al.* (2003) sintetizaram duas séries de 2-methoxyacridine com substituição na posição 7 portando uma cadeia lateral 9-amino ou 9-cloro e partindo-se destas desenvolveram derivados bis e tetra-acridínicos, em que A2 (figura 14) demonstrou forte potencial leishmanicida com CI_{50} menor que $1\mu M$ para as formas promastigotas e amastigotas ($SI= 183.5$), enquanto os representantes bis (B16) e tetra-acridínicos (C20), demonstrados na figura 14, também exibiram boa atividade e alto índice de seletividade, sendo 159.2 e 139.4, respectivamente.

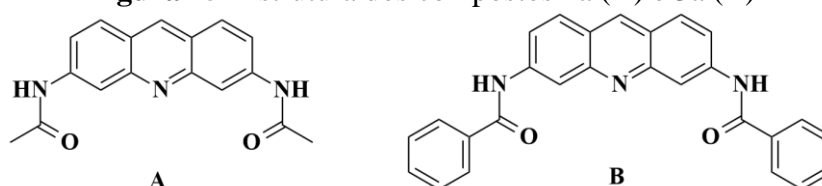
Figura 14- Estrutura dos compostos A2, B16 e C20

Fonte: Di Giorgio *et al.* (2003)

A pesquisa por fármacos leishmanicidas realizada por Di Giorgio *et al.* (2007) teve continuidade, baseando-se em compostos acridínicos monofuncionais substituídos na posição 6 e bifuncionais que exibem substituição em 3 e 6, obtidos por meio de substituição eletrofílica

diretamente na molécula de acridina. Com isso, foi proposta a síntese de derivados diaminoacridínicos a partir da proflavina e *N*-(6-amino-3-acridinil)acetamida. Dentre eles, o composto 2a (*N*-[6-(acetilamino)-3-acridinil]acetamide) mostrado na figura 15, é o representante dos homólogos bifuncionais, que demonstrou baixa toxicidade frente aos monócitos ($CI_{50} > 500 \mu M$) e atividades sobre as formas amastigotas de *L. infantum* ($CI_{50} = 4.5 \mu M$). Enquanto o composto 3a (*N*-[6-(benzoylamino)-3-acridinil]benzamide) exibido na figura 15, possui forte afinidade direcionada às duas formas do parasito, com CI_{50} de 1.1 a $4.3 \mu M$ para amastigotas e promastigotas de *L. infantum*, respectivamente.

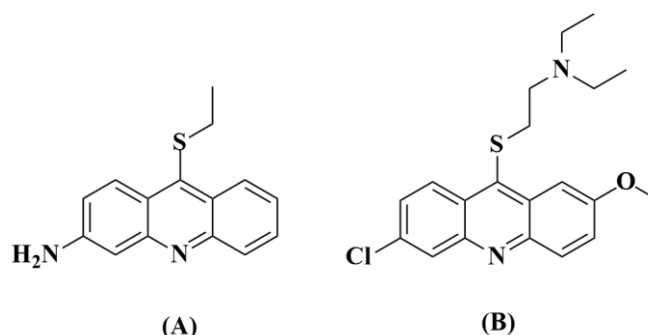
Figura 15- Estrutura dos compostos 2a (A) e 3a (B)



Fonte: Di Giorgio *et al.* (2007)

Mesa *et al.* (2002) também apresentaram pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de derivados acridínicos com potencial atividade para uma das espécies causadoras de leishmaniose visceral, através dos derivados acridínicos tioéteres BG-203 e BG-237 (figura 16), cuja concentração de $0.1 \mu g/mL$ resultou na redução significativa das formas promastigotas de *L. donovani* e contra as formas amastigotas destacou-se o composto BG-237 como o mais ativo na concentração de $0.1 \mu g/mL$, atingindo inibição do crescimento do parasito em 43%.

Figura 16- Estruturas dos compostos BG-203 (A) e BG-237 (B)



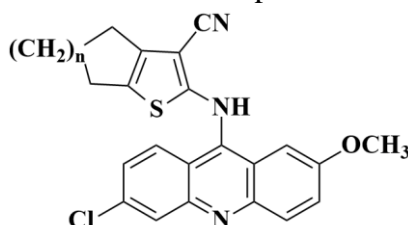
Fonte: Mesa *et al.* (2002)

Através da seleção de estruturas privilegiadas com atividade leishmanicida evidenciada na literatura, Serafim *et al.* (2018) realizaram o planejamento e síntese de oito novos compostos derivados acridínicos tiofênicos que foram avaliados quanto ao potencial frente às formas

promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e citotoxicidade em eritrócitos humanos. Destaca-se que os derivados mais ativos contra as formas promastigotas foram ACS01 e ACS02 (figura 17), apresentando CI_{50} de 9.60 μ M e 10.95 μ M, respectivamente.

Adicionalmente, os compostos ACS01 e ACS02 foram analisados em cepas resistentes e sensíveis a antimônio trivalente, ambos demonstraram eficácia na quimioterapia, em que ACS01 exibiu valores de CI_{50} de 14.83 μ M e 14.04 μ M e ACS02 com CI_{50} de 16.36 μ M e 16.05 μ M para cepas resistentes e sensíveis, respectivamente. Além do potencial leishmanicida exibido, nenhum dos compostos sintetizados apresentou citotoxicidade em relação aos eritrócitos humanos, mesmo na mais alta concentração testada (1000 μ M), constituindo uma seletividade superior aos compostos de referência, como a Anfotericina B (HC_{50} =24.25 μ M).

Figura 17- Estruturas dos compostos ACS01 e ACS02



ACS01- n=1

ACS02- n=2

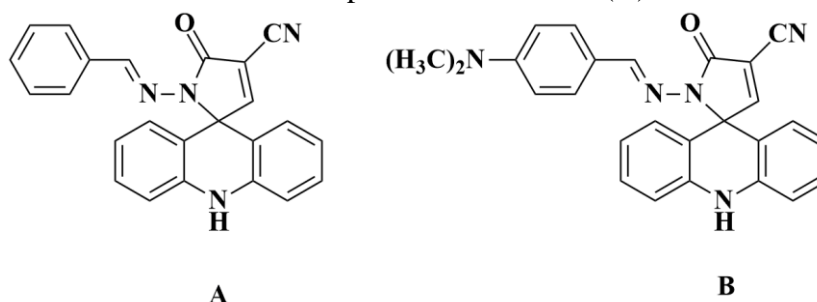
Fonte: Serafim *et al.* (2018)

Por fim, tem-se os derivados espiro-acridínicos que foram relatados recentemente na literatura com ênfase para seu potencial antiproliferativo, interação com DNA e inibição de topoisomerase, como demonstrado por Almeida *et al.* (2016) e Gouveia *et al.* (2018), porém pela primeira vez foi descrito por Almeida *et al.* (2021) sua atividade frente às formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum*, em que o *scaffold* sem substituições (AMTAC-01) e com o substituinte dimetilamina na posição 4 (AMTAC-11) representados na figura 18, destacaram-se em relação aos demais compostos sintetizados, com CI_{50} de 2.039 μ M/mL e 1.109 μ M/mL para as formas promastigotas, respectivamente.

Para as formas amastigotas, o AMTAC-11 exibiu 33.2% de redução do crescimento do parasito na menor concentração testada de 0.78 μ M/mL, ao passo que o AMTAC-01 inibiu 21.7% na mesma concentração. Os compostos que se destacaram pela atividade antipromastigota e anti-amastigota (AMTAC-01 e AMTAC-11) foram selecionados para a avaliação da citotoxicidade utilizando células mononucleares do sangue periférico (PBMC), cujo índice de seletividade foi calculado com base no potencial amastigotocida e citotoxicidade

frente às células PBMC ($IS = CC_{50}/CE_{50}$). Tem-se que o AMTAC-01 exibiu toxicidade na concentração de $44.16 \mu\text{g/mL}$ ($SI = 8.9$), enquanto o AMTAC-11 não demonstrou toxicidade na maior concentração testada ($100 \mu\text{g/mL}$) e maior seletividade ($SI > 102.67$), resultando em ação menos tóxica e mais seletiva que o fármaco usado como referência, Anfotericina B, que apresentou $CC_{50} = 7.634 \mu\text{g/mL}$ ($SI = 4.78$).

Figura 18- Estruturas dos compostos AMTAC-01 (A) e AMTAC-11 (B)



Fonte: Almeida *et al.* (2021)

Por fim, destaca-se que nenhum dos compostos em estudo demonstraram potencial hemolítico na maior concentração de $HC_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$, enquanto a Anfotericina B exibiu alta toxicidade com HC_{50} de $10.72 \mu\text{g/mL}$. Logo, tais derivados espiro-acridínicos apresentaram promissora atuação leishmanicida seletiva e associada a menores índices de toxicidade em comparação ao fármaco de referência.

3.6 Estratégias de Planejamento

3.6.1 Bioisosterismo

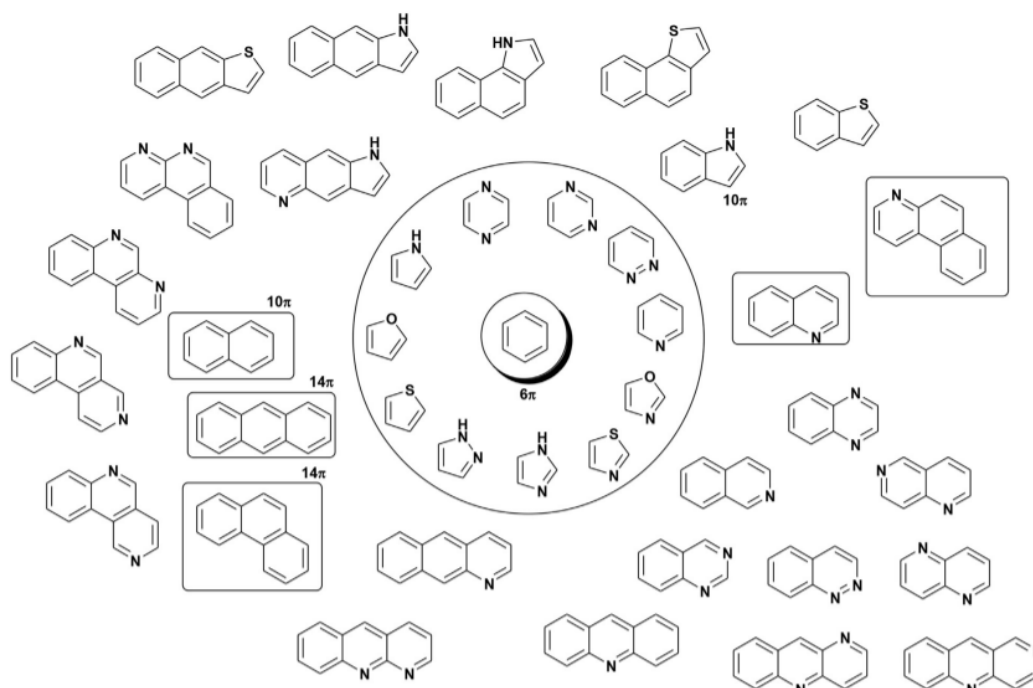
O bioisosterismo representa uma estratégia de modificação molecular que possibilita a substituição ou intercambialidade entre fragmentos, átomos e grupos presentes em estruturas de compostos bioativos, portando semelhança de volume molecular, forma, distribuição eletrônica e propriedades físico-químicas com aplicação na área da química medicinal durante o processo de desenho racional de novos fármacos, com o objetivo de otimização do potencial farmacodinâmico, perfil farmacocinético e eliminação de efeitos colaterais ou toxicidade, assim como para superar as barreiras impostas por patentes (LIMA; BARREIRO, 2005; LIMA; BARREIRO, 2017).

A partir da contribuição de Langmuir em 1919 para o estabelecimento do princípio de isosterismo, através do estudo acerca do comportamento químico e reatividade de determinadas substâncias, portando átomos com mesmo número de elétrons de valência. Tem-se em 1925, a

regra empírica formulada por Grimm, denominada “regra do hidreto”, que trata da adição de um átomo de hidrogênio com um par de elétrons (hidreto) a um átomo, resultando em um pseudo-átomo que possui as mesmas propriedades físico-químicas daqueles presentes na coluna imediatamente posterior da tabela periódica do átomo inicial. Tal conceito de isosterismo foi ampliado por Erlenmeyer e Hinsberg, passando a envolver átomos, íons ou moléculas que possuíam camadas eletrônicas periféricas idênticas (LIMA; BARREIRO, 2005; LIMA; BARREIRO, 2017).

Porém, a utilização do termo “bioisosterismo” teve início durante os anos 1950, através de estudos realizados por Friedman e Thornber, em que Friedman percebeu a importância da aplicação do conceito de isosterismo no desenho de moléculas bioativas, definindo bioisósteros como compostos que se encaixam nos princípios de isosterismo e que exerciam sua atividade biológica em biorreceptores. E posteriormente, Thornber realizou uma ampliação do termo com o objetivo de englobar subunidades, grupos ou moléculas que exibem propriedades físico-químicas de efeitos biológicos semelhantes. Apenas em 1970, Alfred Burger dividiu o bioisosterismo em duas categorias: clássico e não clássico, em que a primeira se baseia na camada de valência de átomos, grupos e radicais, incluindo nesta categoria anéis aromáticos ou não, equivalentes. Enquanto, estratégias de retroisosterismo, abertura de anel, anelação e equivalência entre grupos funcionais foram enquadradas como não clássico (BARREIRO; FRAGA, 2008; LIMA; BARREIRO, 2005; LIMA; BARREIRO, 2017).

O bioisosterismo de anel é uma estratégia observada frequentemente em diferentes classes terapêuticas. A substituição de anéis constitui uma ampla parte da química medicinal, sendo aplicado no processo de otimização de compostos *lead*, geralmente envolvendo a modificação de funcionalidades químicas. Na figura 19, tem-se o bioisosterismo de anel aromático clássico a partir do anel fenil, com 6 elétrons π , envolto de sistemas isósteros equivalentes representados por anéis de 5 ou 6 membros, assim como anéis isósteros portando 10 e 14 elétrons π , caracterizando as possibilidades de heterocíclicos que podem ser aplicados no bioisosterismo de anel (LIMA; BARREIRO, 2017; WERMUTH *et al.*, 2007).

Figura 19- Isósteros clássicos de anéis aromáticos

Fonte: Lima e Barreiro (2017).

3.6.2 Ferramentas *in silico*

3.6.2.1 Estudo do perfil farmacocinético e de toxicidade (ADME-Tox) e druglikeness

A predição *in silico* do perfil farmacocinético e de toxicidade ADME-Tox (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) é considerada a base da pesquisa e desenvolvimento de fármacos, cuja aplicação resulta na identificação e suspensão preliminar de fracos candidatos a fármacos, auxiliando na prevenção de falhas nos últimos estágios do processo de desenvolvimento de fármacos. Adicionalmente, aponta-se redução dos custos e tempo gastos na pesquisa, garantindo simultaneamente a segurança e estabilidade dos fármacos (ALQAHTANI, 2017; KAR; LESZCZYNSKI, 2020).

O conceito de *druglikeness* foi introduzido nos estágios primários do processo de desenvolvimento de fármacos para otimizar o perfil farmacocinético e selecionar compostos com propriedades ADME-Tox desejáveis, com ênfase na lipofilicidade, solubilidade, permeabilidade, estabilidade metabólica e afinidade. Um composto *drug-like* é descrito como uma molécula que possui grupos funcionais ou propriedades em concordância com a maioria dos fármacos conhecidos. Algumas regras foram estabelecidas para a seleção de moléculas, como por exemplo, a avaliação de compostos com boa absorção oral descrita na “regra dos cinco” de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 1997), seguida de outras regras desenvolvidas com base

nas propriedades moleculares propostas por Ghose, Viswanadhan e Wendoloski (1999), Oprea (2000), Veber *et al.* (2002) e Muegge, Heald e Brittelli (2001).

Adicionalmente, tem-se outros estudos associados às propriedades ADME-Tox molecular que são aplicados para o acesso a toxicidade e perfil farmacocinético de compostos em análise, como a absorção Gastrointestinal (GI), permeabilidade da Barreira Hematoencefálica (BHE), inibição das enzimas do Citocromo P450 (CYP), atuação como substrato ou inibidor da P-gp, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade e citotoxicidade (AGONI *et al.*, 2020; JIA *et al.*, 2019).

3.6.2.2 Ancoragem molecular

A ancoragem molecular representa uma das ferramentas utilizadas em estudos *in silico*, inserida no Planejamento de Fármacos Auxiliado por Computador (*Computer-aided drug design-CADD*), cuja associação com a biologia molecular possibilita a predição da maneira de interação do candidato a fármaco, sob o ponto de vista molecular, permitindo a caracterização do comportamento destes compostos quando inseridos no sítio ativo do alvo selecionado. Através da análise da conformação e orientação assumida pelos ligantes durante a interação no sítio de ligação, tem-se variadas possibilidades de “poses” geradas pelos algoritmos, cujo ranqueamento é realizado por meio das funções de score (MENG *et al.*, 2011; PINZI; RASTELLI, 2019; SCOTTI *et al.*, 2017; TORRES *et al.*, 2019).

Após o surgimento das primeiras estruturas cristalográficas derivadas de proteínas, compreendeu-se que o desenho racional de fármacos é capaz de mimetizar o processo natural através da ancoragem de ligantes promissores em alvos tridimensionais, fundamentando o Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura (*Structure-based drug design-SBDD*), cuja ligação observada entre moléculas de fármacos e resíduos de aminoácidos do receptor é traduzida num complexo de interação ligante-receptor, destacando-se majoritariamente interações intermoleculares eletrostáticas, ligações iônicas, ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, dentre outras que desencadeiam a ativação ou inibição do alvo. Tal qualidade interativa quando associada aos dados dos estudos realizados em múltiplos alvos de uma doença específica, resulta no direcionamento para os mecanismos moleculares (AMARO *et al.*, 2018; CHEN; SEUKEP; GUO, 2020; SCOTTI *et al.*, 2017).

3.7 Alvos terapêuticos

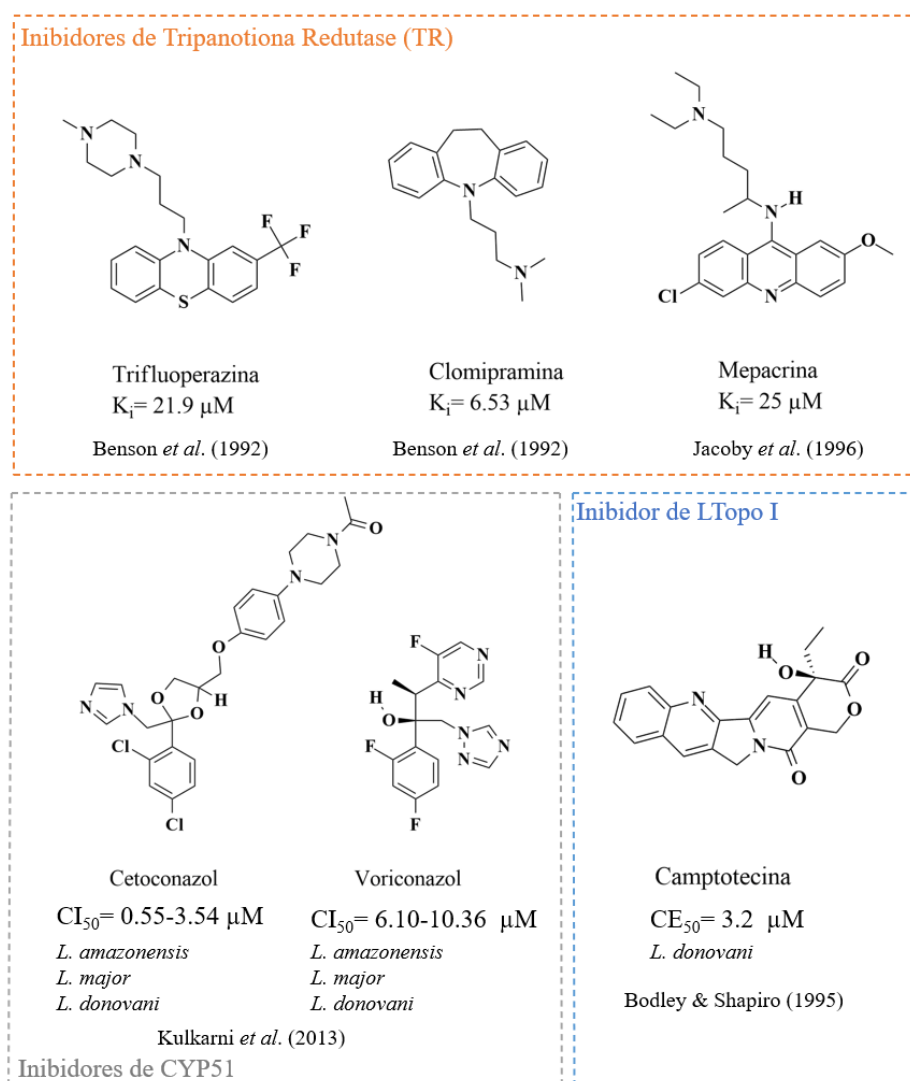
Proteínas ou ácidos nucleicos com atividade biológica constituem alvos moleculares envolvidos no progresso de determinadas doenças, cuja atividade pode ser modulada em

consequência da ação de pequenas moléculas ou fármacos. O processo de seleção destes alvos que incluem enzimas, receptores, fatores de transcrição, canais iônicos, proteínas de transporte, dentre outros, enfatiza sua importância para a sobrevivência do patógeno, especialmente quando ausentes ou não homólogos ao hospedeiro, reduzindo a possibilidade de interferência em enzimas ou proteínas do mesmo (VIJAYAKUMAR; DAS, 2018). Adicionalmente, a seleção de alvos também envolve a sobreposição de semelhanças estruturais entre os inibidores já conhecidos e os compostos a serem avaliados em determinado alvo (LIMA, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2012).

A partir dos estudos desenvolvidos com ênfase na tripanotona redutase, Benson e colaboradores (1992) destacaram compostos tricíclicos, como fenotiazínicos e antidepressivos tricíclicos, que somados ao derivado acridínico mepacrina, relatado por Jacoby e colaboradores (1996), constituem inibidores com atuação seletiva no alvo tripanotona redutase, sem interferência no funcionamento do sistema equivalente ao hospedeiro, glutatona redutase, cujas estruturas e Constantes de Inibição (K_i) são representadas na figura 20.

Compostos antifúngicos azólicos foram reposicionados para o tratamento de leishmaniose, através da atuação na via biossintética do ergosterol com inibição da enzima esterol 14α -desmetilase dependente da CYP450 (HARGROVE *et al.*, 2011). Destaca-se a atividade leishmanicida do cetoconazol e voriconazol (figura 20) frente às formas promastigostas de *L. amazonensis*, *L. major* e *L. donovani*, com CI_{50} variando de 0.55-3.54 μ M e 6.10-10.36 μ M, respectivamente (KULKARNI *et al.*, 2013).

A camptotecina (figura 20) é um alcaloide, isolado a partir de *Camptotheca acuminata*, conhecida pela sua ação antiproliferativa frente às células tumorais como veneno de topoisomerase I (SÁENZ, 2016; PRADA *et al.*, 2013). Adicionalmente, de acordo com os resultados descritos por Bodley e Shapiro (1995), a camptotecina é capaz de promover a formação de adutos de DNA nuclear-proteína a partir da estabilização do complexo clivável, exibindo atividade citotóxica direcionada a *L. donovani*, com valor de $CE_{50} = 3.2 \mu$ M.

Figura 20- Compostos inibidores dos alvos selecionados para a ancoragem molecular

Fonte: Adaptado de Benson *et al.* (1992), Bodley e Shapiro (1995), Jacoby *et al.* (1996) e Kulkarni *et al.* (2013).

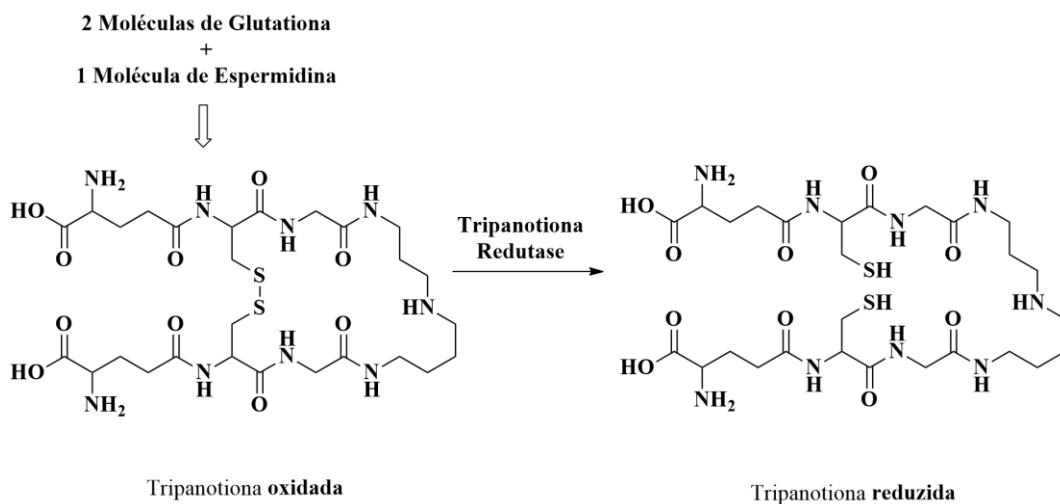
Os derivados espiro-acridínicos propostos apresentam semelhanças em relação aos compostos citados anteriormente, devido à presença de heterocíclicos nitrogenados, grupamentos aceptores de ligação de hidrogênio, alternância de componentes que conferem planaridade e liberdade conformacional a estrutura, assim como aponta-se complementaridade geométrica com a maioria dos compostos, resultando em alcance proporcional dos resíduos de aminoácidos presentes nos sítios ativos.

3.7.1 *Tripanotona reductase*

A Tripanotona Redutase (TR) é uma enzima essencial para a sobrevivência do parasito *Leishmania* sp., devido a associação com o sistema redox, apresentando influência na síntese de precursores de DNA, homeostase do ascorbato, desintoxicação dos hidroperóxidos, bem

como impulsiona a movimentação de conjugados de tiol. A atuação da TR envolve a redução de tripanotona dissulfeto em tripanotona ditiol (figura 21), através da transferência de dois elétrons dependente de NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato) e os resíduos de aminoácidos que compõe a porção catalítica do sítio ativo (Cys52-Cys57), utilizando FAD (Flavina Adenina Dinucleótido) como cofator. A tripanotona em seu estado reduzido é substrato da triparedoxina peroxidase, com posterior neutralização de ROS produzidas pelos macrófagos durante a infecção (BATTISTA *et al.*, 2020; KHAN, 2007; KUMAR; ALI; BAWA, 2014; OLIVEIRA, 2018; SACOLITTI *et al.*, 2017).

Figura 21- Atuação da TR envolvendo a redução de tripanotona dissulfeto (forma oxidada) em tripanotona ditiol (forma reduzida)



Fonte: Adaptado de Ilari *et al.* (2017).

O alvo adquiriu relevância, em razão da descoberta acerca de diferenças entre hospedeiro mamífero e parasito relacionadas ao sistema redox, visto que tal sistema de defesa do hospedeiro é dependente da glutaciona. Desse modo, em consequência do reconhecimento exclusivo e rejeição de substratos parecidos entre o parasito e hospedeiro que atuam por diferentes vias, tem-se importante seletividade associada ao mesmo (BATTISTA *et al.*, 2020; KHAN, 2007; KUMAR; ALI; BAWA, 2014; OLIVEIRA, 2018; SACOLITTI *et al.*, 2017).

3.7.2 Esterol 14 α -desmetilase (CYP51)

A Enzima Esterol 14 α -Desmetilase (CYP51) pertence à superfamília de citocromo P450 que são envolvidas nas etapas de oxidação e metabolismo de variados substratos orgânicos, cuja atuação específica da CYP51 está associada à catálise oxidativa que remove o grupamento 14 α -metil do núcleo de esterol, durante as etapas da biossíntese. Os esteróis presentes na membrana celular atuam na regulação da fluidez e organização da membrana, de forma similar

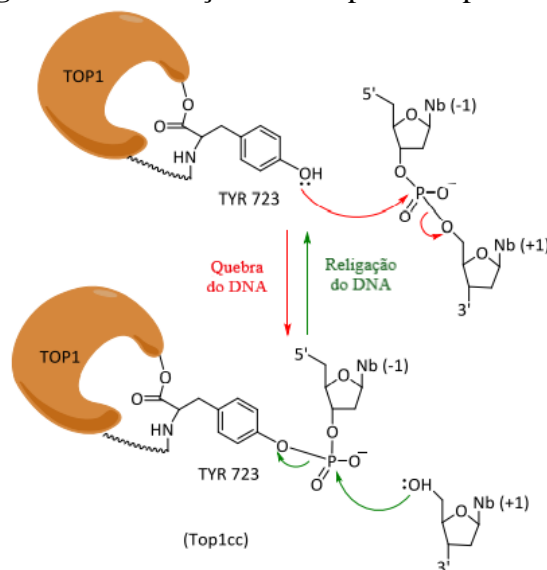
aos fungos, as membranas celulares de *Leishmania* sp. são constituídas majoritariamente por ergosterol e esteróis semelhantes, em detrimento de colesterol, constituindo um alvo adequado devido sua importância para a viabilidade e crescimento de parasitas, além de estarem ausentes nas células de mamíferos (EMAMI; TAVANGAR; KEYGHOBADI, 2017; MCCALL *et al.*, 2015).

3.7.3 DNA Topoisomerase I

As DNA Topoisomerases (Topo) são enzimas nucleares ubíquas, cujas funções biológicas estão relacionadas à estrutura de dupla hélice do DNA, visto que atuam no relaxamento da torção do DNA ao realizar a catálise da quebra da ligação e posterior religação do DNA durante a replicação, transcrição, recombinação, reparo e condensação cromossômica, tratando-se de um componente vital para as células que entram em divisão, sendo dispostas em duas classes, o tipo I que está associado à quebra de apenas uma fita, enquanto o tipo II quebra duas fitas.

A quebra da fita de DNA ocasionada pela Topo IB descrita na figura 22, acontece através de um ataque nucleofílico do resíduo catalítico de tirosina no sítio ativo que conecta-se à porção final do 3' fosfato, por meio de uma ligação fosfodiéster transitória entre o resíduo de tirosina da proteína e a porção final da fita quebrada, que é caracterizado por um complexo de quebra reversível enzima-DNA, possibilitando a modificação da topologia do DNA durante esse período que permanece no estado intermediário; finalmente a enzima é liberada e o DNA religado (ALMEIDA *et al.*, 2017; REGUERA *et al.*, 2019; SÁENZ, 2016).

Figura 22- Formação do complexo Topo I-DNA



Fonte: Adaptado de Sáenz (2016)

A inibição da topoisomerase IB pode ser alcançada através de variados mecanismos, como por exemplo, prevenção da ligação entre o DNA e topoisomerase, inibição da quebra do DNA, estabilização do complexo covalente ou inibição do processo de religação. A camptotecina e seus derivados são considerados “venenos de topoisomerase” por ligar-se reversivelmente ao complexo enzima-DNA, desencadeando colisões no garfo de replicação e quebras no DNA, através da conversão do complexo transitório a danos permanentes na fita, sendo conhecidos por sua potente ação anticâncer (PRADA *et al.*, 2013; REGUERA *et al.*, 2019; SÁENZ, 2016).

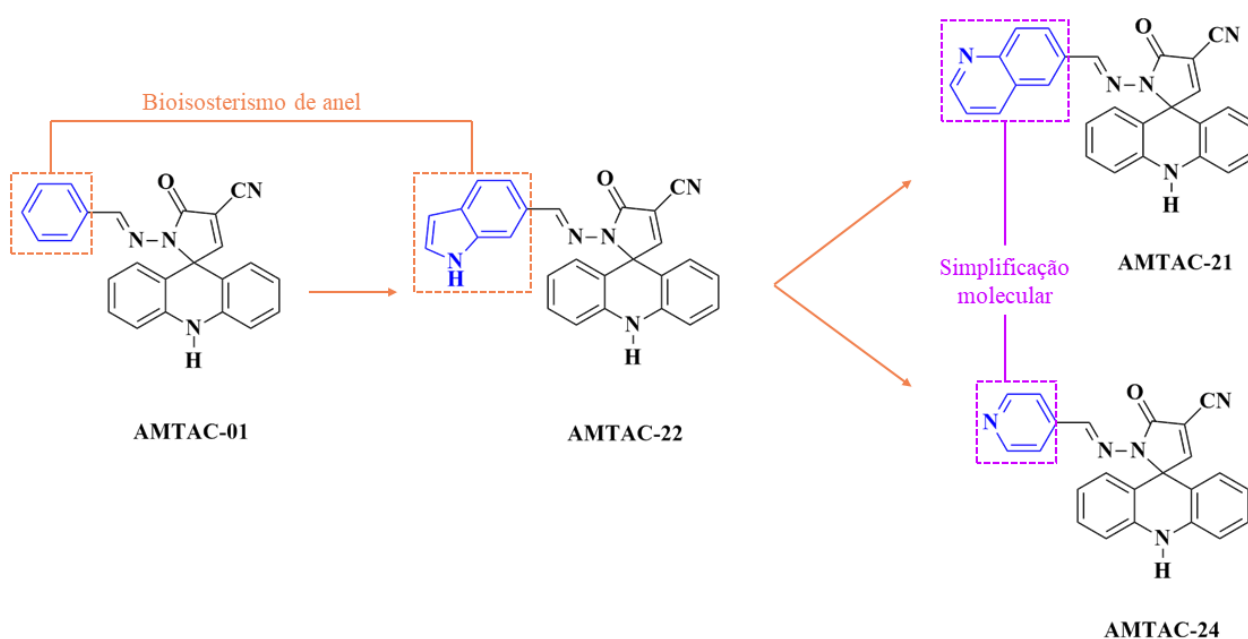
A topoisomerase IB de *L. infantum* é uma enzima heterodimérica codificada por dois genes, localizados em cromossomos diferentes, cuja importância terapêutica é justificada pela expressão diferencial durante a infecção e devido às diferenças estruturais com relação a enzima correspondente ao hospedeiro mamífero que é monomérica. A maior parte dos domínios associados à atividade enzimática da LTopo IB é conservado entre as duas subunidades que são conectadas por extensões de dois polipeptídios, constituindo uma região não utilizada para a atividade da Topo IB, mas contribui para a ligação ao DNA e inibição realizada pela camptotecina que leva ao retardo do processo de religação (PRADA *et al.*, 2013).

4 METODOLOGIA

4.1 Planejamento do novo derivado híbrido espiro-acridínico indólico e bioisómeros – delineamento da pesquisa

O composto espiro-acridínico AMTAC-01 relatado por Almeida *et al.* (2016) trata-se do arcabouço para o desenvolvimento de novos derivados espiro-acridínicos. Como observado no esquema 1, inicialmente aplicou-se a estratégia de bioisosterismo de anel para a substituição do benzilideno pelo indol, resultando no composto híbrido espiro-acridínico indólico (AMTAC-22) relatado por Pinheiro-Segundo (2020), que representa a união de dois núcleos (acridínico e indólico) já descritos na literatura por seu potencial leishmanicida.

Esquema 1- Planejamento dos derivados espiro-acridínicos



Fonte: Autoria (2021)

Após a fase dos testes *in vitro* com o AMTAC-22 e o arcabouço, foram propostos dois novos derivados a partir da aplicação do bioisosterimo que envolveu anéis heterocíclicos nitrogenados, como quinolina (AMTAC-21) e piridina (AMTAC-24). Adicionalmente, aponta-se a possibilidade de obtenção do AMTAC-24 através do AMTAC-21 por simplificação molecular. Todos os derivados foram analisados a partir da ancoragem molecular, tendo em

vista o direcionamento do mecanismo leishmanicida, posteriormente acessou-se o perfil farmacocinético e de toxicidade também por meio de ferramentas *in silico*.

4.2 Síntese do derivado híbrido espiro-acridínico indólico (AMTAC-22)

A síntese, caracterização físico-química e elucidação estrutural do AMTAC-22 foram previamente realizadas por Pinheiro-Segundo (2020), fazendo parte do acervo de pesquisa do Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (LDSF), no Campus I da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), sob a coordenação do Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura.

4.3 Atividade biológica em cepas de *Leishmania infantum*

4.3.1 Manutenção das culturas

Os parasitos e linhagens celulares foram cedidas pelo Prof. Luiz Carlos Alves do Departamento de Parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (IAM/ FIOCRUZ), Recife, PE.

4.3.2 Cultivo dos parasitos

As formas promastigotas de *Leishmania infantum* (Cepa MHOM/BR/70/BH46) foram mantidas em meio Schneider (Sigma) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de estreptomicina, cultivadas em estufa incubadora para demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) – J. Prolab, modelo JP. 100 (LBCM/CPqAM) à temperatura de 26° C. As formas promastigotas foram utilizados em fase exponencial de crescimento em todas as fases do experimento.

4.3.3 Avaliação da atividade promastigocida

Para realização dos testes *in vitro* dos derivados espiro-acridínicos, as formas promastigotas do parasito foram coletadas, contadas e diluídas em meio Schneider (Sigma) suplementado com 20% de SFB em uma concentração de 1×10^6 células/mL. Em seguida, as células foram incubadas em diferentes concentrações dos compostos (10; 5; 2,5, 1,25; e 0,625 $\mu\text{g/mL}$), por 72 horas.

As células do controle negativo foram incubadas apenas com o meio Schneider e do controle positivo foram incubadas com fármaco comercial anfotericina B. O crescimento da cultura foi acompanhado após 72 horas, através de contagens das células viáveis utilizando a câmara Neubauer, sendo calculado a partir da equação a seguir:

N° leishmania/mL = n° de células contadas X n° de quadrantes da câmara de Neubauer
X a diluição utilizada X 10^4 (Fator de correção da câmara de Neubauer)

O parâmetro usado para estimar a inibição do crescimento foi a concentração capaz de inibir 50% do crescimento dos parasitos (CI_{50}), sendo determinado após 72 horas de cultivo por análise de regressão linear com o software SPSS 8.0 para Windows.

Cada teste foi realizado a partir de dois experimentos independentes, com culturas distintas e em triplicata para cada experimento.

4.3.4 Análise de citotoxicidade

4.3.4.1 Cultivo das células Vero

As células Vero foram cultivadas em garrafa de culturas, contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e conservadas em estufa incubadora de CO_2 – Thermo Scientific Forma Series II Water Jacket (LBCM/CPqAM) a 5% de CO_2 e a $37^{\circ}C$, cujo meio de cultura foi trocado duas vezes por semana.

4.3.4.2 Análise de citotoxicidade em células Vero

O teste de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é baseado na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas, com a formação de cristais azuis intracelulares. Após a solubilização, tem-se a análise por espectrofotometria UV/visível, e quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT indicada pelo menor sinal espectrofotométrico.

Células Vero foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de 6×10^5 células/poço e incubadas em atmosfera de 5% de CO_2 a $37^{\circ}C$. Após 24 horas, o sobrenadante foi removido e as células foram incubadas na presença de várias concentrações dos compostos (10; 5; 2,5; 1,25 e 6,125 $\mu g/mL$) por 72 horas. Posteriormente, o sobrenadante (Meio RPMI contendo os compostos) foi retirado e adicionado a mesma quantidade de meio RPMI sem vermelho de fenol, somado à 10 μL de MTT na concentração de 5 mg/mL diluído em Tampão Fosfato Salino (PBS), as células foram incubadas por 3 horas nas mesmas condições de cultivo.

Após a incubação, o MTT foi retirado cuidadosamente e adicionado 100 μL de DMSO (Dimetilsufóxido) por poço para a solubilização dos cristais derivados da redução do MTT, seguido de agitação da placa durante 15 minutos. A leitura da absorbância dos cristais de formazan solubilizados foi realizada utilizando o leitor de ELISA Benchmark Plus (Bio-Rad), Califórnia, EUA, com comprimento de onda de 490 nm, por 15 segundos.

A porcentagem de células viáveis em relação às células controles foi estimada e a concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% (CC₅₀) das células foi determinada por análise de regressão linear dos dados obtidos pelo software SPSS 8.0 para Windows.

Cada teste foi realizado a partir de dois experimentos independentes, com culturas distintas e em quadruplicata para cada experimento.

4.3.4.3 Análise de citotoxicidade em hemácias

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada como já descrito anteriormente por Serafim *et al.* (2018) no Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (LABDIC), da Universidade Federal da Paraíba -UFPB, campus João pessoa, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima.

Após a coleta de sangue periférico humano (O+), os eritrócitos foram diluídos em Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS), ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias em um volume de 80 µL.

As soluções-estoque do derivado e dos fármacos de referência foram adicionadas e diluídas em concentrações seriadas num volume de 20 µL de PBS (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL). Em seguida, foram incubados durante 1 hora a 37°C em estufa B.O.D e a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de PBS.

Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria, utilizando espectrofotômetro (modelo Biosystems ELx800, Curitiba, PR, Brasil) a 540 nm para quantificar a atividade hemolítica.

A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente.

Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e duplicata amostral. Os resultados foram expressos em concentração hemolítica média (HC₅₀), considerando o controle positivo como 100% de hemólise.

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB, com protocolo número 0511/15, CAAE: 49005615.7.0000.5188.

4.3.4.4 Determinação do índice de seletividade

A partir dos dados referentes à atividade promastigotocida e do ensaio de citotoxicidade frente às células Vero e eritrócitos humanos, estimou-se respectivamente, o CI_{50} (Concentração capaz de inibir 50% do crescimento), o CC_{50} (Concentração citotóxica para 50% das células Vero) e HC_{50} (Concentração capaz de causar 50% de hemólise).

Desse modo, através destas estimativas determinou-se o índice de seletividade (IS). O IS é um indicativo *in vitro* que demonstra se a substância possui atividade mais seletiva para o parasito (*Leishmania* sp.) em relação às células Vero ou eritrócitos (Serafim *et al.*, 2018), cuja determinação ocorreu pela razão entre os valores de CC_{50} e CI_{50} para células vero e de HC_{50} e CI_{50} para eritrócitos.

4.4 Avaliação *in silico* do derivado híbrido espiro-acridínico indólico e seus bioisósteros

4.4.1 Estudo de ancoragem molecular

No estudo de ancoragem molecular, priorizou-se a seleção de alvos influentes na leishmaniose e já descritos na literatura como possíveis vias de tratamento, com maior ênfase no agente etiológico *Leishmania infantum*. Desse modo, as estruturas cristalográficas da Topoisomerase I, Esterol 14 α -Desmetilase (CYP51) e Tripanotiona Redutase (TR), com especificações destacadas na tabela 1, foram obtidas através do *Protein Data Bank* (PDB).

Tabela 1- Alvos selecionados para estudo de ancoragem molecular

PDB ID	ESPECIFICAÇÕES	ORIGEM
2B9S	Estrutura cristalográfica heterodimérica da topoisomerase I em complexo com DNA e vanadato	<i>Leishmania donovani</i>
3L4D	Estrutura cristalográfica da enzima esterol 14 α -desmetilase em complexo com fluconazol	<i>Leishmania infantum</i>
4APN	Estrutura cristalográfica da tripanotiona redutase em complexo com inibidor diaril pirrólico	<i>Leishmania infantum</i>

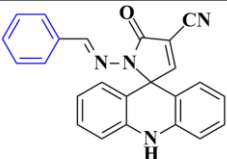
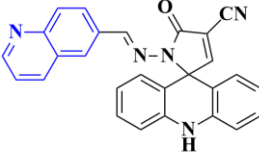
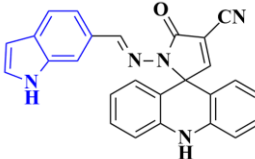
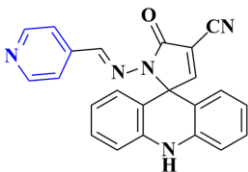
Fonte: Adaptado do *Protein Data Bank* (PDB)

As estruturas analisadas (AMTAC-01, AMTAC-21, AMTAC-22 e AMTAC-24) descritas na tabela 2 foram desenhadas no ChemDraw Ultra 12.0, com posterior otimização durante a etapa que envolve minimização de energia e análise conformacional por meio da aplicação do método semi-empírico de parametização PM6, usando o software Spartan 14.

Em seguida, a ancoragem das moléculas otimizadas foi executada nos alvos definidos, utilizando o programa Gold 5.8.1. A validação do estudo foi feita por *redocking*, quando os alvos apresentavam ligante cocrystalizado, considerando valores do Desvio Quadrático Médio (RMSD) menores que 2.0 Å (BELL; ZHANG, 2019). Adicionalmente, compostos de referência foram acrescentados como parâmetros farmacológicos de atividade inibitória nos alvos selecionados, visando aumentar a confiabilidade do estudo.

Na modelagem molecular realizada considerou-se o receptor como uma estrutura rígida e os ligantes como flexíveis, assumindo variadas poses, cujos resultados foram analisados a partir das interações intermoleculares que mensuram a afinidade energética em relação ao alvo, traduzida como o valor de score que é fornecido pelo Gold. As conformações ou poses com maior valor de score foram avaliadas, utilizando o programa Pymol 1.7.4.5 e para a visualização dos tipos de interações e distâncias aplicou-se o programa Discovery Studio Visualizer 2021 Client.

Tabela 2- Novos derivados espiro-acridínicos analisados por ancoragem molecular

NOMENCLATURA	ESTRUTURA
AMTAC 01- (<i>E</i>)-1'-(benzilidenoamino)- 5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina- 9,2'-pirrol]- 4'-carbonitrila	
AMTAC 21- (<i>E</i>)-5'-oxo-1'-((quinolin-6-ilmetileno)amino)-1',5'- dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]- 4'-carbonitrila	
AMTAC 22- (<i>E</i>)-1'-(((1H-Indol-6-il)metileno)amino)-5'-oxo-1',5'- dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]- 4'-carbonitrila	
AMTAC 24- (<i>E</i>)-5'-oxo-1'-((piridin-4-ilmetileno)amino)-1',5'- dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]- 4'-carbonitrila	

Fonte: Aatoria (2021)

4.4.2 Predição do perfil farmacocinético e de toxicidade

A realização de estudos preditivos de ADME-Tox (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) para os compostos AMTAC-01, AMTAC-21, AMTAC-

22 e AMTAC-24, a partir de ferramentas online disponíveis em: <http://www.swissadme.ch/index.php>. e <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcs/prediction>, é importante para o direcionamento acerca do perfil farmacocinético dos potenciais fármacos, assim como sinalização de provável toxicidade. Avaliou-se os parâmetros como absorção no trato gastrointestinal, Solubilidade Aquosa (LogS), Lipofilicidade (WLogP e MLogP), permeabilidade pela barreira hematoencefálica, metabolismo hepático (inibição de enzimas do citocromo p450) e hepatotoxicidade. Adicionalmente, analisou-se o cumprimento dos critérios de *druglikeness* estabelecidos por Lipinski (“regra dos 5”), Ghose, Veber e Egan.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da atividade promastigotocida

A avaliação preliminar da ação leishmanicida do derivado espiro-acridínico indólico (AMTAC-22) foi realizada em formas promastigotas de *L. infantum*. Com o objetivo de determinar o potencial do bioisosterismo de anel como estratégia de modificação molecular, partindo do arcabouço AMTAC-01 que, de acordo com Almeida *et al.* (2021), exibiu $CI_{50} = 2.039 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ frente às formas promastigotas e inibição de 21.7% do crescimento das formas amastigotas na menor concentração testada de $0.78 \mu\text{g/mL}$.

Na tabela 3, tem-se os valores de CI_{50} do AMTAC-01 e AMTAC-22 referente à atividade promastigotocida em *L. infantum* (sendo média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata). Observa-se que o desempenho do AMTAC-01 ($CI_{50} = 2.36 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$) é condizente com os dados descritos por Almeida *et al.* (2021).

Tabela 3- Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}) dos compostos avaliados frente às formas promastigotas de *L. infantum*

Compostos	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} (μM)
AMTAC-01	2.36 ± 0.25	6.27 ± 0.66
AMTAC-22	0.83 ± 0.03	2.00 ± 0.08
Anfotericina B	-	0.05 ± 0.00

Fonte: Aatoria (2021)

Em consequência da aplicação do bioisosterismo na modificação do anel benzilideno pelo indol, tem-se o aperfeiçoamento da ação promastigotocida do AMTAC-22 ($CI_{50} = 2.00 \pm 0.08 \mu\text{M}$) em relação ao AMTAC-01 ($CI_{50} = 6.27 \pm 0.66 \mu\text{M}$), demonstrando que a elevação da polaridade associada ao aumento do volume estrutural, bem como disponibilidade de grupamentos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio favoreceram a atividade dos derivados espiro-acridínicos. Corroborando para a viabilidade da estratégia e potencial leishmanicida associado a hibridação de núcleos heterocíclicos nitrogenados. Nessa avaliação *in vitro*, utilizou-se a Anfotericina B como fármaco de referência, cujo valor de $CI_{50} = 0.05 \pm 0.00 \mu\text{M}$ foi superior à atividade observada para os derivados espiro-acridínicos.

5.2 Avaliação da citotoxicidade do derivado híbrido espiro-acridínico indólico

5.2.1 Análise do potencial hemolítico

A atividade hemolítica foi testada em diluições seriadas de 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.12 $\mu\text{l/mL}$ dos compostos em estudo e 5% de hemácias. Através dos resultados expressos na tabela 4, observa-se que os derivados espiro-acridínicos não apresentaram potencial hemolítico nas concentrações avaliadas, com valores de Potencial Hemolítico Médio (HC_{50}) variando de > 962.8 a $> 1062.6 \mu\text{M}$. O AMTAC-22 e seu *scaffold* AMTAC-01 demonstraram melhor perfil citotóxico em comparação com medicamento comercializado (anfotericina B), visto que este exibiu $\text{HC}_{50} = 24.25 \pm 2.52 \mu\text{M}$. Logo, aponta-se que a citotoxicidade do AMTAC-22 não está relacionada à lise celular pela ruptura da membrana plasmática.

Tabela 4- Concentração capaz de promover 50% de hemólise (HC_{50}) de derivados espiro-acridínicos e anfotericina B

Compostos	HC_{50} (μM)
AMTAC-01	> 1062.6
AMTAC-22	> 962.8
Anfotericina B	24.25 ± 2.52

Fonte: Autoria (2021)

5.2.2 Citotoxicidade em células Vero

A citotoxicidade em células Vero (linhagem de células epiteliais renais extraídas de macaco verde africano) foi avaliada nas diluições de 10, 5, 2.5, 1.25 e 0.625 $\mu\text{l/mL}$. Conforme os resultados descritos na tabela 5, tem-se que o AMTAC-22 apresentou desempenho semelhante ao AMTAC-01, com valor de Concentração Citotóxica para 50% das células (CC_{50}) de $1.36 \mu\text{M}$, em consequência ambos são associados a baixos índices de seletividade, sendo 0.68 e 0.21, respectivamente.

Tabela 5- Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}) de promastigotas (*L. infantum*), Concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) e índice de seletividade ($\text{IS} = \text{CC}_{50}/\text{CI}_{50}$) de derivados espiro-acridínicos

Compostos	CC_{50} (μM)	CI_{50} (μM)	IS
AMTAC-01	1.36	6.27 ± 0.66	0.21
AMTAC-22	1.36	2.00 ± 0.08	0.68
Anfotericina B	105.7	0.05 ± 0.00	2110

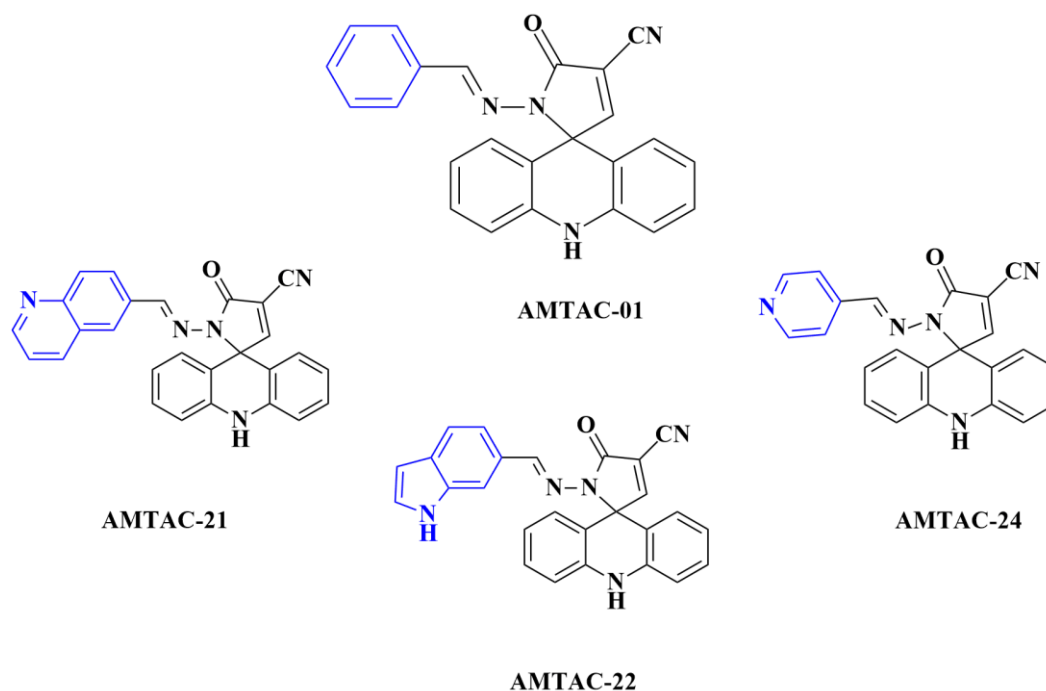
Fonte: Autoria (2021)

Ao realizar a comparação com a atividade exercida pelo fármaco de referência, tem-se que a anfotericina B possui menor citotoxicidade em células Vero ($CC_{50} = 105.7 \mu M$) e maior índice de seletividade ($IS = 2110$), logo, ambos derivados espiro-acridínicos possuem maior citotoxicidade. O AMTAC-22 exibiu índice de seletividade pouco mais elevado que o arcabouço AMTAC-01, desse modo as modificações moleculares aplicadas demonstraram melhor atividade promastigotocida, ainda associada com baixa seletividade que é um indicativo de potencial nefrotoxicidade. Porém, não se tem a inviabilização da inclusão desses derivados espiro-acridínicos no tratamento da leishmaniose, devido à atenuação da toxicidade através do desenvolvimento de formulações viáveis com a aplicação da tecnologia farmacêutica.

5.3 Estudo de ancoragem molecular

Após a fase dos testes *in vitro* preliminares envolvendo o AMTAC-22, notou-se promissora atividade mesmo em relação ao seu *scaffold* (AMTAC-01), contudo demonstraram nefrotoxicidade. Desse modo, foram propostos dois bioisómeros portando anéis heterocíclicos nitrogenados com variação no volume, sendo quinolina (AMTAC-21) e piridina (AMTAC-24), porém ambos apresentam maior polaridade assim como o AMTAC-22 em comparação ao AMTAC-01, tais derivados estão representados na figura 23 e foram analisados a partir de ancoragem molecular.

Figura 23- Derivados espiro-acridínicos avaliados por ancoragem molecular



Fonte: Aatoria (2021).

Tendo em vista o potencial leishmanicida associado aos derivados espiro-acridínicos, é interessante a avaliação comparativa entre eles e fármacos de referência utilizados como padrão que elevam a confiabilidade do estudo de ancoragem, visando validar o desempenho dos mesmos nos sítios de ligação dos alvos selecionados (topoisomerase I de *L. donovani*, tripanotona redutase e esterol 14 α -desmetilase de *L. infantum*) e direcionar possíveis mecanismos leishmanicidas.

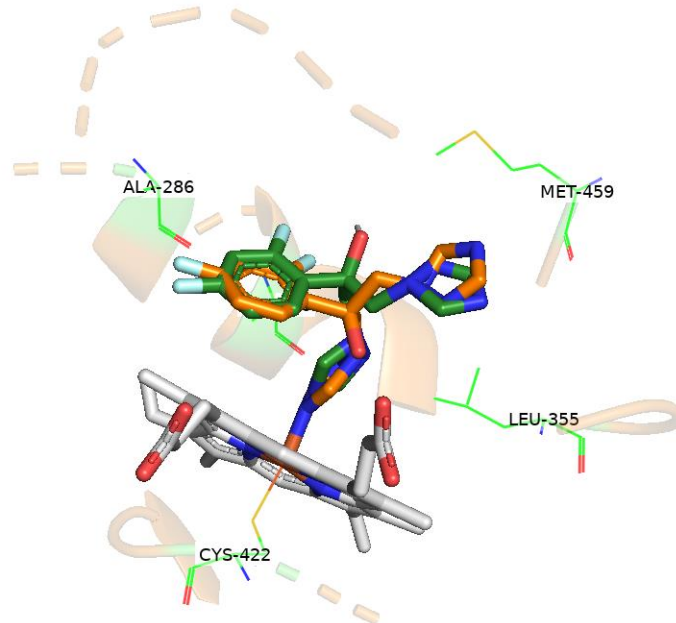
Na tabela 6, tem-se os valores de score atingidos pelos derivados espiro-acridínicos, fármacos de referência e ligantes, quando existentes. Sabe-se que o aumento da qualidade interativa da molécula inserida no sítio de ligação é traduzido em maior valor de score, logo enquanto mais elevado o valor de score, tem-se proporcional maior afinidade frente aos alvos selecionados para a avaliação *in silico* por meio da ancoragem molecular. Adicionalmente, os alvos que possuem ligantes cocristalizados foram validados a partir do *redocking*, apresentando valores de RMSD menores que 2.0 Å (BELL; ZHANG, 2019), cujas representações dos ligantes fluconazol e diaril pirrol são demonstrados nas figuras 24 e 25, respectivamente.

Tabela 6- Valores de score relativos à ancoragem molecular nos alvos em estudo

Compostos	CYP51 (3L4D)	Topo I (2B9S)	TR (4APN)
AMTAC 01	74.72	49.48	53.61
AMTAC 21	43.86	55.97	56.69
AMTAC 22	66.62	46.78	60.15
AMTAC 24	70.15	45.92	51.73
Cetoconazol	113.07	-	-
Camptotecina	-	53.24	-
Diflomotecano	-	56.42	-
Perfenazina	-	-	63.85
Mepacrina	-	-	62.04
Ligante Diaril pirrol	-	-	57.10
Ligante Fluconazol	69.42	-	-
RMSD (Å)	1.39	-	1.64

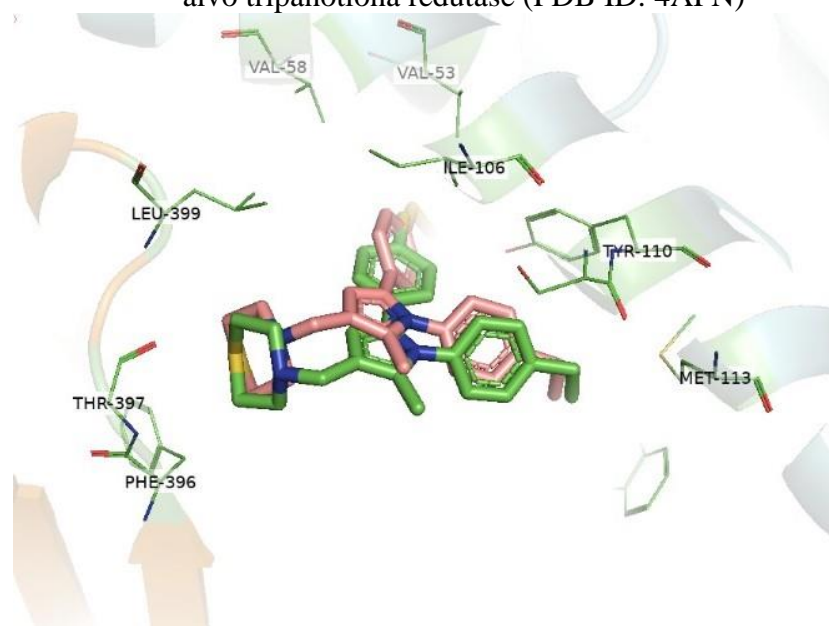
Fonte: Aatoria (2021).

Figura 24- Ligante fluconazol cocristalizado (verde) e ligante fluconazol redocado (laranja) no alvo esterol 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D)



Fonte: Aatoria (2021)

Figura 25- Ligante diaril pirrol cocristalizado (verde) e ligante diaril pirrol redocado (rosa) no alvo tripanotiona redutase (PDB ID: 4APN)



Fonte: Aatoria (2021).

Dentre os alvos selecionados para o estudo, tem-se a enzima esterol 14 α -desmetilase, também conhecida como CYP51, que é integrante da superfamília do citocromo P450 (CYP450) e atua na metabolização de diversos substratos orgânicos. Mais especificamente, esta enzima é responsável pela catálise oxidativa, remoção do grupamento 14 α -metil do núcleo de esterol e transferência de dois elétrons e dois prótons, a partir da ligação do substrato esterol ao

sítio ativo da enzima que possibilita a proximidade do grupamento 14 α -metil frente ao íon de ferro do grupo heme, localizado na porção central do anel de porfirina, desencadeando a redução do estado férrico (Fe³⁺) ao ferroso (Fe²⁺) (EMAMI; TAVANGAR; KEIGHOBADI, 2017).

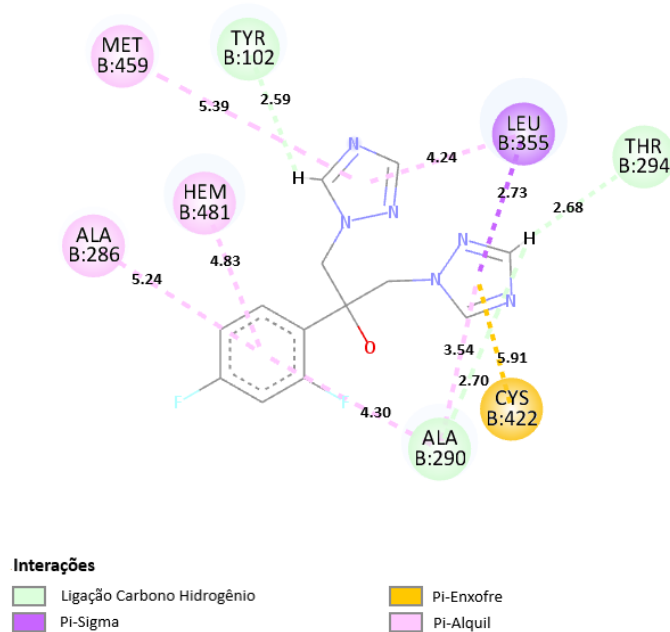
Além do grupo heme de ferro ligado a Cys422, o anel de porfirina é apoiado através de ligações de hidrogênio com cinco resíduos de aminoácidos principais: Tyr102, Tyr115, Arg123, Arg360 e His420, constituindo o sítio ativo deste alvo, cujo ligante cocrystalizado é o antifúngico fluconazol (PDB ID: 3L4D). De forma similar aos fungos, as membranas de *Leishmania* sp. são constituídas majoritariamente por ergosterol e esteróis semelhantes, em detrimento de colesterol que está presente nas células de mamíferos, sendo essenciais na regulação da fluidez e organização da membrana. Consequentemente, os antifúngicos azólicos foram reposicionados para o tratamento de leishmaniose, visto que tais fármacos possuem amplo espectro de atividade, com atuação na via biossintética do ergosterol através da inibição da enzima esterol 14 α -desmetilase dependente da CYP450 (EMAMI; TAVANGAR; KEIGHOBADI, 2017; HARGROVE *et al.*, 2011; MCCALL *et al.*, 2015).

A partir das interações estabelecidas pelo ligante fluconazol (figura 26), destaca-se a ligação carbono hidrogênio com Tyr102, apontado como resíduo essencial para o suporte do anel de porfirina somada às interações com o grupo heme (Hem481) e o resíduo conectado a ele (Cys422). Dentre os derivados espiro-acridínicos, o AMTAC-01 demonstrou maior afinidade em relação ao alvo, portando valor de score superior ao ligante fluconazol que é justificado através da interação de menor distância com Hem481, além da ligação de hidrogênio convencional com Tyr115 que também atua no suporte do anel porfirínico (figura 27), conferindo maiores pontuações em razão do tipo de ligação e reduzida distância, que intensifica a força associada à interação.

De acordo com os estudos descritos por Kulkarni e colaboradores (2013), o cetoconazol apresentou melhor atividade *in vitro* frente às formas promastigotas de *Leishmania donovani* que o fluconazol, exibindo valores de IC₅₀ = 1.67 \pm 0.12 e >50 μ g/mL, respectivamente. Visando realizar uma correlação da atividade demonstrada na literatura e ação no alvo CYP51, adicionou-se o cetoconazol ao estudo de ancoragem (figura 28) e este apresentou pontuação mais alta em relação ao fluconazol, devido às interações adicionais dentro do sítio ativo (Met105, Phe109 e Tyr115) e fora dele (Met459, Thr458 e Val356), compartilhando com o AMTAC-01 o alcance dos resíduos Tyr115 e Met105, não atingidos pelo fluconazol. Além de situar-se mais próximo dos resíduos em comum com o fluconazol, com destaque para o grupamento heme (Hem 481), cuja distância de interação é reduzida e o AMTAC-01 assume

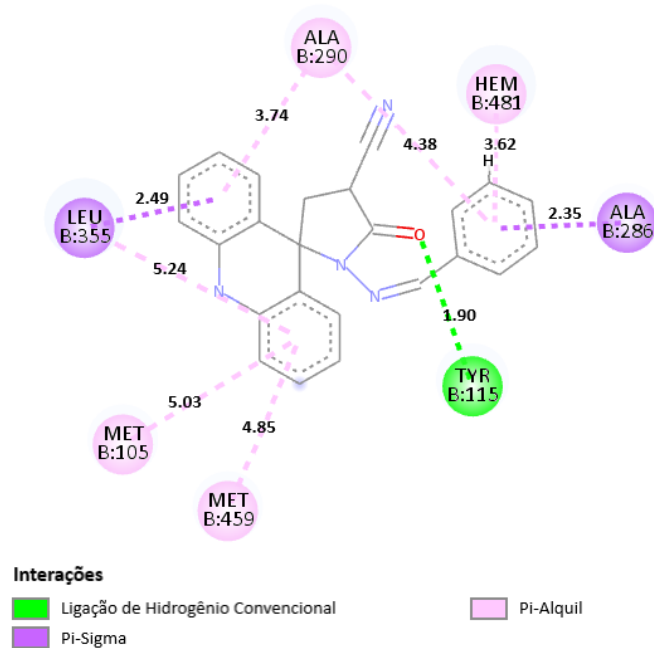
uma pose com capacidade interativa ainda mais próxima, garantindo maior força de interação e corroborando para uma melhor atividade no sítio de ligação.

Figura 26- Representação 2D do ligante fluconazol ancorado no alvo esterol 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D)



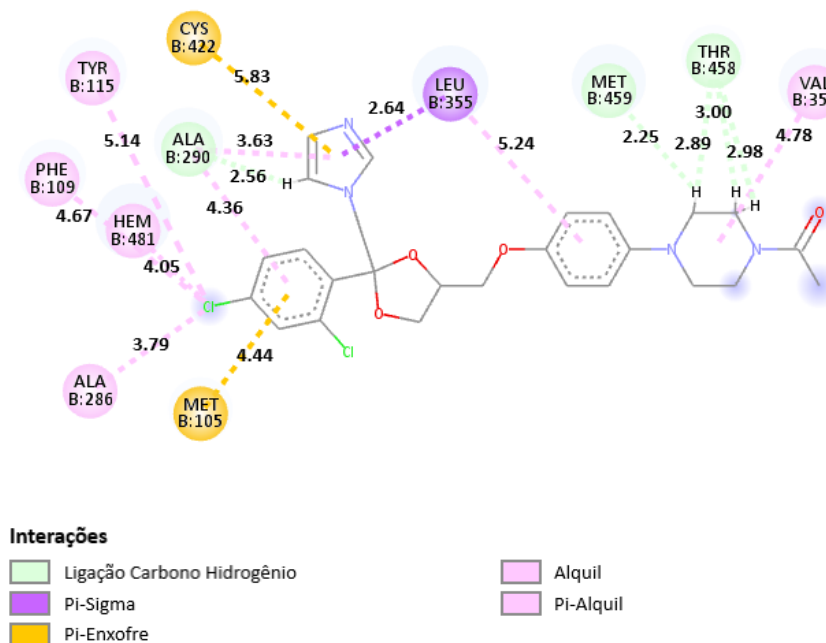
Fonte: Aatoria (2021).

Figura 27- Representação 2D do composto AMTAC-01 ancorado no alvo esterol 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D)



Fonte: Aatoria (2021).

Figura 28- Representação 2D do cetoconazol ancorado no alvo esteroil 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D)

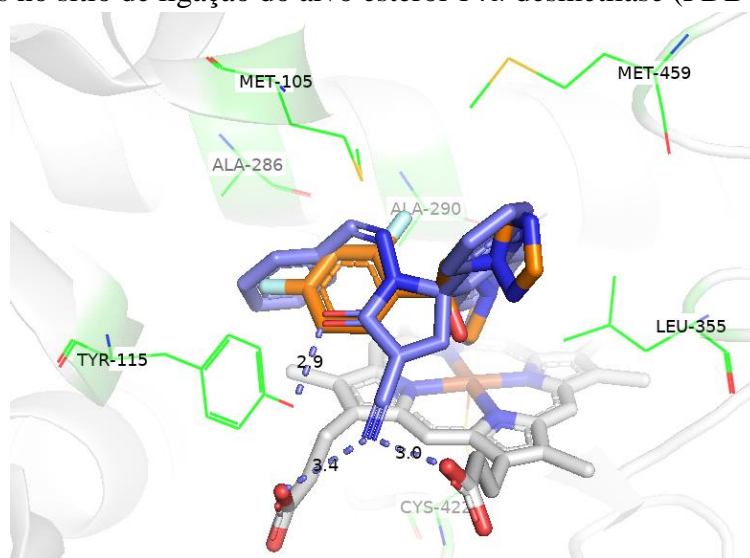


Fonte: Aatoria (2021).

Na figura 29, tem-se o inibidor padrão fluconazol e AMTAC-01 inseridos no sítio ativo, destaca-se que a capacidade interativa atribuída ao AMTAC-01 está relacionada ao alcance mais aproximado dos resíduos de aminoácidos relevantes no sítio de ligação. Devido à presença de ligações rotacionáveis que possibilitaram maior grau de liberdade conformacional aos anéis benzilideno e pirrol, resultando no encaixe mais favorável dentro do alvo. Com ênfase no menor volume do benzilideno que conferiu maior complementaridade no sítio ativo, sendo fundamentado pelo maior score dos derivados acridínicos com anéis menos volumosos (AMTAC-01 e AMTAC-24).

Adicionalmente, tem-se a importância do grupamento carbonílico inserido no anel pirrol, cuja atuação como acceptor de ligação de hidrogênio favoreceu o desempenho dos derivados espiro-acridínicos (AMTAC-01, AMTAC-22 e AMTAC-24), através de uma ligação próxima com Tyr115, enfatizado na literatura pela sua relevância associada à atividade no alvo. A partir do estudo não se pôde direcionar uma possível atividade do AMTAC-21 na CYP51, visto que o mesmo não assumiu um encaixe favorável no sítio de ligação predito pelo alvo cristalográfico utilizado, justificando a pontuação mais baixa associada a este composto.

Figura 29- Representação comparativa entre ligante fluconazol (laranja) e AMTAC-01 (roxo) ancorados no sítio de ligação do alvo esterol 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D)



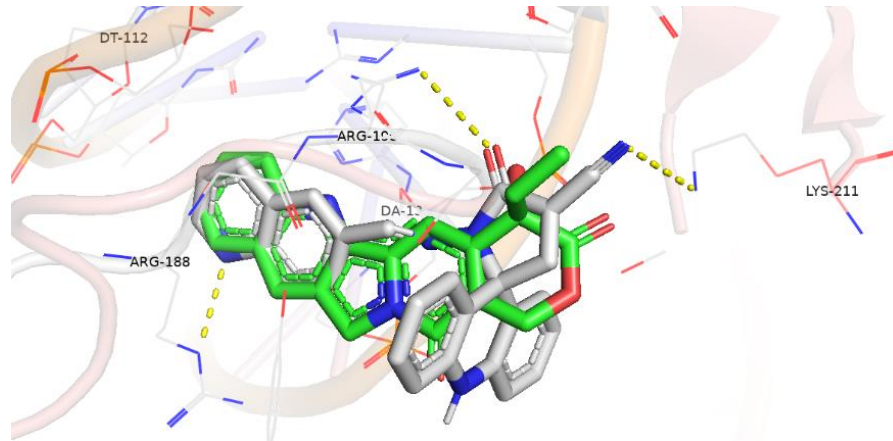
Fonte: Aatoria (2021).

No alvo topoisomerase I complexado ao DNA de *L. donovani* -LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S), realizou-se a ancoragem a partir do sítio de ligação que envolve o resíduo de aminoácido Arginina 190 (Arg190), tendo em vista sua influência na atividade inibitória da enzima, segundo estudo realizado por Mamidala *et al.* (2016). Selecionou-se a camptotecina e seu derivado diflomotecano como fármacos de referência, visto que conforme os resultados descritos por Bodley e Shapiro (1995), a camptotecina é capaz de promover a formação de adutos de DNA nuclear-proteína a partir da estabilização do complexo clivável, exibindo atividade citotóxica direcionada a *L. donovani*, com valor de $CE_{50} = 3.2 \mu\text{M}$. Adicionalmente, seu derivado diflomotecano obtido através da ampliação do Anel E para 7 membros, apresenta hidrólise retardada, tendo em vista que constitui uma instabilidade apresentada pela camptotecina (SÁENZ, 2016).

O score do AMTAC-21 foi equivalente aos fármacos de referência para este alvo e superou o desempenho da camptotecina, com poses representadas na figura 30, cujo sítio ativo inclui os resíduos Arg190, Lys211 e Tyr95 em comum ao estudo de ancoragem molecular envolvendo o derivado AMTAC-11 descrito por Almeida *et al.* (2021). Através da representação 2D exibida na figura 31, percebe-se que o AMTAC-21 realizou apenas ligações de hidrogênio com o resíduo Arg190, divergindo da camptotecina (figura 32) que além destas exibiu interação hidrofóbica. Adicionalmente, o anel quinolínico presente no AMTAC-21 e fármacos de referência possibilitou duas interações do tipo pi-alquil com distâncias semelhantes frente ao resíduo Arg188, constituindo possivelmente um dos fatores que favorecem as

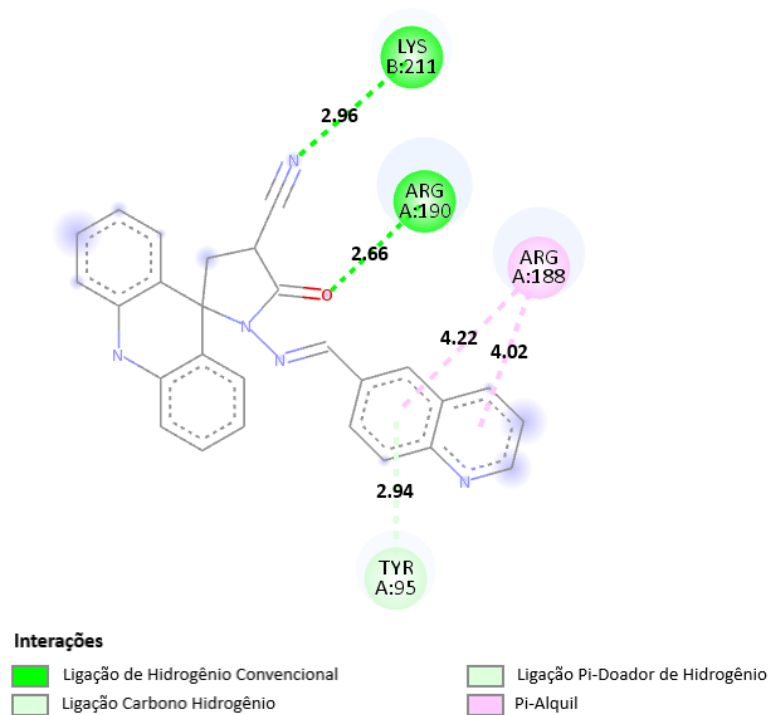
melhores pontuações atingidas por esses compostos, devido à ausência desse padrão interativo para os outros derivados espiro-acridínicos avaliados.

Figura 30- Camptotecina (verde) e AMTAC-21 (cinza) ancorados no sítio de ligação do alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)



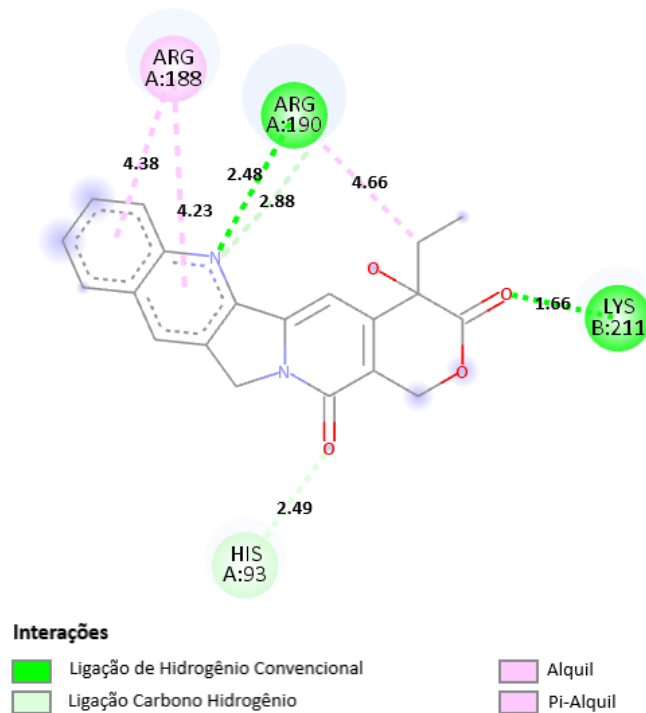
Fonte: Aatoria (2021).

Figura 31- Representação 2D do AMTAC-21 ancorado no alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)



Fonte: Aatoria (2021).

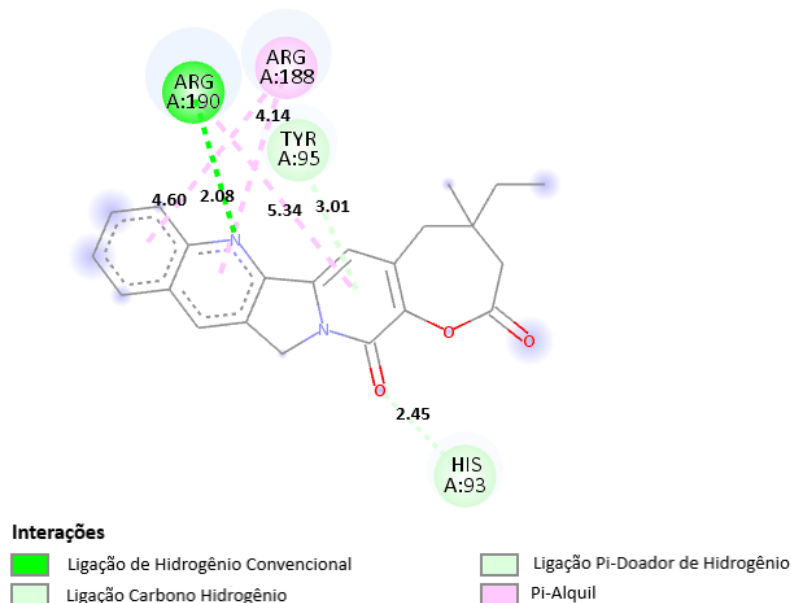
Figura 32- Representação 2D da camptotecina ancorada no alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)



Fonte: Aatoria (2021).

A camptotecina interagiu com o resíduo Lys211, enquanto o diflomotecano (figura 33) apresentou interação com Tyr95, contudo o AMTAC-21 demonstrou capacidade interativa com ambos os resíduos por meio de ligação de hidrogênio, enfatizando a ligação com Tyr95 que justifica maior score do AMTAC-21 em relação à camptotecina, apesar da mesma possuir ligação de hidrogênio mais forte com Lys211, em razão da menor distância ao comparar-se com a interação estabelecida pelo derivado híbrido espiro-acridínico quinolínico com este resíduo. Por fim, as ligações de hidrogênio existentes entre os fármacos de referência e His93 influenciaram diretamente na diferença de score entre o diflomotecano e AMTAC-21, visto que é ausente neste último.

Figura 33- Representação 2D do diflomotecano ancorado no alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)



Fonte: Aatoria (2021)

O promissor desempenho do AMTAC-21 que superou o inibidor, camptotecina, usado como padrão neste alvo, envolve a complementaridade geométrica entre o inibidor e a porção pirrol-imino-quinolina como observado na figura 30 tal conformação é permitida pelo maior volume e planaridade associados ao núcleo quinolínic que favoreceu o estabelecimento de ligação de hidrogênio diferencial com o resíduo Tyr95.

Por fim, tem-se a Tripanotiona Redutase (TR) que integra o mecanismo de defesa do sistema antioxidante da família Trypanosomatidae, através da atividade catalítica que mantém o ambiente intracelular dos parasitos reduzido, logo protege do estresse oxidativo (OTERO *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2018; TIWARI; TANWAR; MUNDE, 2018). O sítio catalítico, no qual a tripanotiona liga-se, constitui um excelente alvo que controla a sobrevivência dos parasitos e a maioria dos resíduos de aminoácidos são conservados em todas as espécies (TIWARI; TANWAR; MUNDE, 2018).

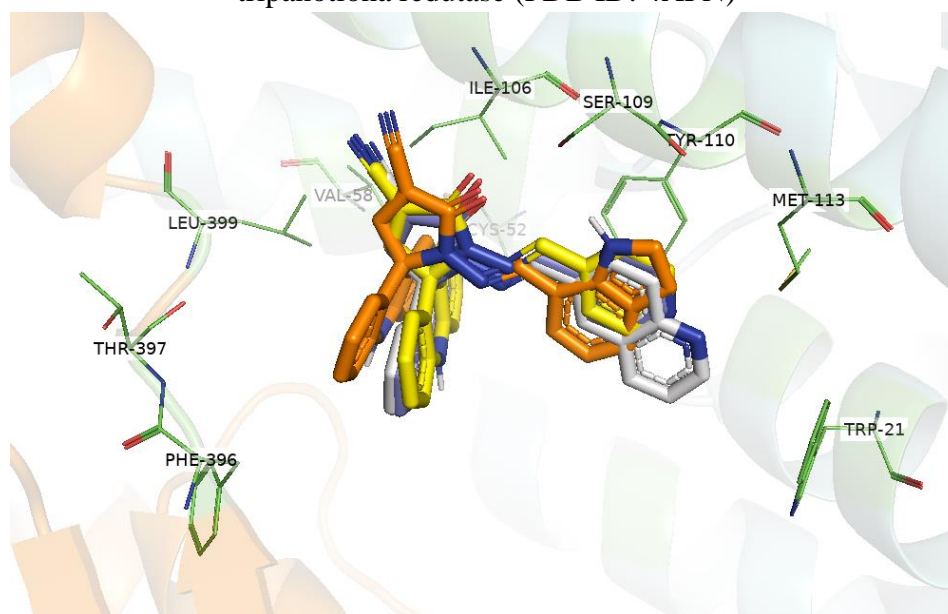
Nesse mecanismo de catálise, FAD atua como cofator e NADPH é um doador de elétrons que participa da redução do substrato dissulfeto em tióis, destacando a importância dos resíduos His461, Cys52 e Cys57 na condução adequada desta etapa. O sítio ativo é composto também por uma porção hidrofóbica (Trp21, Tyr110 e Met113) que estabiliza o complexo com o substrato de tripanotiona dissulfeto e não são identificados na glutathione redutase humana, cuja estrutura é polar. Adicionalmente, tem-se o “sítio Z” composto por Phe396, Pro398 e Leu399 que é próximo ao sítio ativo e pode ser explorado no desenvolvimento de inibidores

específicos direcionados à TR (KHAN *et al.*, 2007; TIWARI; TANWAR; MUNDE, 2018; VENKATESAN; SHUKLA; DUBEY, 2010).

As moléculas constituídas por tricíclicos são conhecidas pela atividade inibitória competitiva direcionada ao alvo, como por exemplo, a mepacrina que é um derivado acridínico e compostos portadores do núcleo fenotiazina também são enfatizados na literatura, em razão do seu potencial de inibição (TIWARI; TANWAR; MUNDE, 2018). Desse modo, selecionou-se a mepacrina e perfenazina como parâmetros para o estudo de ancoragem molecular no alvo tripanotona redutase (PDB ID: 4APN) cocristalizado com o ligante diaril pirrol (ligante).

Os derivados espiro-acridínicos, AMTAC-22 e AMTAC-21, que atingiram valores de score mais elevados, tratam-se dos bioisómeros que possuem núcleo mais volumoso, sugerindo que essa característica é favorável à interação e consequente maior afinidade nesse alvo, cujo sítio é caracterizado por ser expandido e hidrofóbico. Conforme observado na figura 34, a presença dos núcleos de quinolina e indol possibilitaram proximidade com resíduos adicionais em relação aos de volume reduzido (benzilideno e piridina).

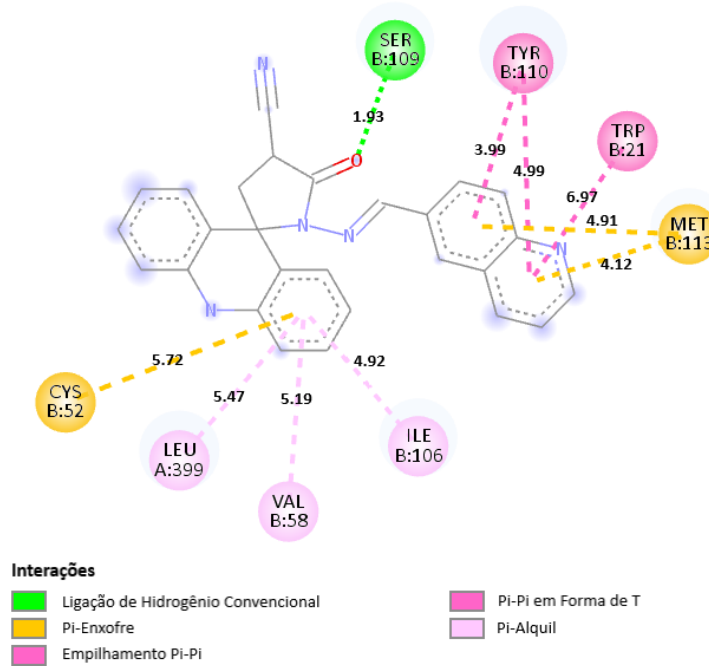
Figura 34- Representação 3D dos derivados espiro-acridínicos: AMTAC-01 (roxo), AMTAC-21 (branco), AMTAC-22 (laranja) e AMTAC-24 (amarelo) ancorados no alvo tripanotona redutase (PDB ID: 4APN)



Fonte: Aatoria (2021).

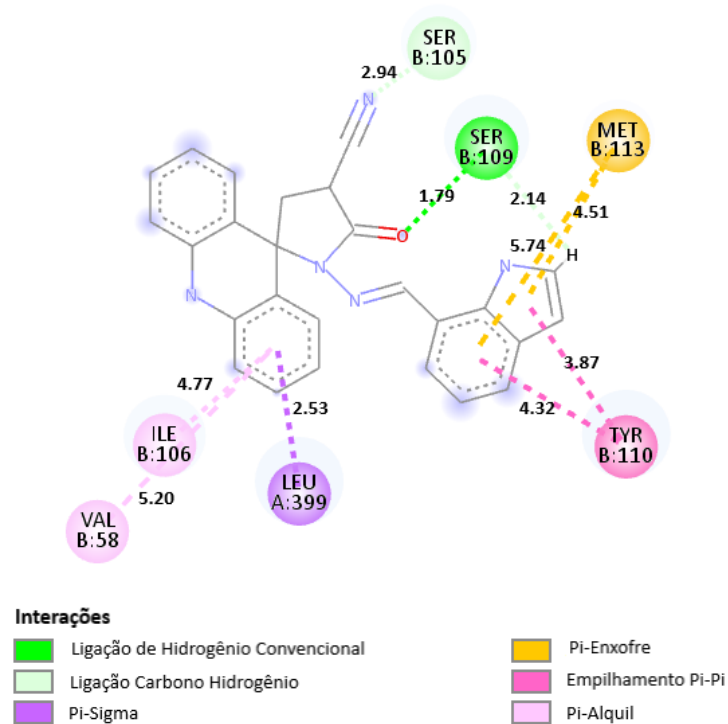
De acordo com as interações realizadas exibidas nas figuras 35 e 36, a justificativa para o score mais elevado obtido pelo AMTAC-22 envolve a interação pi mais próxima de Ile106 e ligação carbono hidrogênio com Ser105 e Ser109, porém o AMTAC-21 estabeleceu interações com a porção catalítica (Cys52), característica compartilhada com a perfenazina.

Figura 35- Representação 2D do AMTAC-21 ancorado no alvo tripanotiona redutase (PDB ID: 4APN)



Fonte: Aatoria (2021).

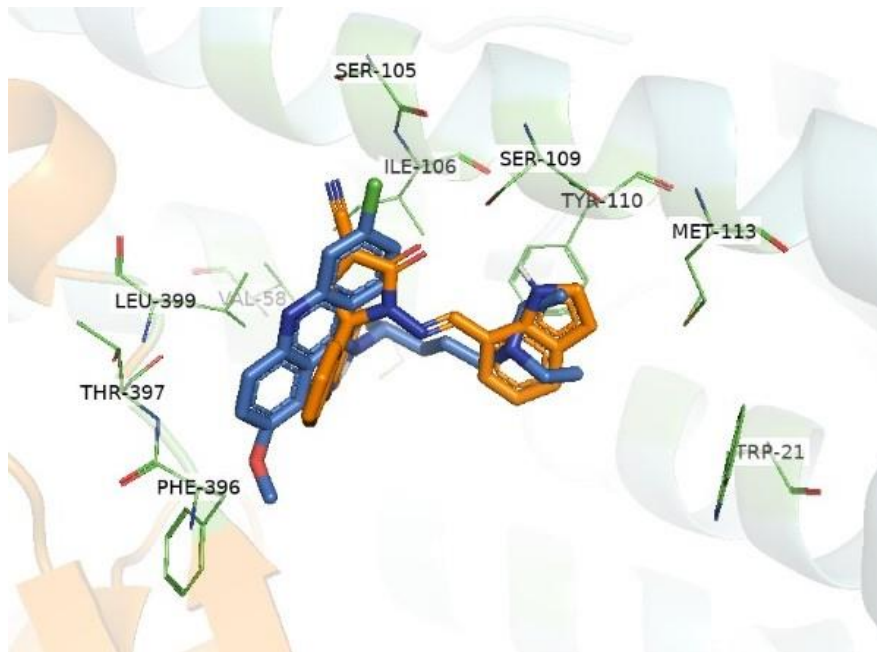
Figura 36- Representação 2D do composto AMTAC-22 ancorado no alvo tripanotiona redutase (PDB ID: 4APN)



Fonte: Aatoria (2021).

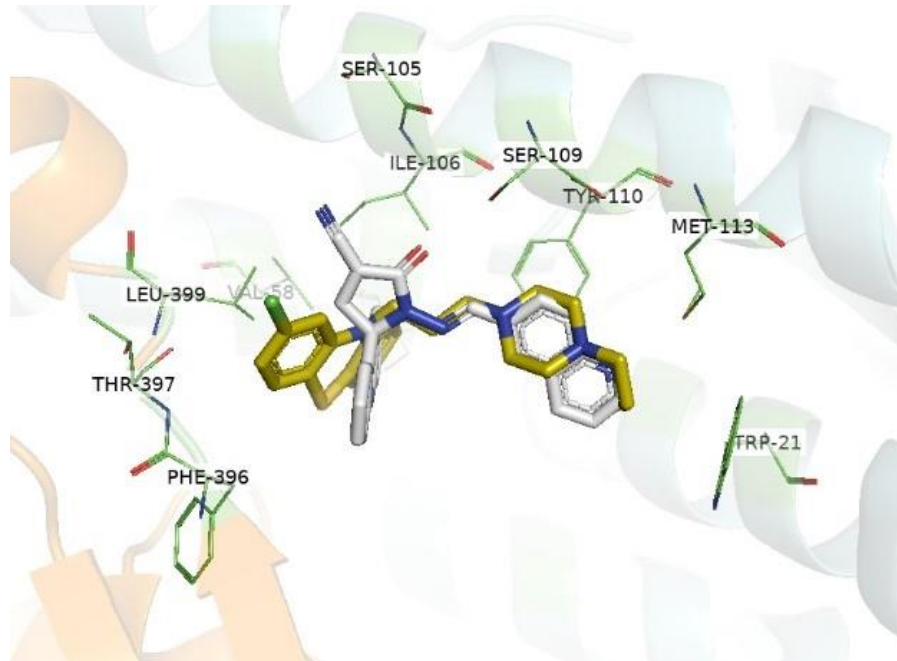
A partir das figuras 37 e 38, é possível estabelecer a relação de complementaridade entre a mepacrina e AMTAC-22, também evidenciada a partir da comparação da disposição do AMTAC-21 e perfenazina no sítio ativo, resultando em interações também semelhantes aos fármacos de referência (figuras 39 e 40), permitindo enfatizar que a mepacrina e o AMTAC-22 apresentaram interações pi com Tyr110 e Leu399, ligação carbono hidrogênio com Ser109, além de envolver os resíduos Val58 e Ile106, enquanto a semelhança avaliada entre a perfenazina e AMTAC-21 é justificada a partir das interações realizadas pelo núcleo acridínico e fenotiazínico com os resíduos Cys52, Val58 e Leu399 somadas às interações do tipo pi com Tyr110 e Trp21, assim como a relação observada com Ile106 e Ser109.

Figura 37- Representação comparativa entre mepacrina (Azul) e AMTAC-22 (Laranja) ancorados no sítio de ligação do alvo tripanotona Redutase (PDB ID: 4APN)



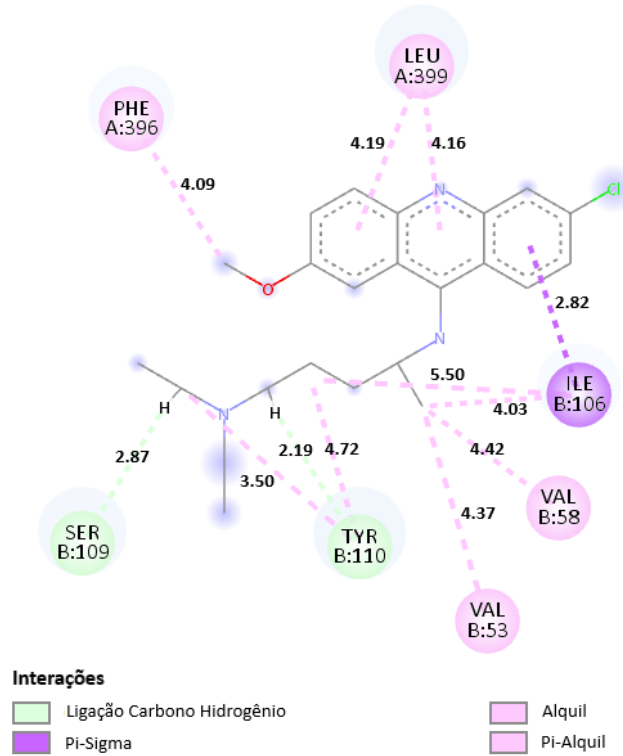
Fonte: Aatoria (2021).

Figura 38- Representação comparativa entre perfenazina (amarelo) e AMTAC-21 (branco) ancorados no sítio de ligação do alvo tripanotona Redutase (PDB ID: 4APN)



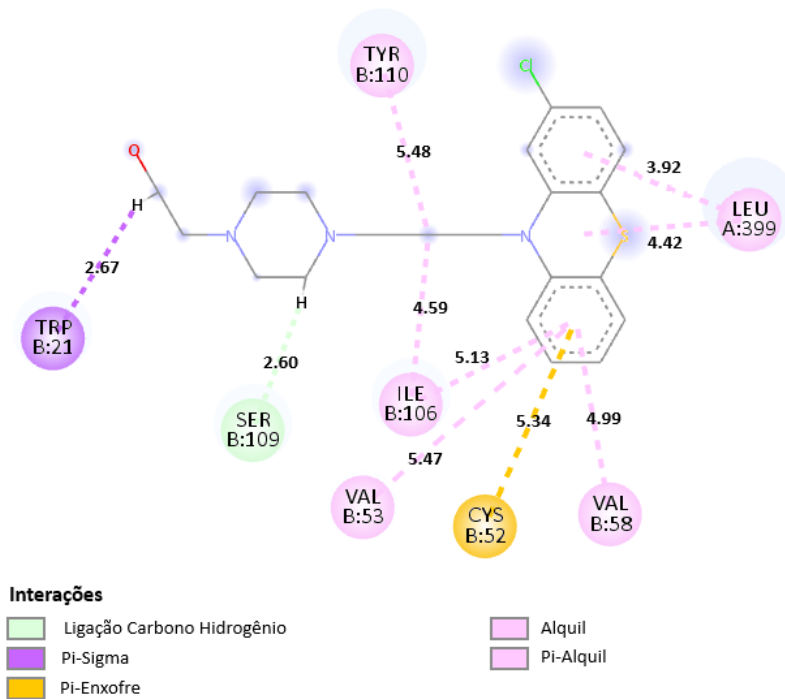
Fonte: Aatoria (2021).

Figura 39- Representação 2D da mepacrina ancorada no alvo tripanotona redutase (PDB ID: 4APN)



Fonte: Aatoria (2021).

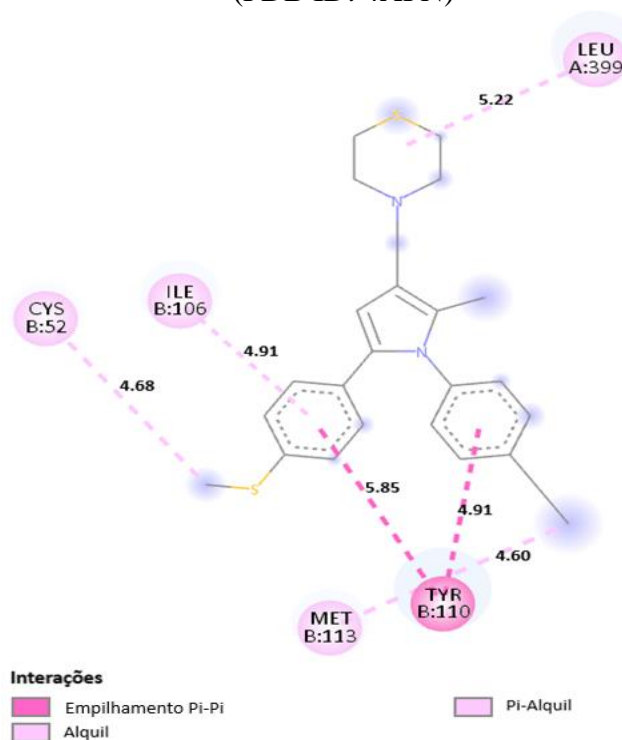
Figura 40- Representação 2D da perfenazina ancorada no alvo tripanotiona redutase (PDB ID: 4APN)



Fonte: Aatoria (2021).

Os derivados AMTAC-21 e AMTAC-22 compartilharam interações com os mesmos resíduos que o ligante diaril pirrol (figura 41), destacando maior valor de score atribuído ao AMTAC-22 em relação ao ligante, devido interações adicionais com Ser109, Ser105 e Val58, sendo algumas destas apontadas também para o AMTAC-21, que por sua vez demonstrou capacidade de interação com o sítio catalítico em conformidade com o alcance do ligante, porém enfatiza-se que foi o único composto que interagiu com três resíduos constituintes da porção hidrofóbica.

Figura 41- Representação 2D do ligante diaril pirrol ancorado no alvo tripanotona redutase (PDB ID: 4APN)



Fonte: Aatoria (2021).

5.4 Predição do perfil farmacocinético e de toxicidade (ADME-Tox)

A aplicação de estudos *in silico* visando predizer o perfil farmacocinético e de toxicidade ADME-Tox (Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) é uma etapa importante na pesquisa e desenvolvimento de fármacos, devido a identificação preliminar de fortes candidatos que se enquadram nos critérios de *druglikeness* (AGONI *et al.*, 2020; ALQAHTANI, 2017; KAR; LESZCZYNSKI, 2020). Através de plataformas online, como o SwissADME e pkCSM, avaliou-se o AMTAC-22 e seus bioisómeros (AMTAC-21 e AMTAC-24), assim como o *scaffold* AMTAC-01 para determinar a influência das modificações moleculares no perfil farmacocinético e de toxicidade desses compostos.

A etapa de absorção é determinante na biodisponibilidade, eficácia e via de administração de fármacos, estando associada à alguns aspectos, como por exemplo, solubilidade aquosa, lipofilicidade e absorção gastrointestinal. Na tabela 7, os dados relativos à solubilidade aquosa dos compostos espiro-acridínicos são classificados através do método de Ali, seguindo a escala: insolúvel<-10<pouco solúvel<-6<moderadamente solúvel<-4<solúvel<-2<muito<0<altamente (DAINA; MICIELI; ZOETE, 2017).

A avaliação da lipofilicidade pelo coeficiente de partição n-octanol/água Log $P_{o/w}$, levou em consideração os critérios de *druglikeness* estabelecidos por Ghose ($-0.4 \leq WLogP \leq 5.6$),

Egan ($WLogP \leq 5.88$) e Lipinski ($MLogP \leq 4,15$ ou $CLogP \leq 5$) (EGAN; MERZ; BALDWIN, 2000; GHOSE; VISWANADHAN, WENDOLOSKI, 1999; LIPINSKI *et al.*, 1997). Adicionalmente, a permeabilidade em Caco-2 (Linhagem Celular de Adenocarcinoma de Cólono Humano) que permite analisar a capacidade de absorção intestinal é considerada alta a partir de valores de Coeficiente de Permeabilidade Aparente ($\log P_{app}$) acima de 0.90×10^{-6} cm/s (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

Tabela 7- Perfil de solubilidade aquosa, lipofilicidade, absorção no trato gastrointestinal (TGI), absorção intestinal e permeabilidade Caco-2 dos derivados espiro-acridínicos

	AMTAC-01	AMTAC-21	AMTAC-22	AMTAC-24
Log S (Ali)	-5.34	-5.88	-5.79	-4.50
WLog P	3.44	3.99	3.92	2.84
MLog P	3.01	2.91	2.74	1.98
Absorção TGI	Alta	Alta	Alta	Alta
Absorção intestinal humana (%)	93.67	95.05	91.46	96.49
Permeabilidade Caco-2 (10^{-6} cm/s)	0.51	0.58	0.56	1.05

Fonte: Aatoria (2021)

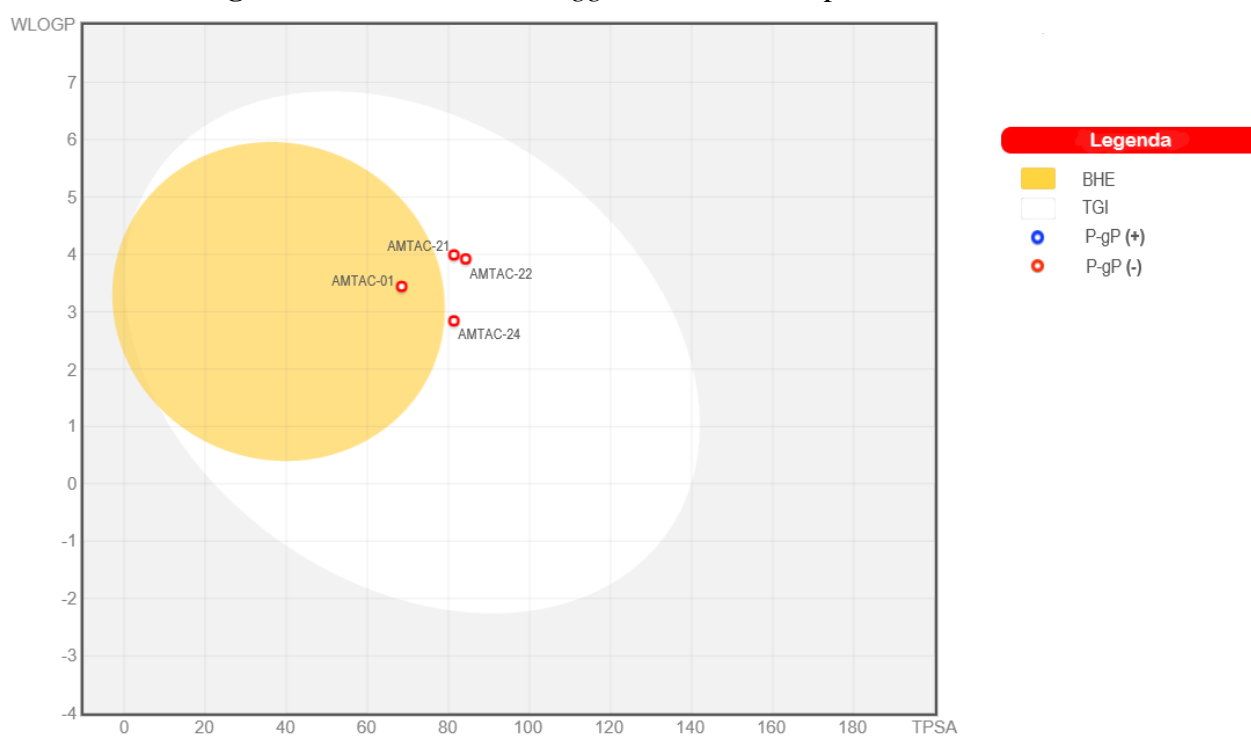
Os derivados espiro-acridínicos apresentaram solubilidade aquosa moderada, se enquadraram nos limites de $\log P$ ($WLogP$ e $MLogP$) estabelecidos por Ghose, Egan e Lipinski, assim como exibiram alta absorção gastrointestinal e porcentagem de absorção intestinal condizente, com valores de 91.46 a 96.49%. Destaca-se que o AMTAC-24 demonstrou maior potencial de solubilidade aquosa e esperado caráter lipofílico reduzido, resultando em maior porcentagem de absorção intestinal e alta permeabilidade em Caco-2 em relação aos outros compostos avaliados.

Através de estudos realizados por Egan, Merz e Baldwin (2000) para identificar moléculas bem absorvidas/ pouco absorvidas, com base nos descritores de polaridade e lipofilicidade, como área superficial polar (PSA) e $\log P$ (ALOGP98), respectivamente, delineou-se regiões específicas elípticas envolvendo moléculas com habilidade de permear a barreira hematoencefálica (BHE) ou com absorção no trato gastrointestinal (TGI) que leva em consideração mecanismos de transporte ativo e de efluxo associados à baixa absorção, sendo conhecido como “Egan egg” que deu origem ao *Boiled-Egg*, cuja fundamentação consiste na

área de superfície polar topológica (TPSA) e o coeficiente de partição n-octanol/água (WLOGP) de Wildman e Crippen (1999). O modelo *Boiled-Egg* é um método preditivo acerca da capacidade dos compostos analisados na permeabilidade da BHE, absorção no TGI e suscetibilidade de atuar como substrato da glicoproteína P (P-gP).

Na figura 42, observa-se a aplicação desse método preditivo aos derivados espiro-acridínicos. Destaca-se que as modificações moleculares decorrentes do bioisosterismo de anel, realizado no *scaffold* AMTAC-01, resultou no aumento da polaridade do AMTAC-22 e seus bioisómeros (AMTAC-21 e AMTAC-24), influenciando no bloqueio da permeabilidade através da BHE e como mencionado anteriormente, todos os compostos demonstram absorção no TGI, adicionalmente a não serem substratos da P-gp, facilitando a absorção desses derivados, visto que esta atua no efluxo de xenobióticos através das membranas biológicas, com localização cerebral e no intermédio da parede do TGI e lúmen.

Figura 42- Modelo *Boiled-Egg* dos derivados espiro-acridínicos



Fonte: Adaptado de SwissADME (2021).

Logo, tem-se que os derivados espiro-acridínicos possuem potencial para o desenvolvimento de futuras formulações para o tratamento da leishmaniose visceral (sistêmica), utilizando a via de administração oral que é caracterizada por maior segurança e adesão dos pacientes. Em contraposição, a Anfotericina B possui baixa solubilidade aquosa, 0% de

absorção intestinal humana e como consequência, tem-se a ausência de formulações orais desse fármaco disponíveis no mercado.

A seleção de compostos *drug-like*, ou seja, moléculas que compartilham das propriedades físico-químicas presentes na maioria dos fármacos já conhecidos, levam ao direcionamento de prováveis compostos biologicamente ativos que possuem potencial terapêutico, através do cumprimento dos critérios de *druglikeness* estabelecidos por Lipinski (“regra dos 5”), Ghose, Veber e Egan que estão destacados na tabela 8.

Tabela 8- Parâmetros considerados como critérios de *druglikeness*

Parâmetros de Druglikeness	
Lipinski	Peso molecular ≤ 500 $MLogP \leq 4,15$ Aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10 Doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5
Ghose	$160 \leq \text{Peso molecular} \leq 480$ $-0,4 \leq WLogP \leq 5,6$ $40 \leq \text{Refratividade molar} \leq 130$ $20 \leq \text{Átomos} \leq 70$
Veber	Ligações rotacionáveis ≤ 10 Área de superfície polar topológica ≤ 140
Egan	$WLogP \leq 5,88$ Área de superfície polar topológica $\leq 131,6$

Fonte: Adaptado de *SwissADME* (2021).

Dentre os compostos avaliados de acordo com os critérios de *druglikeness*, o AMTAC-01 e AMTAC-24 adequaram-se às regras, enquanto foi observada a violação da regra de Ghose para o AMTAC-21 e AMTAC-22 que demonstraram valores de refratividade molar de 133.49 e 130.05, respectivamente. A diferença dos resultados atingidos por estes últimos não constitui grande distanciamento do parâmetro estabelecido por Ghose, principalmente o AMTAC-22. Desse modo, os derivados espiro-acridínicos possuem potencial de biodisponibilidade e compartilham das características presentes em fármacos já conhecidos, relacionando-os com provável atividade terapêutica.

Durante a biotransformação, cerca de 90% das moléculas terapêuticas são substratos de cinco isoformas da CYP450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4),

envolvidas na etapa I do metabolismo de fármacos através da oxidação, cuja inibição exerce influência nas interações medicamentosas, devido ao acúmulo de metabólitos e consequentes efeitos tóxicos (DAINA; MICIELI; ZOETE, 2017; MOROY *et al.*, 2012). Os derivados espiro-acridínicos apresentaram o perfil de inibição das isoformas CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4, com exceção da CYP2D6 que constitui uma via alternativa associada à 30% da metabolização de xenobióticos e é menos reconhecida pelos fármacos devido ao seu polimorfismo. Atualmente, muitos fármacos inclusos na terapêutica estão envolvidos na inibição de isoformas da CYP450 (MANIKANDAN; NAGINI, 2018), logo tal perfil não impede a utilização dos derivados espiro-acridínicos.

Na avaliação do perfil de toxicidade dos compostos, aponta-se que a substituição do benzilideno por núcleos heterocíclicos nitrogenados resultou no aumento da hepatotoxicidade. Porém, o antifúngico azólico cetoconazol, amplamente utilizado no tratamento de diversas infecções tópicas e sistêmicas a partir da estratégia de reposicionamento de fármacos pode ser aplicado no tratamento de leishmaniose, também apresenta potencial hepatotoxicidade, mas não inviabiliza sua notoriedade na prática clínica. Adicionalmente, a predição *in silico* é apenas um direcionamento, contudo são necessários testes *in vitro* e *in vivo* para garantir a segurança dos derivados espiro-acridínicos propostos.

6 CONCLUSÃO

Em consequência da aplicação do bioisosterismo de anel, o AMTAC-22 apresentou melhor atividade frente às formas promastigotas de *Leishmania infantum* em comparação ao *scaffold* AMTAC-01 e não demonstraram potencial hemolítico, nas concentrações avaliadas, em contraste com o fármaco de referência (anfotericina B). Porém, exibiram nefrotoxicidade, que não impede sua utilização, uma vez que existem fármacos com perfil nefrotóxico que são utilizados na clínica. Além disso, destaca-se o avanço no desenvolvimento da tecnologia farmacêutica que possibilita uma redução nos impactos de toxicidade.

Tais derivados somados aos dois bioisósteros propostos adicionalmente foram avaliados a partir do estudo de ancoragem molecular nos alvos CYP51, LTopo IB-DNA e tripanotona redutase, destacando o desempenho dos derivados AMTAC-01, AMTAC-21 e AMTAC-22, cuja aplicação da estratégia de modificação molecular foi responsável pelo direcionamento destes compostos em alvos diferentes, com os quais exibiram elevada afinidade e estabeleceram interações com resíduos de aminoácidos relevantes, apresentando complementaridade em relação aos fármacos usados como padrão.

Também observou-se a influência da modificação estrutural em relação ao perfil farmacocinético e de toxicidade, com elevação da polaridade dos derivados AMTAC-21, AMTAC-22 e AMTAC-24, resultando no bloqueio da permeabilidade através da barreira hematoencefálica, porém todos os derivados espiro-acridínicos apresentaram alta absorção gastrointestinal com destaque para o AMTAC-24 que demonstrou alta permeabilidade em Caco-2, validando o promissor potencial desses compostos no desenvolvimento de futuras formulações de administração oral. Por fim, a substituição do anel benzilideno por núcleos heterocíclicos nitrogenados aumentou hepatotoxicidade associada a esses compostos, mas não inviabiliza a sua potencialidade e utilização na terapia, visto que fármacos inclusos na prática clínica possuem tal perfil e trata-se de uma informação preditiva, necessitando de avaliações *in vitro* e *in vivo*.

A partir da avaliação *in silico*, os bioisósteros AMTAC-21 e AMTAC-24 destacaram-se pelo potencial farmacodinâmico e farmacocinético, respectivamente. Logo, propõe-se a posterior avaliação de sua atividade leishmanicida e perfil farmacocinético *in vitro*, visando estabelecer uma correlação com os resultados obtidos *in silico* e enfatizar a relevância da aplicação do bioisosterismo de anel como estratégia de modificação molecular.

REFERÊNCIAS

- AGONI, C.; OLOTU, F. A.; RAMHARACK, P.; SOLIMAN, M. E. Druggability and drug-likeness concepts in drug design: are biomodelling and predictive tools having their say?. **Journal of molecular modeling**, v. 26, n. 120, p. 1-11, 2020.
- AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- ALBINO, S. L.; SILVA, J. M.; NOBRE, M. S. C.; SILVA, Y. M. S. M.; SANTOS, M. B.; ARAÚJO, R. S. A.; LIMA, M. C. A.; SCHMITT, M.; MOURA, R. O. Bioprospecting of Nitrogenous Heterocyclic Scaffolds with Potential Action for Neglected Parasitosis: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 33, p. 4112-4150, 2020.
- ALMEIDA, F. S. **Estudo *in silico* com possíveis alvos terapêuticos e *in vitro* anti-leishmania de derivados espiro-acridínicos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, 2018.
- ALMEIDA, F. S.; SOUSA, G. L. S.; ROCHA, J. C.; RIBEIRO, F. F.; OLIVEIRA, M. R.; GRISI, T. C. S. L.; ARAÚJO, D. A. M.; NOBRE, M. S. C.; CASTRO, R. N.; AMARAL, I. P. G.; KEESEN, T. S. L.; MOURA, R. O. In vitro anti-Leishmania activity and molecular docking of spiro-acridine compounds as potential multitarget agents against *Leishmania infantum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 49, p. 128289, 2021.
- ALMEIDA, S. M. V.; LAFAYETTE, E. A.; SILVA, W. L.; SERAFIM, V. L.; MENEZES, T. M.; NEVES, J. L.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MOURA, R. O.; BELTRÃO, E. I. C.; JÚNIOR, L. B. C.; LIMA, M. C. A.. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International journal of biological macromolecules**, v. 92, p. 467-475, 2016.
- ALMEIDA, S. M. V.; RIBEIRO, A. G.; SILVA, G. C. L.; ALVES, J. E. F.; BELTRÃO, E. I. C.; OLIVEIRA, J. F.; JUNIOR, L. B. C.; LIMA, M. C. A. DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents?. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1538-1556, 2017.
- ALQAHTANI, S. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 13, n. 11, p. 1147-1158, 2017.
- AMARO, R. E.; BAUDRY, J.; CHODERA, J.; DEMIR, O.; MCCAMMON, J. A.; MIAO, Y.; SMITH, J. C. Ensemble docking in drug discovery. **Biophysical journal**, v. 114, n. 10, p. 2271-2278, 2018.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2008.

BATES, P. A. Revising *Leishmania*'s life cycle. **Nature microbiology**, v. 3, n. 5, p. 529-530, 2018.

BATTISTA, T.; COLOTTI, G.; ILARI, A.; FIORILLO, A. Targeting trypanothione reductase, a key enzyme in the redox trypanosomatid metabolism, to develop new drugs against leishmaniasis and trypanosomiasis. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1924, 2020.

BELL, E. W.; ZHANG, Y. DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2019.

BENASSI, J. C. **Detecção de *Leishmania* spp. por PCR em tempo real em amostra de suabe conjuntival de cães, gatos e equinos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Faculdade de Zootecnia e Engenharia dos Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassunga, SP, 2015.

BENSON, T. J.; MCKIE, J. H.; GARFORTH, J.; BORGES, A.; FAIRLAMB, A. H.; DOUGLAS, K. T. Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase. Phenothiazines and related tricyclics as lead structures. **Biochemical Journal**, v. 286, n. 1, p. 9-11, 1992.

BODLEY, A. L.; SHAPIRO, T. A. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and *Leishmania*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 9, p. 3726-3730, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v.392, n.10151, p.951-970, 2018.

CAPELA, R.; MOREIRA, R.; LOPES, F. An overview of drug resistance in protozoal diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 22, p. 5748, 2019.

CAROLE, D. G.; MICHEL, D. M.; JULIEN, C.; FLORENCE, D.; ANNA, N.; SÉEVERINE, J.; GÉRARD, D.; PIERRE, T. D.; PIERRE, G. J. Synthesis and antileishmanial activities of 4, 5-di-substituted acridines as compared to their 4-mono-substituted homologues. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 19, p. 5560-5568, 2005.

CARVALHO, Y. M. B. G.; SHANMUGAM, S.; BATISTA, M. S.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S.; JÚNIOR, L. J. Q. Pharmaceutical agents for treatment of leishmaniasis: a patent landscape. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 30, n. 8, p. 633-641, 2020.

CASTRO, J. C. **Investigação da fauna flebotomínica e sua infecção natural por *Leishmania* spp., no município de Lavras, MG, Brasil**. 2017. Dissertação (Mestrado em

Ciências Veterinárias)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2017..

CHEN, Y. C. Beware of docking!. **Trends in pharmacological sciences**, v. 36, n. 2, p. 78-95, 2015.

CHEN, G.; SEUKEP, A. J.; GUO, M. Recent Advances in Molecular Docking for the Research and Discovery of Potential Marine Drugs. **Marine drugs**, v. 18, n. 11, p. 545, 2020.

CHTITA, S.; GHAMALI, M.; HMAMOUCHE, R.; ELIDRISSI, B.; BOURASS, M.; LARIF, M.; BOUACHRINE, M.; LAKHLIFI, T. Investigation of Antileishmanial Activities of Acridines Derivatives against Promastigotes and Amastigotes Form of Parasites Using Quantitative Structure Activity Relationship Analysis. **Advances in Physical Chemistry**, 2016.

CRUZ, A. K.; TOLEDO, J. S.; FALADE, M.; TERRÃO, M. C.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; KYLE, D. E.; UTHAIPIBULL, C. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: a review. **Current drug targets**, v. 10, n. 3, p. 178-192, 2009.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

DAVIDSON, R. N.; DEN BOER, M.; RITMEIJER, K. Paromomycin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 7, p. 653-660, 2009.

DAVIES, D. R.; MUSHTAQ, A.; INTERTHAL, H.; CHAMPOUX, J. J.; HOL, W. G. J. The structure of the transition state of the heterodimeric topoisomerase I of *Leishmania donovani* as a vanadate complex with nicked DNA. **Journal of molecular biology**, v. 357, n. 4, p. 1202-1210, 2006.

DI GIORGIO, C.; DELMAS, F.; FILLOUX, N.; ROBIN, M.; SEFERIAN, L.; AZAS, N.; GASQUET, M.; COSTA, M.; DAVID, P. T.; GALY, J. P. In vitro activities of 7-substituted 9-chloro and 9-amino-2-methoxyacridines and their bis- and tetra-acridine complexes against *Leishmania infantum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 174-180, 2003.

DI GIORGIO, C.; SHIMI, K.; BOYER, G.; DELMAS, F.; GALY, J. P. Synthesis and antileishmanial activity of 6-mono-substituted and 3, 6-di-substituted acridines obtained by acylation of proflavine. **European journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1277-1284, 2007.

DORLO, T. P. C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

EGAN, W. J.; MERZ, K. M.; BALDWIN, J. J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 21, p. 3867-3877, 2000.

EJAZI, S. A.; ALI, N. Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 11, n. 1, p. 79-98, 2013.

ELMAHALLAWY, E. K.; ALKHALDI, A. AM; SALEH, A. A. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 139, p. 111671, 2021.

EMAMI, S.; TAVANGAR, P.; KEIGHOBADI, M. An overview of azoles targeting sterol 14 α -demethylase for antileishmanial therapy. **European journal of medicinal chemistry**, v. 135, p. 241-259, 2017.

FLORES, G. V. A.; PACHECO, C. M. S.; OCHOA, W. H. S.; GOMES, C. M. C.; ZÚNIGA, C.; CORBETT, C. P.; LAURENTI, M. D. Th17 lymphocytes in atypical cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Central America. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 11, p. e12772, 2020.

FONSECA, B. P.; ALBUQUERQUE, P. C.; ZICKER, F. Neglected tropical diseases in Brazil: lack of correlation between disease burden, research funding and output. **Tropical Medicine & International Health**, v. 25, n. 11, p. 1373-1384, 2020.

FREITAS, V. C. **O processo de interação de *Leishmania (Leishmania) chagasi* com *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e a importância do lipofosfoglicano (LPG)**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, 2010.

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.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; GÓMEZ-PÉREZ, V.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Fitness of *Leishmania donovani* parasites resistant to drug combinations. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003704, 2015.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. **Journal of combinatorial chemistry**, v. 1, n. 1, p. 55-68, 1999.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GOUVEIA, R. G. ; RIBEIRO, A. G. ; PINHEIRO SEGUNDO, M. A. S. ; OLIVEIRA, J. F. ; LIMA, M. C. A. ; SOUZA, T. R. C. L. ; ALMEIDA, S. M. V. ; MOURA, R. O. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 26, n. 22, p. 5911-5921, 2018.

- HARGROVE, T. Y.; WAWRZAK, Z.; LIU, J.; NES, W. D.; WATERMAN, M. R.; LEPESHEVA, G. I. Substrate preferences and catalytic parameters determined by structural characteristics of sterol 14 α -demethylase (CYP51) from *Leishmania infantum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 30, p. 26838-26848, 2011.
- HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different *Leishmania* species drive distinct neutrophil functions. **Trends in parasitology**, v. 32, n. 5, p. 392-401, 2016.
- ILARI, A.; FIORILLO, A.; GENOVESE, I.; COLOTTI, G. Polyamine-trypanothione pathway: an update. **Future medicinal chemistry**, v. 9, n. 1, p. 61-77, 2017.
- JAIN, V.; JAIN, K. Molecular targets and pathways for the treatment of visceral leishmaniasis. **Drug discovery today**, v. 23, n. 1, p. 161-170, 2018.
- JACOBY, E. M.; SCHLICHTING, I.; LANTWIN, C. B.; KABSCH, W.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Crystal structure of the Trypanosoma cruzi trypanothione reductase· mepacrine complex. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 24, n. 1, p. 73-80, 1996.
- JIA, Z. L., CEN, J., WANG, J. B., ZHANG, F.; XIA, Q.; WANG, X.; CHEN, X. Q.; WANG, R. C.; HSIAO, C. D.; LIU, K. C.; ZHANG, Y. Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity in zebrafish larvae: activation of ROS-mediated ERS, apoptosis and the Nrf2 pathway. **Chemosphere**, v. 227, p. 541-550, 2019.
- KAPIL, S.; SINGH, P. K.; SILAKARI, O. An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis. **European journal of medicinal chemistry**, v. 157, p. 339-367, 2018.
- KAR, S.; LESZCZYNSKI, J. Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 15, n. 12, p. 1473-1487, 2020.
- KHAN, M. O. F. Trypanothione reductase: a viable chemotherapeutic target for antitrypanosomal and antileishmanial drug design. **Drug target insights**, v. 2, p. 117739280700200007, 2007.
- KUMAR, S.; ALI, M. R.; BAWA, S. Mini review on tricyclic compounds as an inhibitor of trypanothione reductase. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 6, n. 4, p. 222, 2014.
- KULKARNI, M. M.; REDDY, N.; GUDE, T.; MCGWIRE, B. S. Voriconazole suppresses the growth of Leishmania species in vitro. **Parasitology research**, v. 112, n. 5, p. 2095-2099, 2013.
- LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, p. 1456-1468, 2007.
- LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.
- LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Beyond bioisosterism: new concepts in drug discovery. **Comprehensive Medicinal Chemistry III**, v.1, n.3, p. 186-210, 2017.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

MAMIDALA, R.; MAJUMDAR, P.; JHA, K. K.; BATHULA, C.; AGARWAL, R.; CHARY, M. T.; MAJUMDER, H. K.; MUNSHI, P.; SEN, S. Identification of *Leishmania donovani* Topoisomerase 1 inhibitors via intuitive scaffold hopping and bioisosteric modification of known Top 1 inhibitors. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

MANIKANDAN, P.; NAGINI, S. Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review. **Current drug targets**, v. 19, n. 1, p. 38-54, 2018.

MANZANO, J. I.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3719-3730, 2013.

MARAN, N.; GOMES, P. S.; LIMA, L. F.; FREITAS, E. O.; LIMA, C. G. F.; MORROT, A. Host resistance to visceral leishmaniasis: prevalence and prevention. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 14, n. 4, p. 435-442, 2016.

MARHADOUR, S.; MARCHAND, P.; PAGNIEZ, F.; BAZIN, M. A.; PICOT, C.; LOZACH, O.; RUCHAUD, S.; ANTOINE, M.; MEIJER, L.; RACHIDI, N.; LE PAPE, P. Synthesis and biological evaluation of 2, 3-diarylimidazo [1, 2-a] pyridines as antileishmanial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 58, p. 543-556, 2012.

MAUEL, J.; GAMAGE, W. D.; RANSIJN, A.; WOJCIK, S.; FIGGITT, D.; RALPH, R. 9-Anilinoacridines as potential antileishmanial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 991-996, 1993.

MCCALL, L. I.; AROUSSI, A. E.; CHOI, J. Y.; VIEIRA, D. F.; MUYLDER, G.; JOHNSTON, J. B.; CHEN, S.; KELLAR, D.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; ROUSH, W. R.; PODUST, L. M.; MCKERROW, J. H. Targeting ergosterol biosynthesis in *Leishmania donovani*: essentiality of sterol 14 α -demethylase. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003588, 2015.

MENG, X. Y.; ZHANG, H. X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011.

MESA, C.; CABEZAS, N. R.; CASTILLA, J. J.; LINDEZ, V. M.; BARBE, J.; MORENO, M. S.; OSUNA, A. In vitro and in vivo Activities of Three Acridine Thioethers against *Leishmania donovani*. **Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 74-82, 2002.

MOREIRA, D. S. **Caracterização molecular de transportadores ABC e análise dos níveis intracelulares de antimônio em populações de *Leishmania spp.* do Novo Mundo sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, 2012.

MOROY, G.; MARTINY, V. Y.; VAYER, P.; VILLOUTREIX, B. O.; MITEVA, M. A. Toward in silico structure-based ADMET prediction in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 17, n. 1-2, p. 44-55, 2012.

MUEGGE, I.; HEALD, S. L.; BRITTELLI, D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. **Journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 12, p. 1841-1846, 2001.

OLIVEIRA, L. F. G. **Nova proposta para o tratamento da Leishmaniose tegumentar usando antimoniato de meglumina e oxiranos em associação**. 2018. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2018.

OPREA, T. I. Property distribution of drug-related chemical databases. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 14, n. 3, p. 251-264, 2000.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. OPAS/OMS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. Informe de Leishmanioses. Washington, DC, n. 8, Dez 2019. Disponível em:
https://www.rets.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/arquivos/biblioteca/leishreport8_por.pdf. Acesso em: 19 jun. 2021

OTERO, L.; VIEITES, M.; BOIANI, L.; DENICOLA, A.; RIGOL, C.; OPAZO, L.; AZAR, C. O.; MAYA, J. D.; MORELLO, A.; SIEGEL, R. L. K.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E.; GONZÁLEZ, M.; GAMBINO, D.; CERECETTO, H. Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3322-3331, 2006.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of infection**, v. 69, n.S1, p.S10-S18, 2014.

PAWLOWSKI, R.; STANEK, F.; STODULSKI, M. Recent advances on metal-free, visible-light-induced catalysis for assembling nitrogen-and oxygen-based heterocyclic scaffolds. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1533, 2019.

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. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 9, p. 1695-1712, 2010.

PINHEIRO-SEGUNDO, M. A. S. **Desenvolvimento, avaliação preliminar da atividade antiproliferativa e incremento de solubilidade de novos derivados espiro-acridínicos**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2020.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. 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.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.

POLONIO, T.; EFFERTH, T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products. **International journal of molecular medicine**, v. 22, n. 3, p. 277-286, 2008.

PONTE-SUCRE, A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, J. C.; BARRETT, M. P.; VÉLEZ, R. L.; HERNÁNDEZ, R. G.; POUNTAIN, A. W.; MWENECHANYA, R.; PAPADOPOULOU, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 2017.

PRADA, C. F.; VELILLA, R. A.; FOUCE, R. B.; PRIETO, C.; ÁLVAREZ, E. C.; MARTÍNEZ, J. M. E.; REQUENA, J. M.; ORDÓÑEZ, C.; DESIDERI, A.; PERTEJO, Y. P.; REGUERA, R. M. Gimatécán and other camptothecin derivatives poison *Leishmania* DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. **Biochemical pharmacology**, v. 85, n. 10, p. 1433-1440, 2013.

REGUERA, R. M.; VELILLA, R. A.; ASENJO, B. D.; CORBO, C. G.; FOUCE, R. B.; CUSHMAN, M.; PERTEJO, Y. P. Antiparasitic effect of synthetic aromatécins on *Leishmania infantum*. **BMC veterinary research**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2019.

REVUELTO, A.; SANTAQUITERIA, M. R.; LUCIO, H.; GAMO, A.; CARRILES, A. A.; GUTIÉRREZ, K. J.; MURCIA, P. A. S.; HERMOSO, J. A.; GAGO, F.; CAMARASA, M. J.; RUIZ, A. J.; VELÁZQUEZ, S. Pyrrolopyrimidine vs imidazole-phenyl-thiazole scaffolds in nonpeptidic dimerization inhibitors of *Leishmania infantum* trypanothione reductase. **ACS infectious diseases**, v. 5, n. 6, p. 873-891, 2019.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. P. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739-776, 2012.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!. **International immunology**, v. 30, n. 3, p. 103-111, 2018.

ROSTAMI, M. N.; KHAMESIPOUR, A. Potential biomarkers of immune protection in human leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, p. 1-20, 2021.

RUGANI, J. N.; GONTIJO, C. M. F.; FRÉZARD, F.; SOARES, R. P.; MONTE-NETO, R. L. Antimony resistance in *Leishmania (Viannia) braziliensis* clinical isolates from atypical lesions associates with increased ARM56/ARM58 transcripts and reduced drug uptake. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019.

RUIZ-POSTIGO, J. A.; GROUT, L.; JAIN, S. Global leishmaniasis surveillance, 2017-2018, and first report on 5 additional indicators/Surveillance mondiale de la leishmaniose, 2017-2018, et premier rapport sur 5 indicateurs supplémentaires. **Weekly epidemiological record**, v. 95, n. 25, p. 265-279, 2020.

SACCOLITI, F.; ANGIULLI, G.; PUPO, G.; PESCATORI, L.; MADIA, V. N.; MESSORE, A.; COLOTTI, G.; FIORILLO, A.; SCIPIONE, L.; GRAMICCIA, M.; DI MUCCIO, T.; DI SANTO, R.; COSTI, R. Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by diaryl sulfide derivatives. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 32, n. 1, p. 304-310, 2017.

SÁENZ, M. G. **Design and synthesis of novel topoisomerase I Inhibitors. 1, 5-Naphthyridine derivatives with antiproliferative activity.** 2016. Tese de Doutorado, Faculdade de Farmacia, Universidad del País Vasco, Espanha, 2016.

SÁNCHEZ, I.; RECHES, R.; CAIGNARD, D. H.; RENARD, P.; PUJOL, M. D. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: the effect of N- and O-substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 3, p. 340-352, 2006.

SCOTTI, L.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; ISHIKI, H. M.; RIBEIRO, F. F.; SINGLA, R. K.; BARBOSA FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; SCOTTI, M. T. Docking studies for multi-target drugs. **Current drug targets**, v. 18, n. 5, p. 592-604, 2017.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 2017.

SERAFIM, V. L.; FÉLIX, M. B.; SILVA, D. K. F.; RODRIGUES, K. A. F.; ANDRADE, P. N.; ALMEIDA, S. M. V.; SANTOS, S. A.; OLIVEIRA, J. F.; LIMA, M. C. A.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B.; SCOTTI, M. T.; OLIVEIRA, M. R.; MOURA, R. O. New thiophene-acridine compounds: Synthesis, antileishmanial activity, DNA binding, chemometric, and molecular docking studies. **Chemical biology & drug design**, v. 91, n. 6, p. 1141-1155, 2018.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 5, n. 6, p. 485-497, 2012.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2017.

SUNDAR, S.; AGRAWAL, N.; SINGH, B. Exploiting knowledge on pharmacodynamics-pharmacokinetics for accelerated anti-leishmanial drug discovery/development. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 15, n. 7, p. 595-612, 2019.

TIWARI, N.; TANWAR, N.; MUNDE, M. Molecular insights into trypanothione reductase-inhibitor interaction: A structure-based review. **Archiv der Pharmazie**, v. 351, n. 6, p. 1700373, 2018.

TORRES, P. H. M. ; SODERO, A. C. R. ; JOFILY, P. ; SILVA-JR, F. P. Key topics in molecular docking for drug design. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.

ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464-480, 2018.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

VENKATESAN, S. K.; SHUKLA, A. K.; DUBEY, V. K. Molecular docking studies of selected tricyclic and quinone derivatives on trypanothione reductase of *Leishmania infantum*. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 13, p. 2463-2475, 2010.

VIJAYAKUMAR, S.; DAS, P. Recent progress in drug targets and inhibitors towards combating leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 181, p. 95-104, 2018.

WERBOVETZ, K. A.; LEHNERT, E. K.; MACDONALD, T. L.; PEARSON, R. D. Cytotoxicity of acridine compounds for *Leishmania promastigotes* in vitro. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, n. 2, p. 495-497, 1992.

WERMUTH, C. G.; CIAPETTI, P.; GIETHLEN, B.; BAZZINI, P. Bioisosterism. **Comprehensive Medicinal Chemistry II**, v.2, n.2, p. 649-711, 2007.

WILDMAN, S. A.; CRIPPEN, G. M. Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 39, n. 5, p. 868-873, 1999.

WINSHIP, K. A. Toxicity of antimony and its compounds. **Adverse drug reactions and acute poisoning reviews**, v. 6, n. 2, p. 67-90, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. 2021a. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>> Acesso em: 19 jun. 2021.

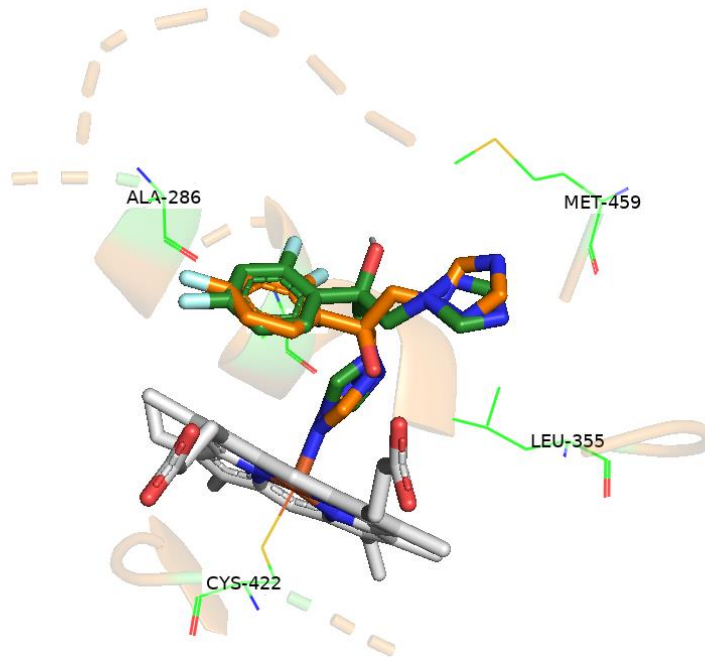
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases**. 2021b. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/neglected-tropical-diseases>> Acesso em: 19 jun. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ending the neglect to attain the sustainable development goals: a framework for monitoring and evaluating progress of the road map for neglected tropical diseases 2021– 2030**. Geneva: World Health Organization, 2021c, Disponível em: < <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>> Acesso em: 10 jun. 2021.

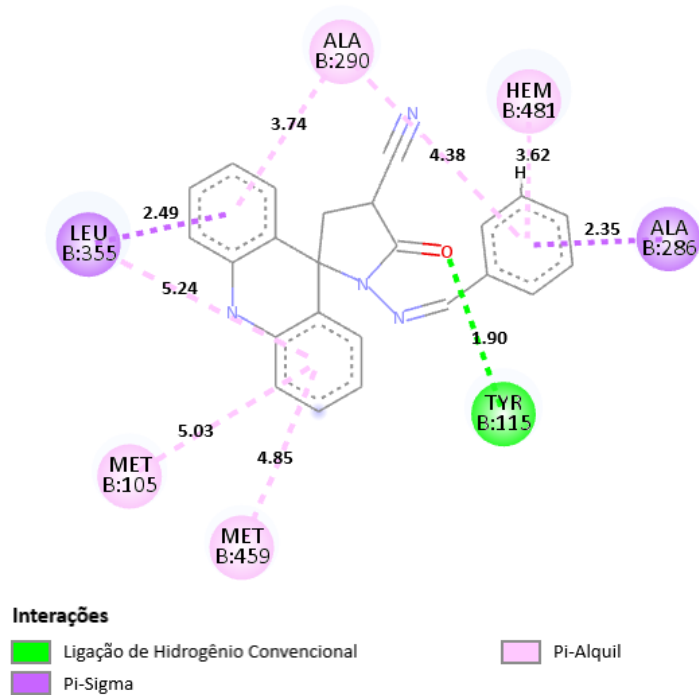
APÊNDICES

ANCORAGEM MOLECULAR

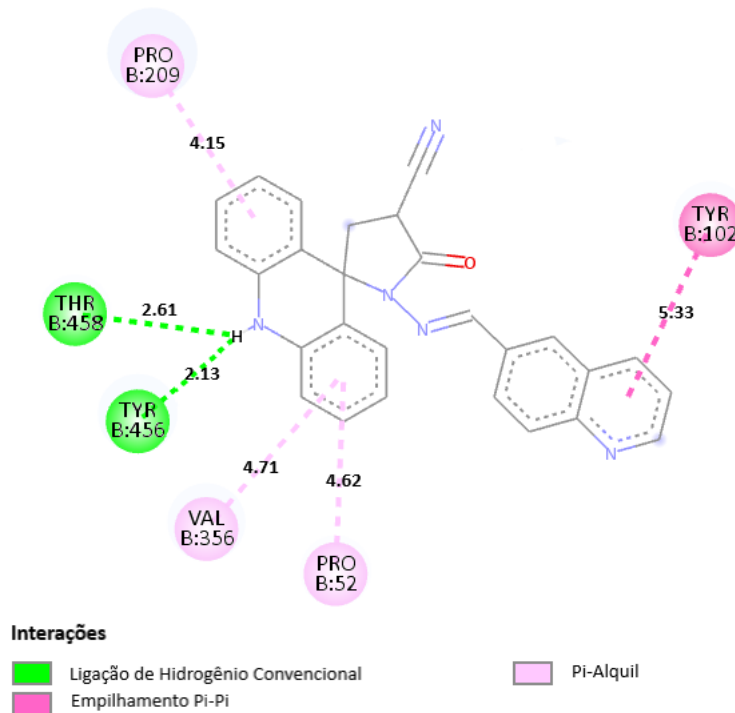
Apêndice 1- Ligante fluconazol cocristalizado (verde) e ligante fluconazol redocado (laranja) no alvo estero 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D)



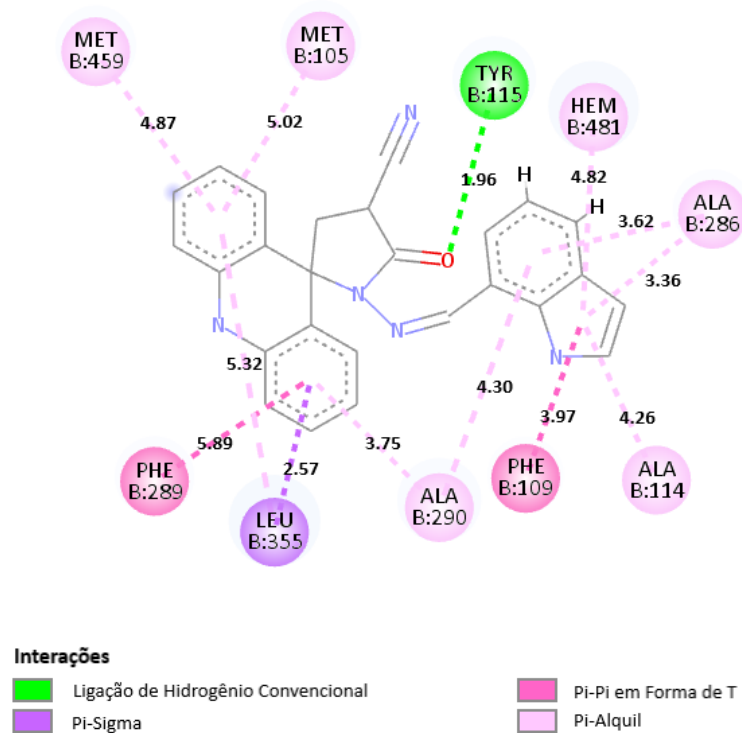
Apêndice 2- Representação 2D do composto AMTAC-01 ancorado no alvo estero 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D)



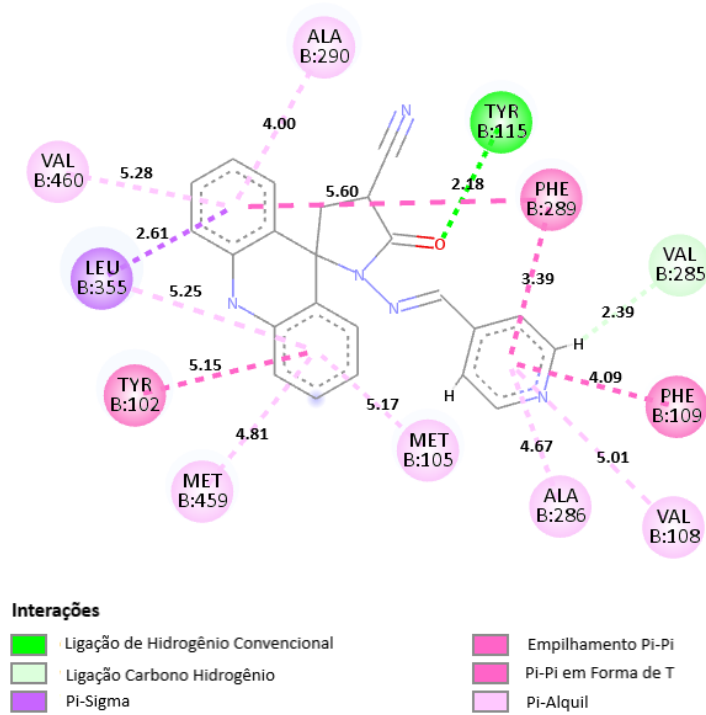
Apêndice 3- Representação 2D do composto AMTAC-21 ancorado no alvo estero 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D)



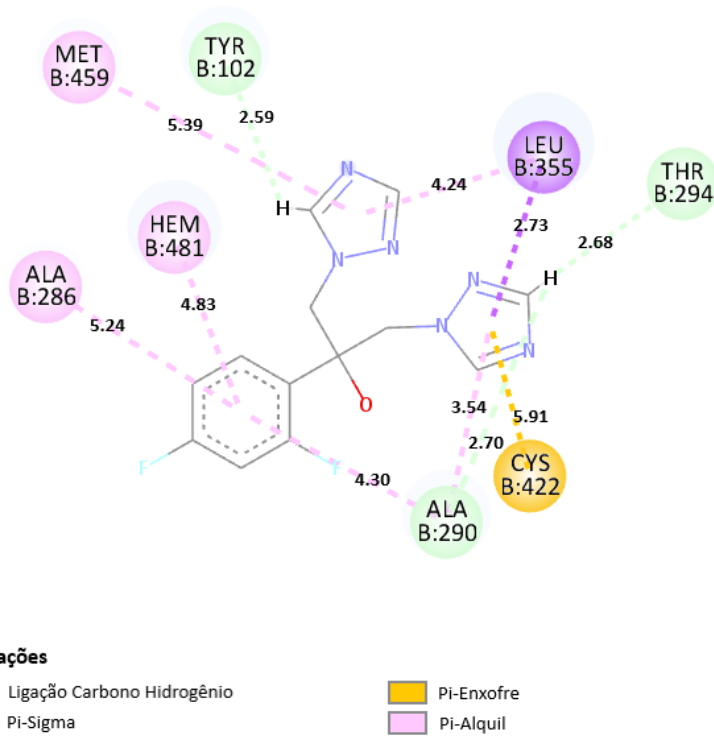
Apêndice 4- Representação 2D do composto AMTAC-22 ancorado no alvo estero 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D)



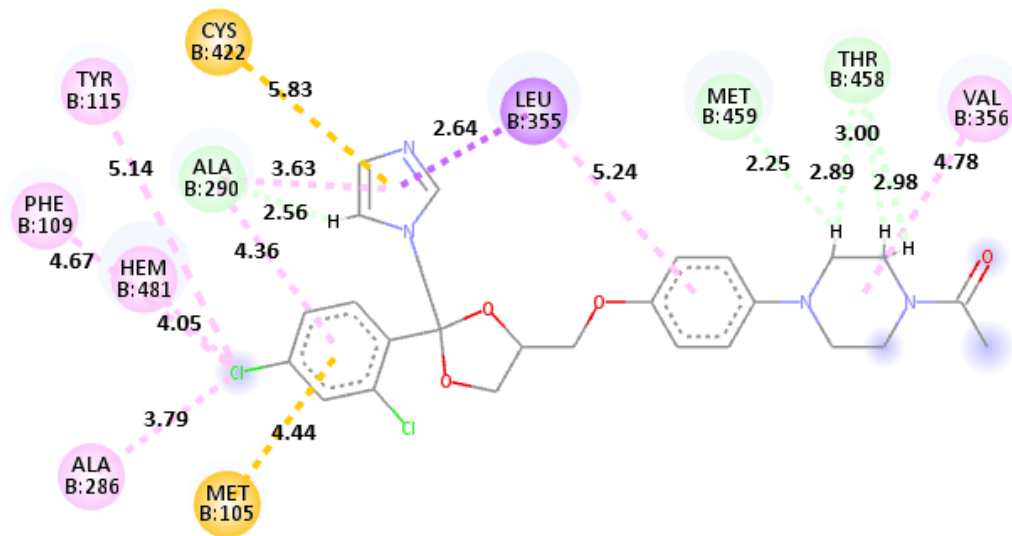
Apêndice 5- Representação 2D do composto AMTAC-24 ancorado no alvo estero 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D)








Apêndice 6- Representação 2D do ligante fluconazol ancorado no alvo estero 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D)



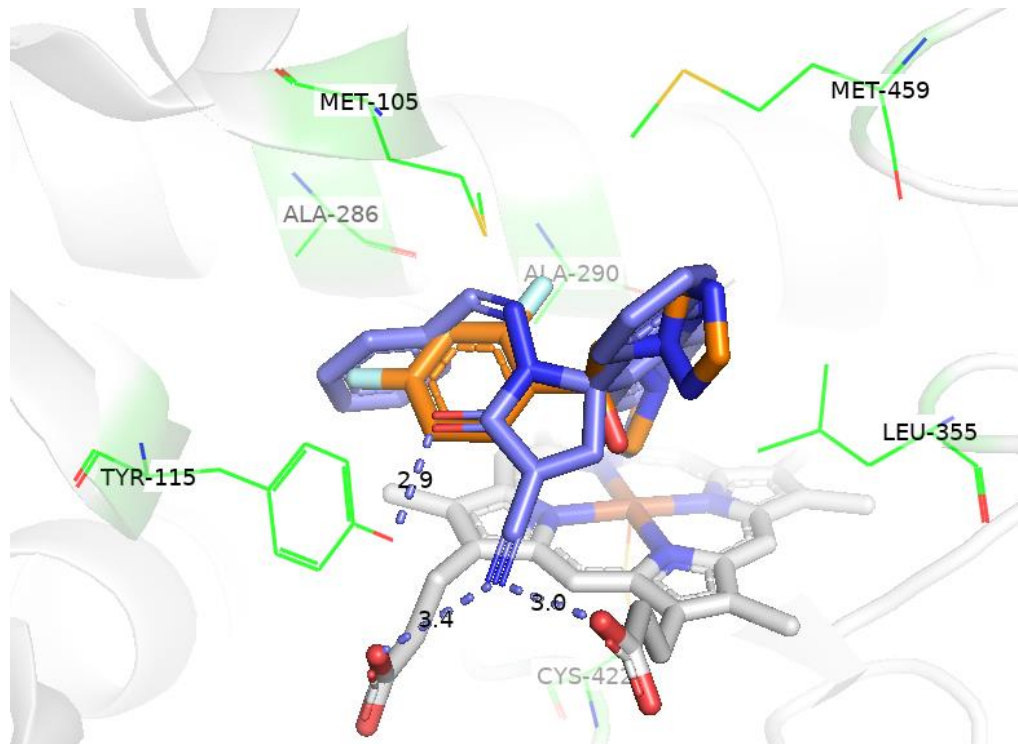
Apêndice 7- Representação 2D do cetoconazol ancorado no alvo estero 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D)



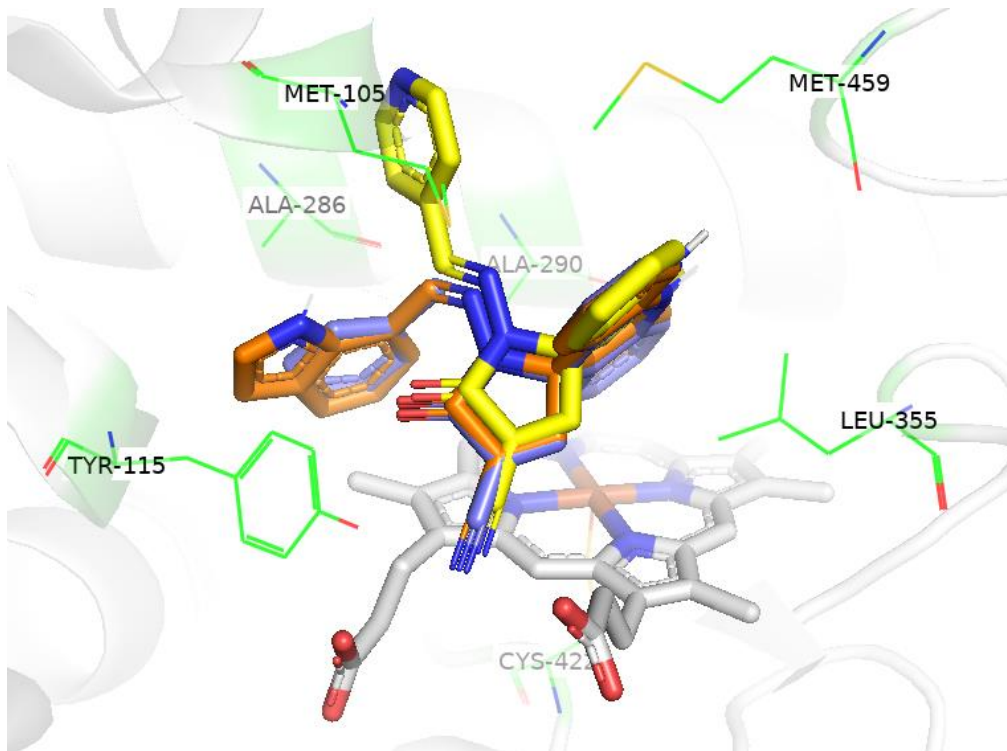
Interações

	Ligação Carbono Hidrogênio		Alquil
	Pi-Sigma		Pi-Alquil
	Pi-Enxofre		

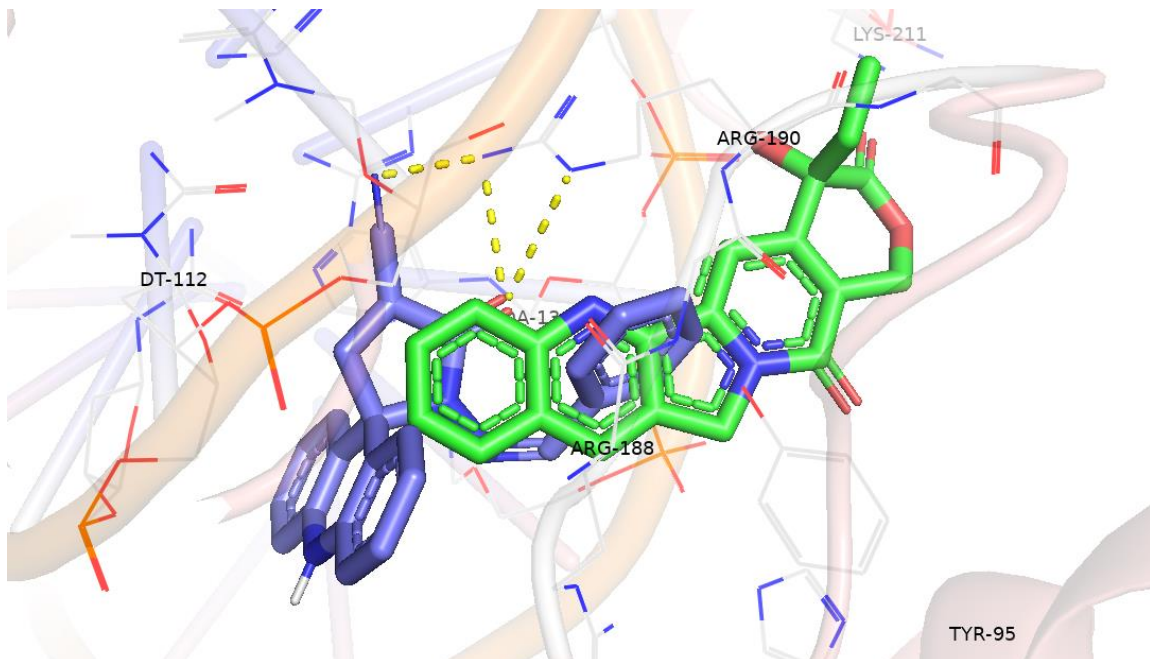
Apêndice 8- Representação 3D do ligante fluconazol (laranja) e AMTAC-01 (roxo) ancorados no sítio de ligação do alvo estero 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D)



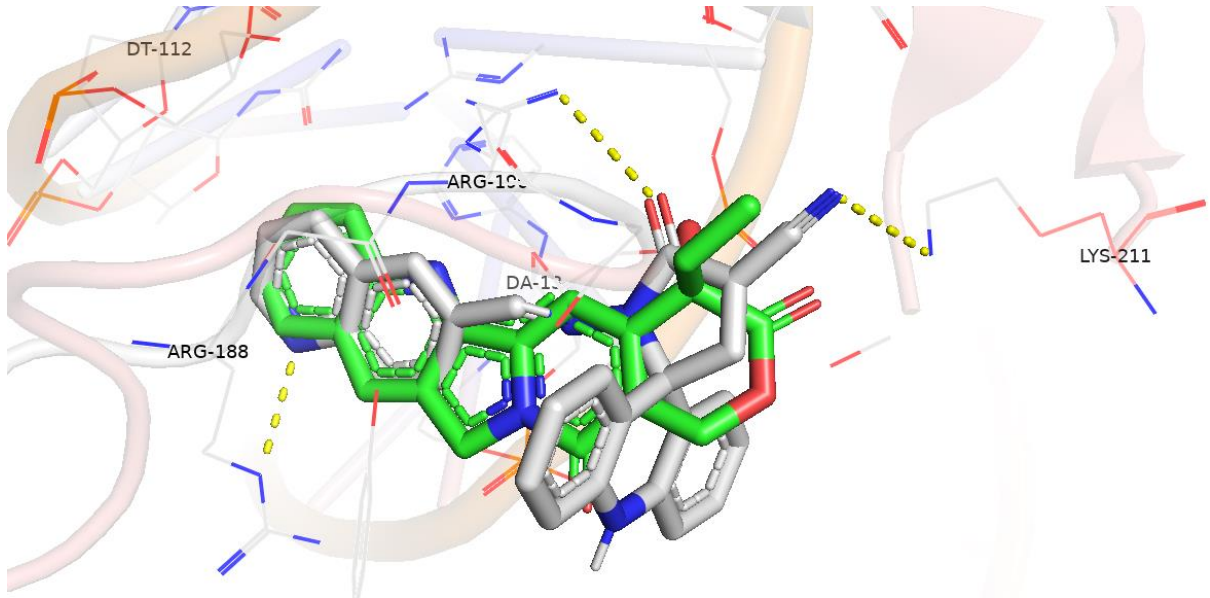
Apêndice 9- Representação 3D dos derivados espiro-acridínicos: AMTAC-01 (roxo), AMTAC-22 (laranja) e AMTAC-24 (amarelo) ancorados no sítio de ligação do alvo esterol 14 α -desmetilase (PDB ID: 3L4D)



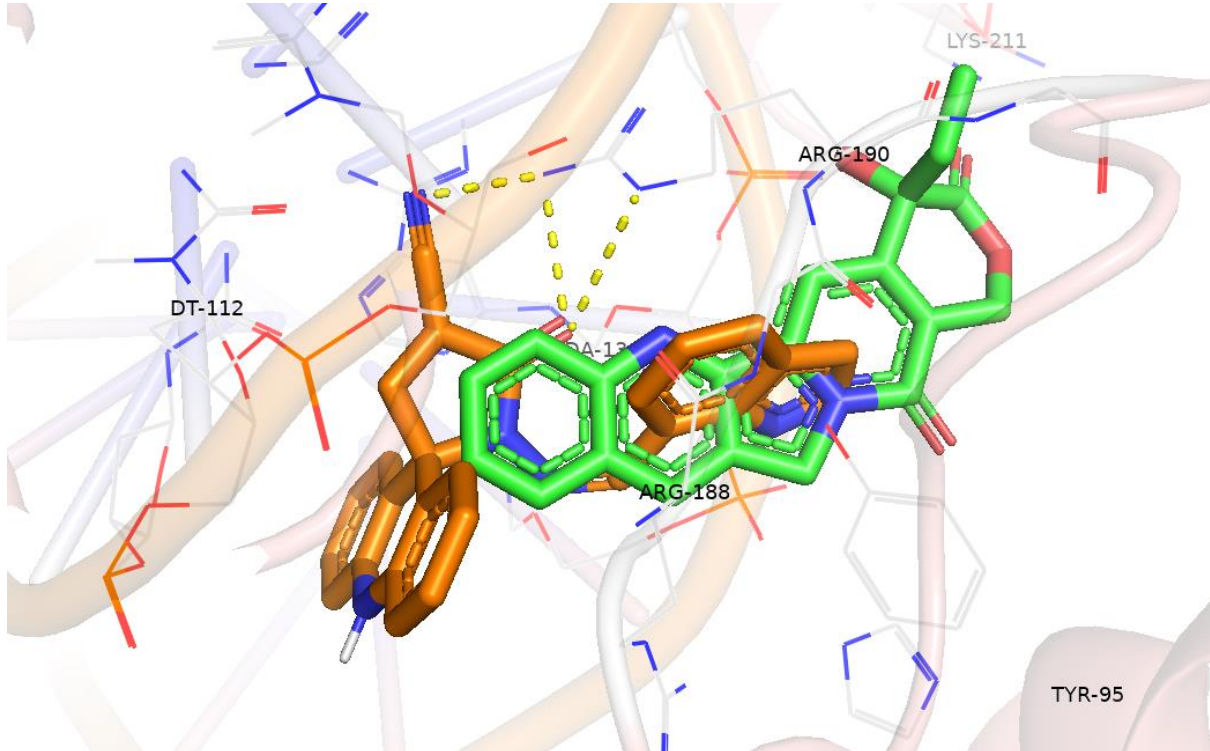
Apêndice 10- Representação 3D da camptotecina (verde) e AMTAC-01 (roxo) ancorados no sítio de ligação do alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)



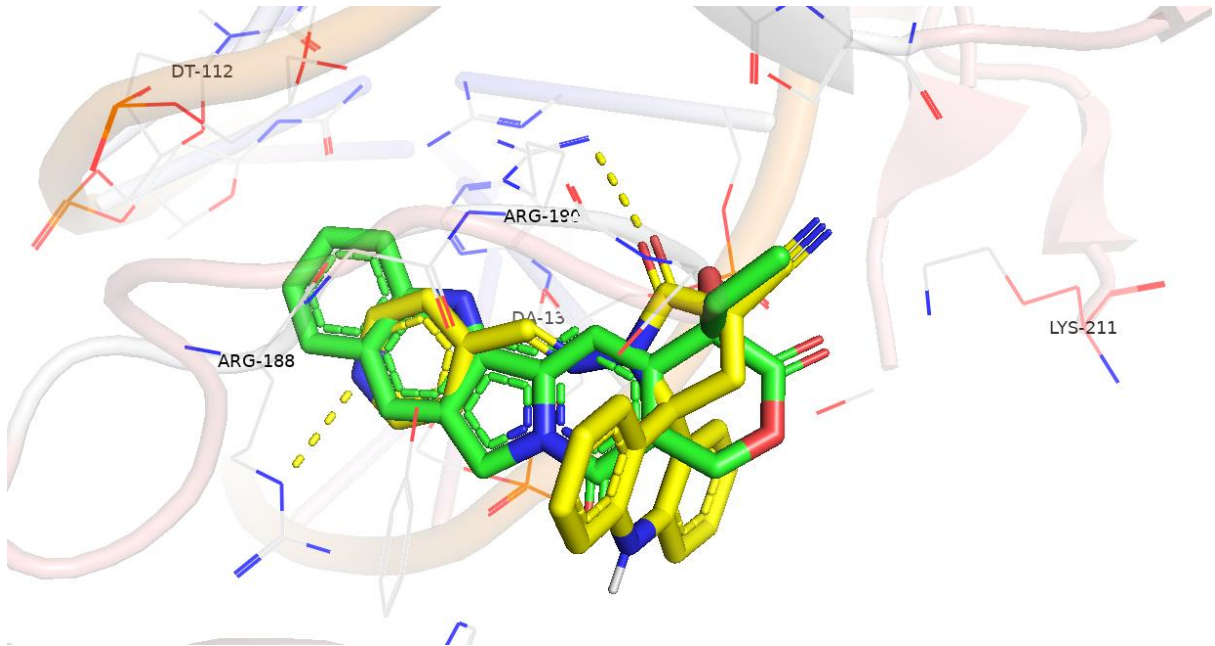
Apêndice 11- Representação 3D da camptotecina (verde) e AMTAC-21 (branco) ancorados no sítio de ligação do alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)



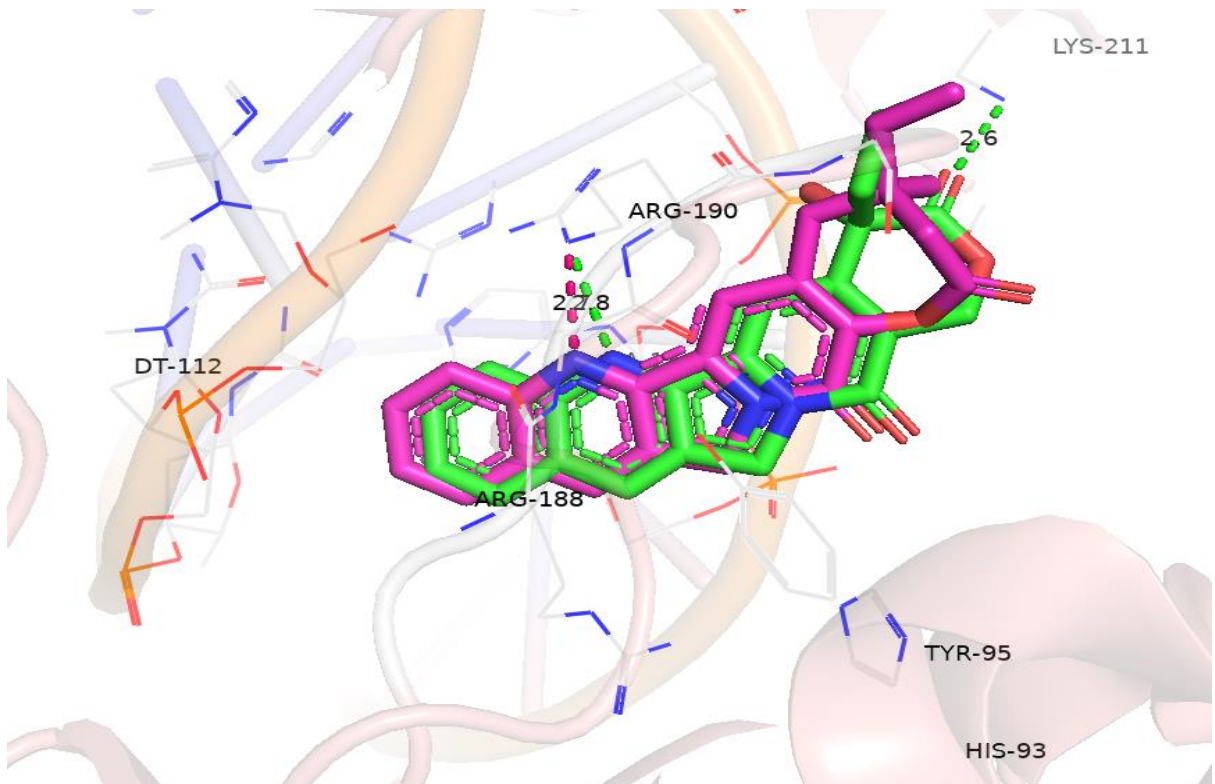
Apêndice 12- Representação 3D da camptotecina (verde) e AMTAC-22 (laranja) ancorados no sítio de ligação do alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)



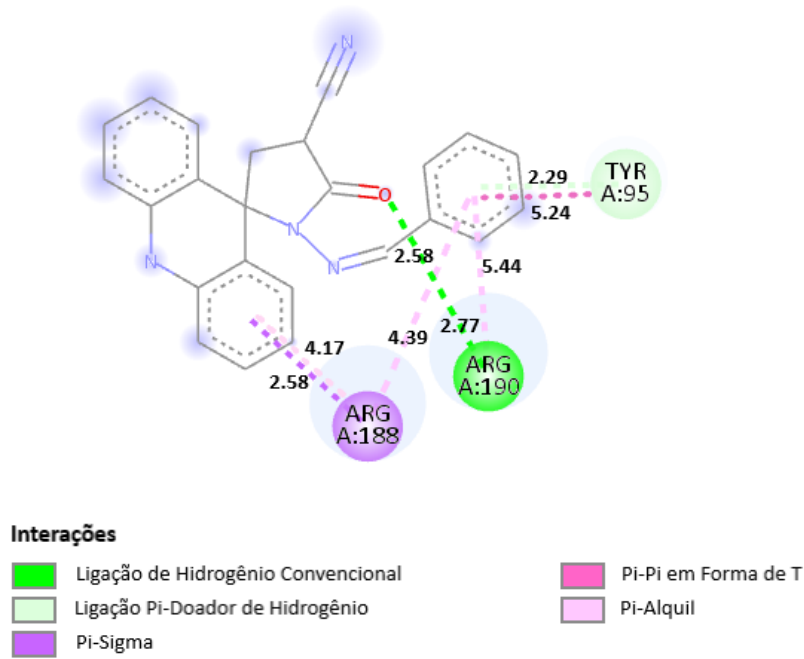
Apêndice 13- Representação 3D da camptotecina (verde) e AMTAC-24 (amarelo) ancorados no sítio de ligação do alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)



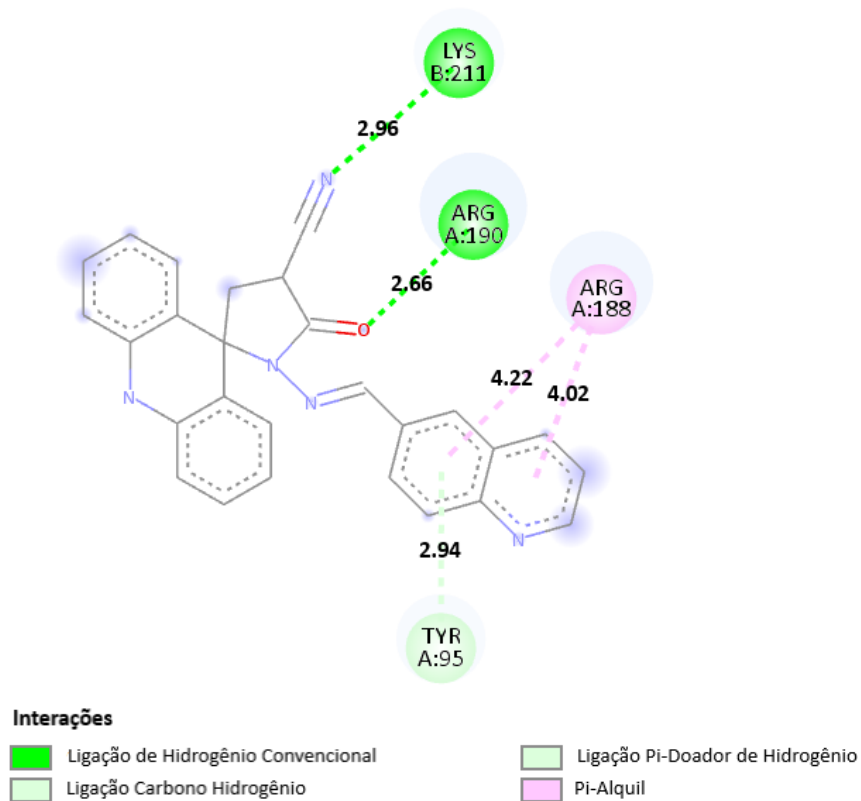
Apêndice 14- Representação 3D da camptotecina (verde) e diflomotecano (rosa) ancorados no sítio de ligação do alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)



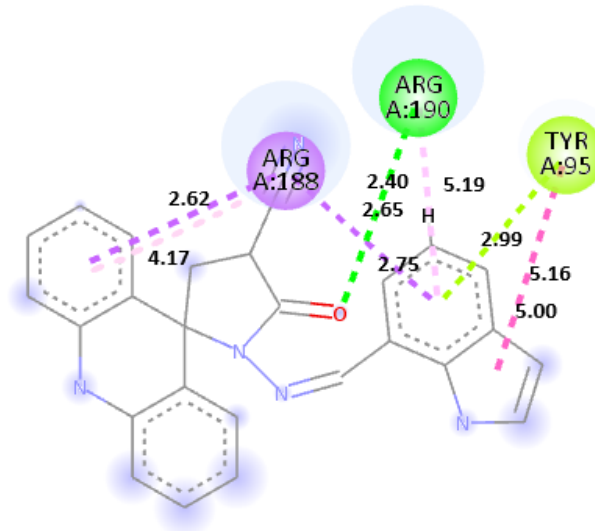
Apêndice 15- Representação 2D do AMTAC-01 ancorado no alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)



Apêndice 16- Representação 2D do AMTAC-21 ancorado no alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)



Apêndice 17- Representação 2D do AMTAC-22 ancorado no alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)

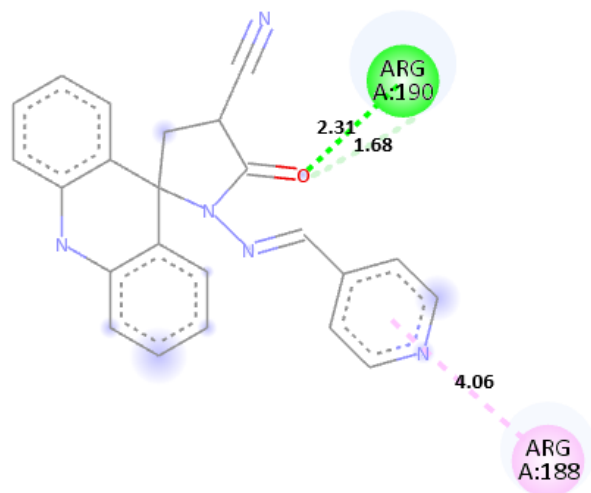


Interações

- Ligação de Hidrogênio Convencional
- Pi-Sigma
- Pi-Par de Elétrons Livres

- Pi-Pi em Forma de T
- Pi-Alquil

Apêndice 18- Representação 2D do AMTAC-24 ancorado no alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)

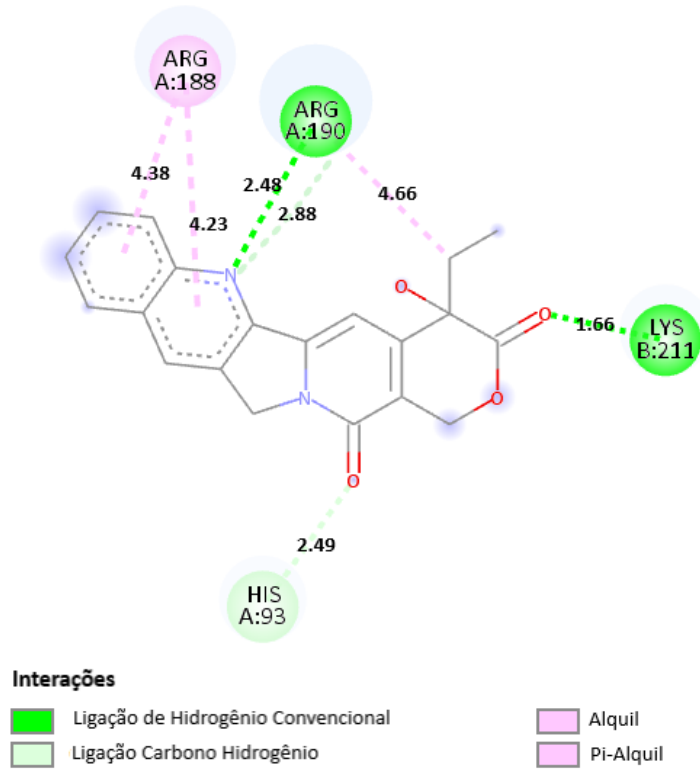


Interações

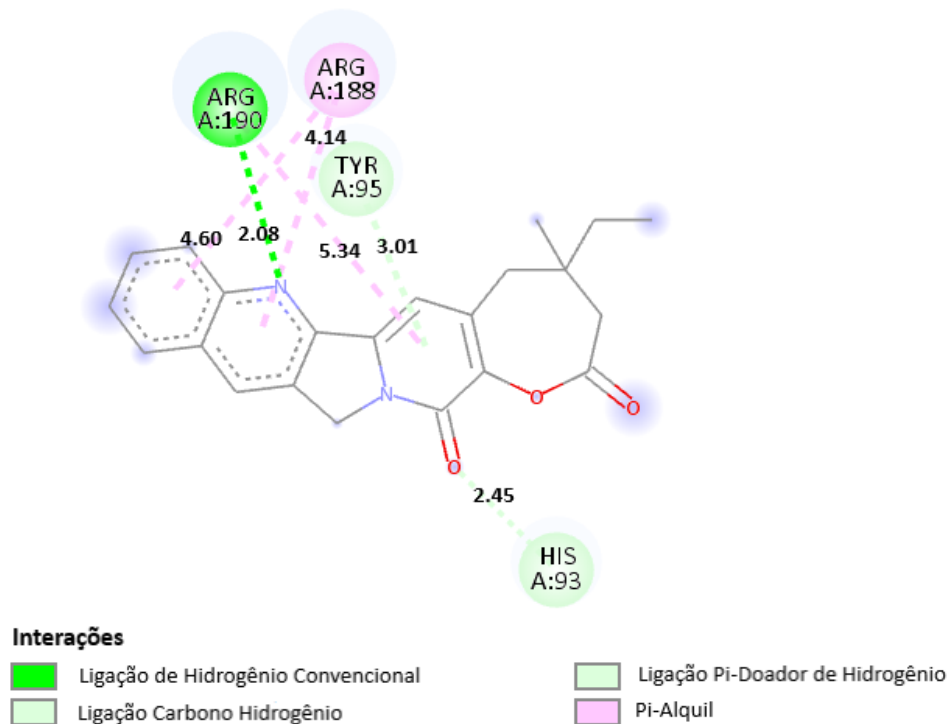
- Ligação de Hidrogênio Convencional
- Ligação Carbono Hidrogênio

- Pi-Alquil

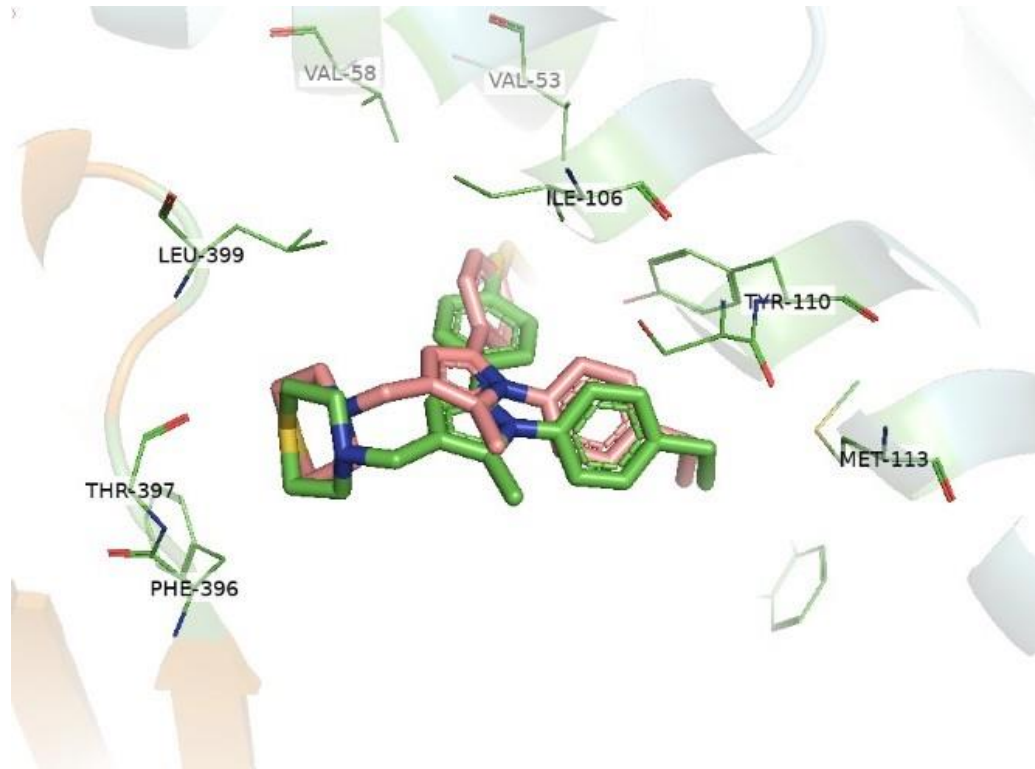
Apêndice 19- Representação 2D da camptotecina ancorada no alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)



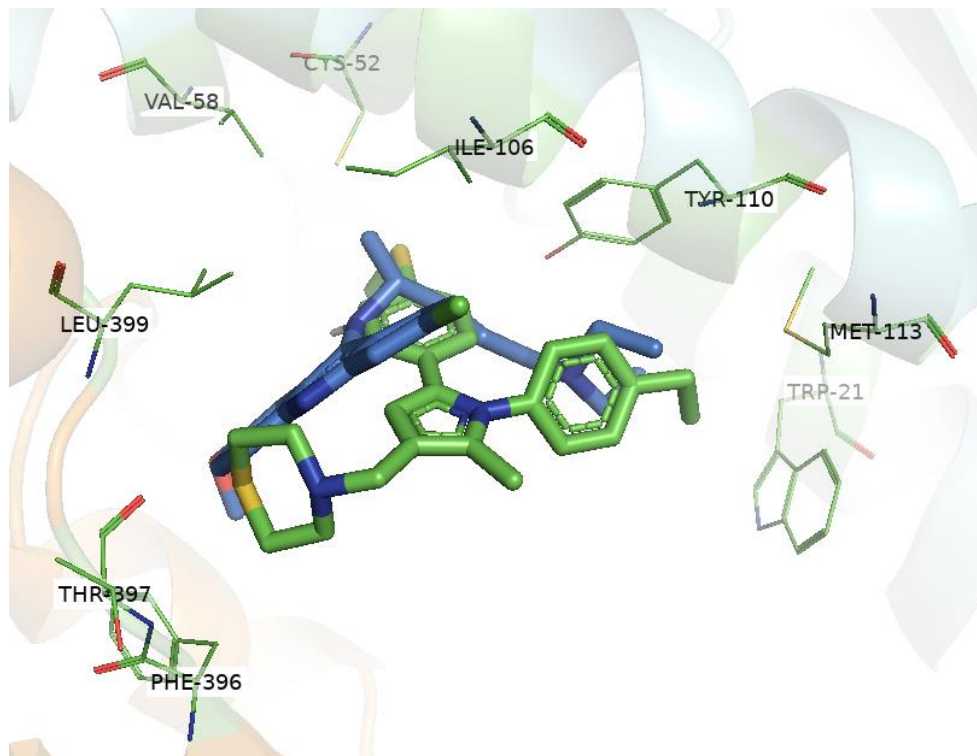
Apêndice 20- Representação 2D do diflomotecano ancorado no alvo LTopo IB-DNA (PDB ID: 2B9S)



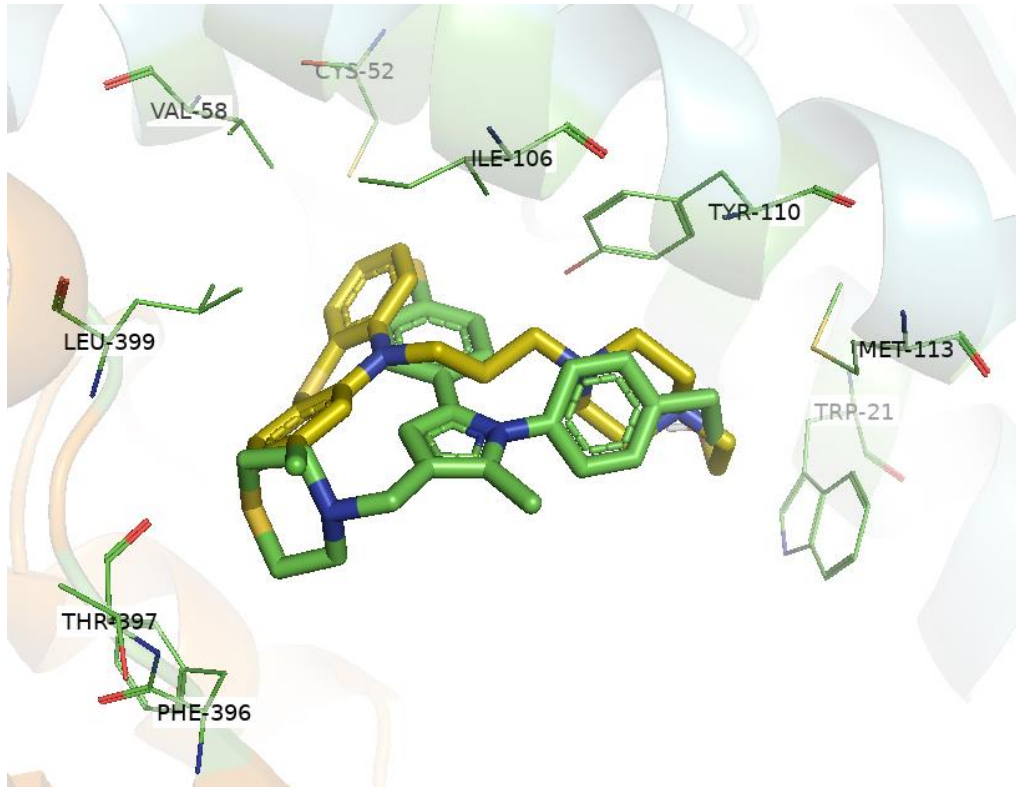
Apêndice 21- Ligante diaril pirrol cocristalizado (verde) e ligante diaril pirrol redocado (rosa) no alvo tripanotona redutase (PDB ID: 4APN)



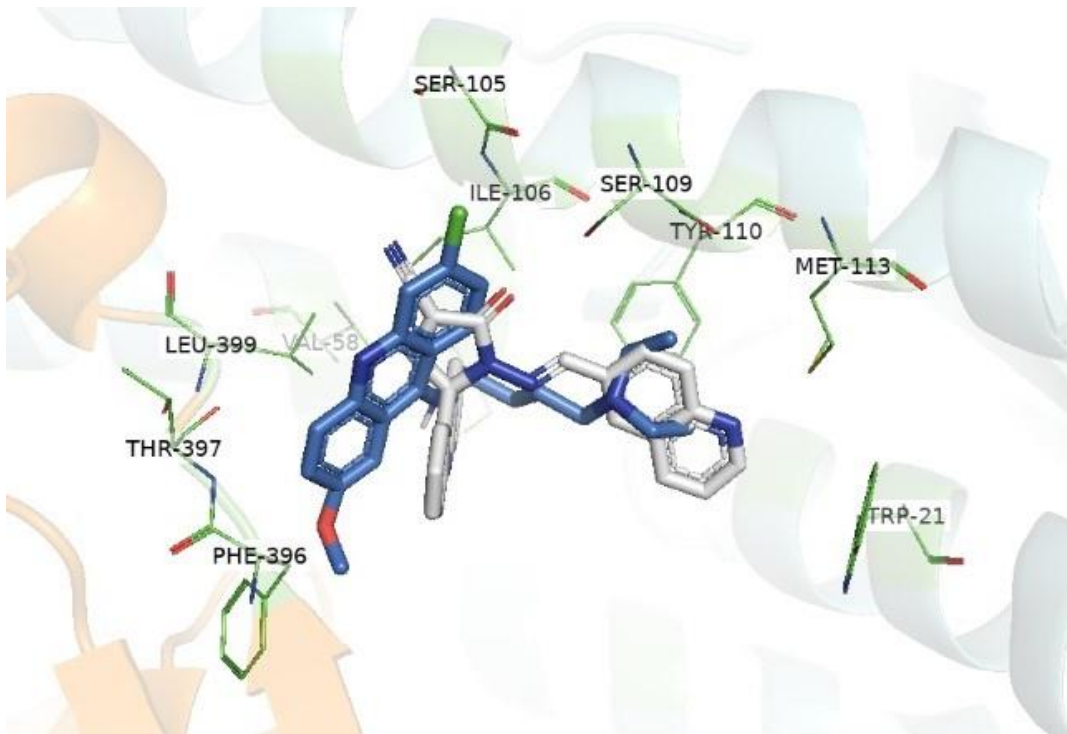
Apêndice 22- Representação 3D do ligante diaril pirrol (verde) e mepacrina (azul) ancorados no sítio de ligação do alvo tripanotona redutase (PDB ID: 4APN)



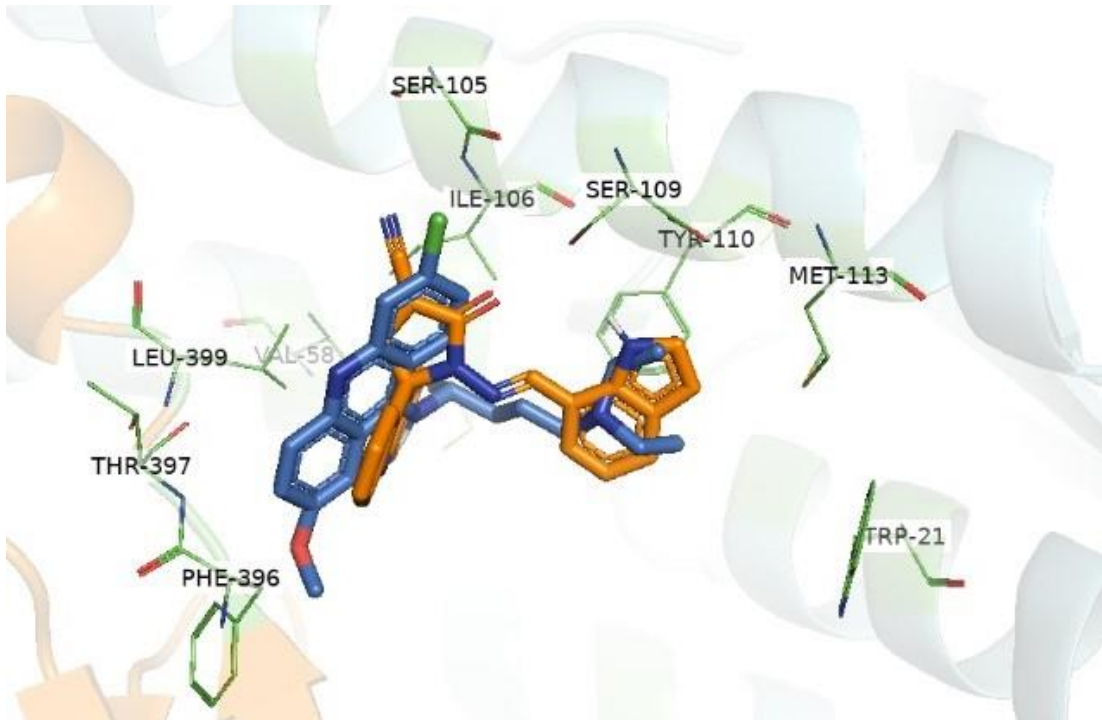
Apêndice 23- Representação 3D do ligante diaril pirrol (verde) e perfenazina (amarelo) ancorados no sítio de ligação do alvo tripanotona redutase (PDB ID: 4APN)



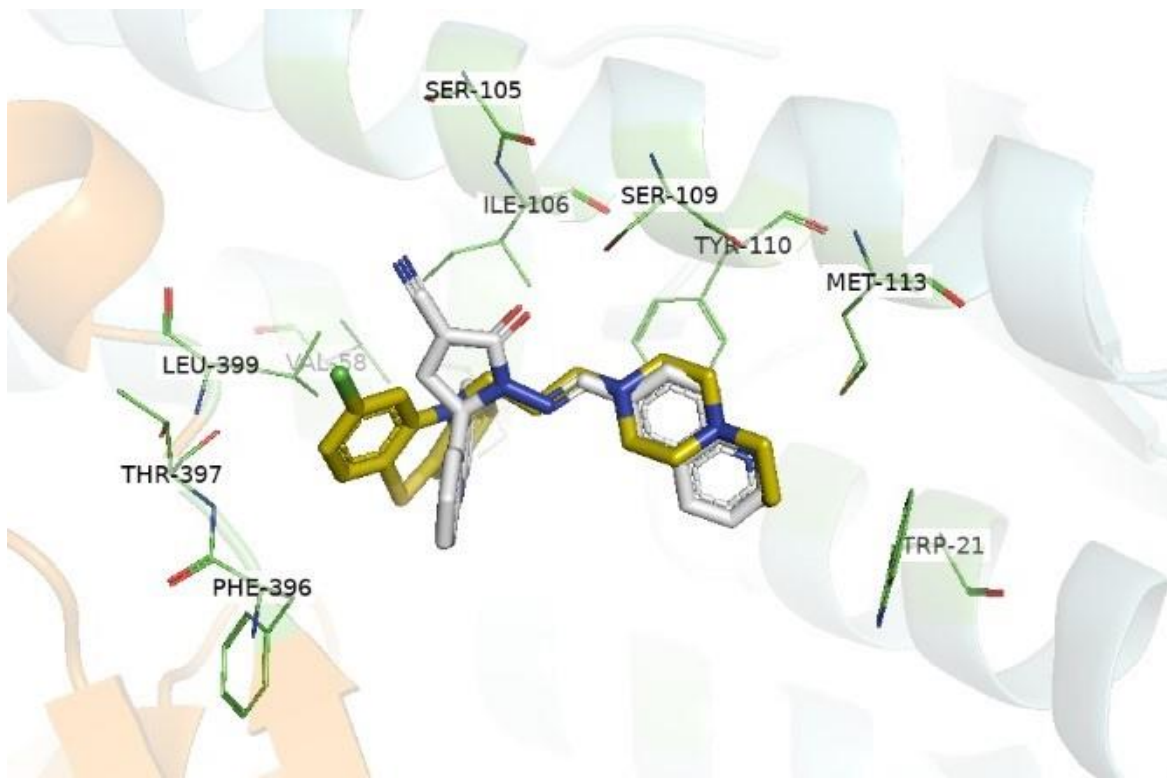
Apêndice 24- Representação 3D da mepacrina (azul) e AMTAC-21 (branco) ancorados no sítio de ligação do alvo tripanotona redutase (PDB ID: 4APN)



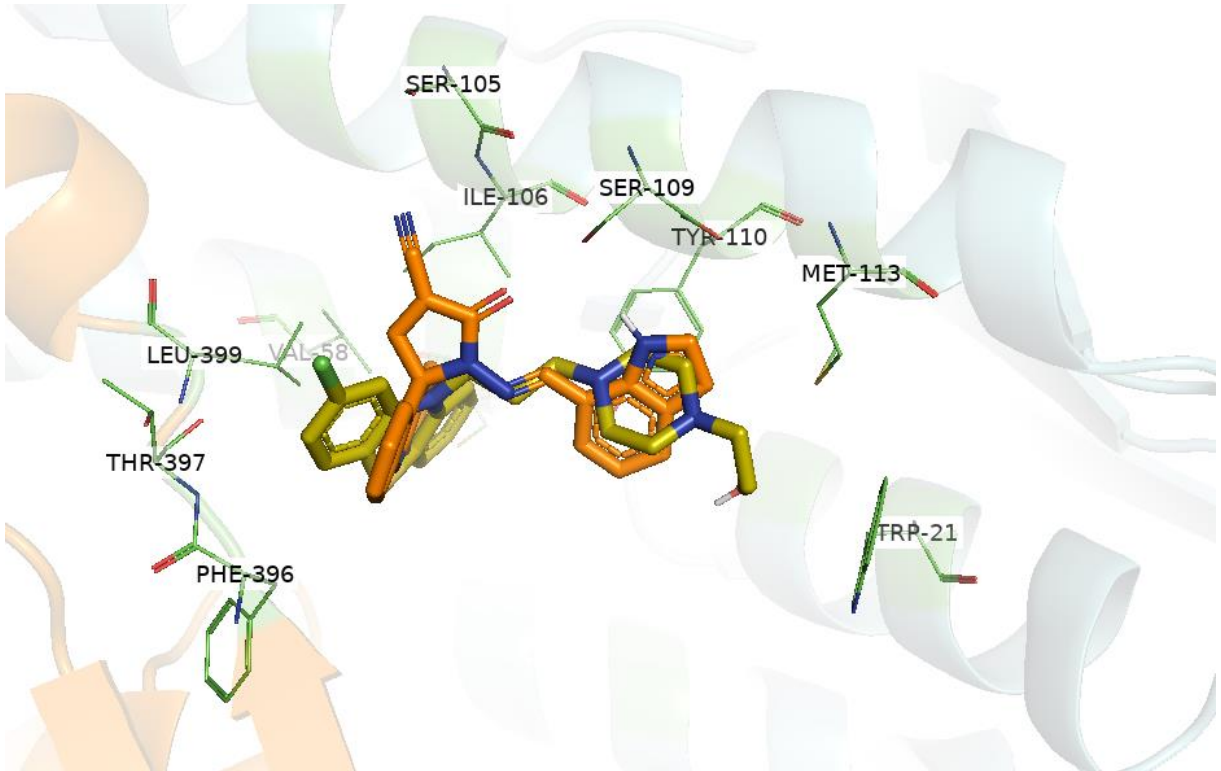
Apêndice 25- Representação 3D da mepacrina (azul) e AMTAC-22 (laranja) ancorados no sítio de ligação do alvo tripanotona redutase (PDB ID: 4APN)



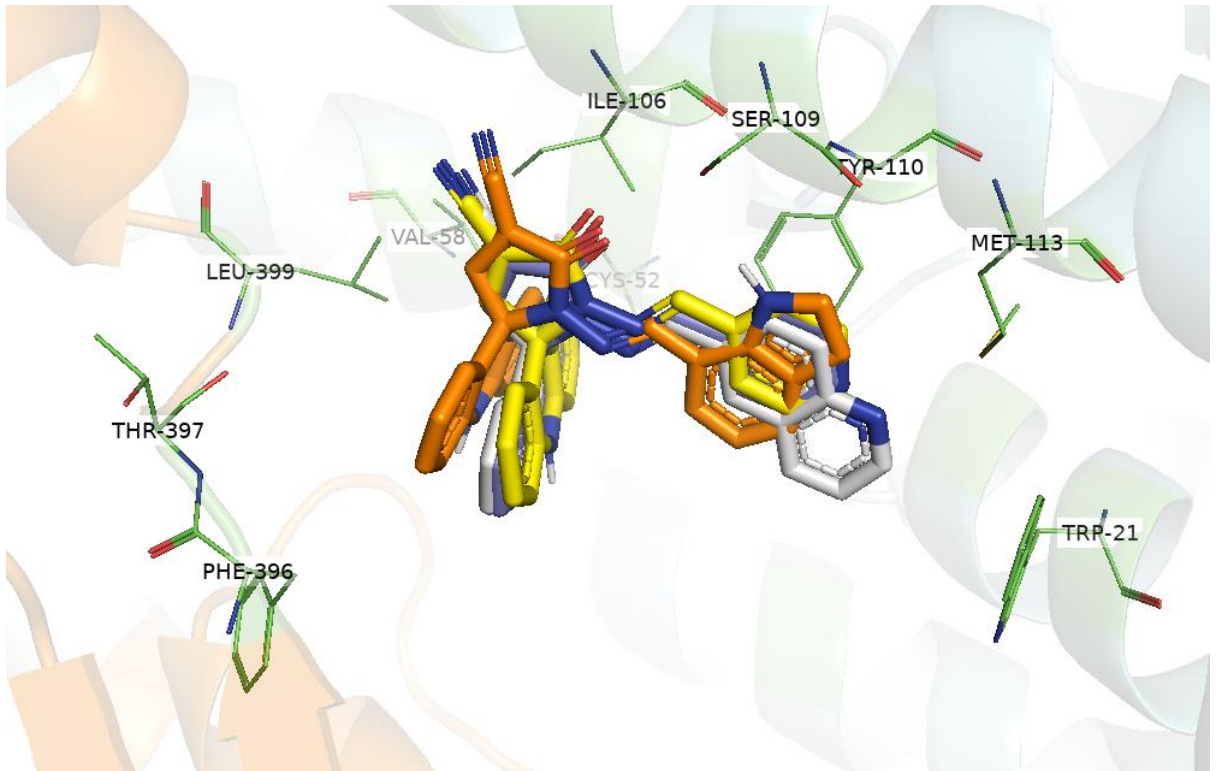
Apêndice 26- Representação 3D da perfenazina (amarelo) e AMTAC-21 (branco) ancorados no sítio de ligação do alvo tripanotona redutase (PDB ID: 4APN)



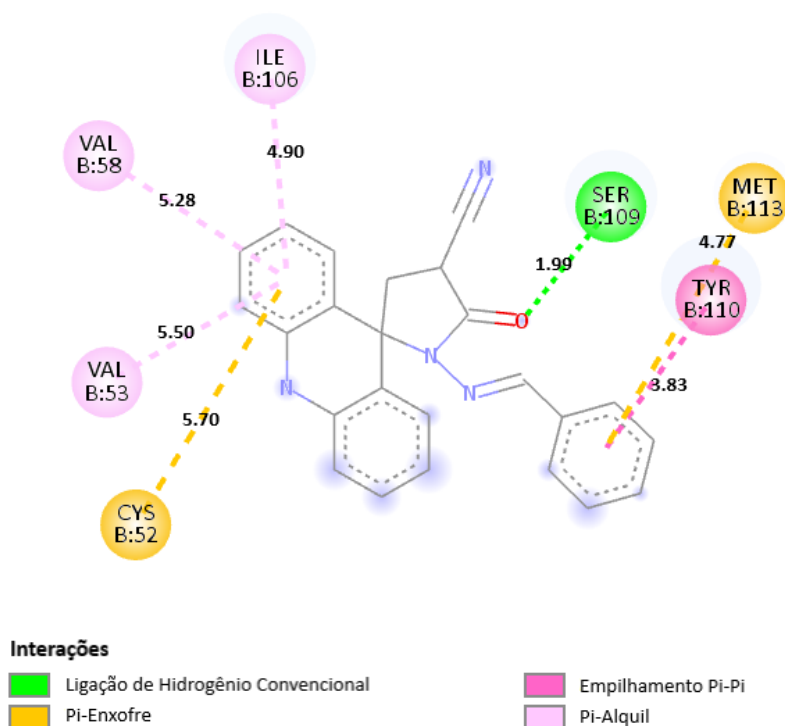
Apêndice 27- Representação 3D da perfenazina (amarelo) e AMTAC-22 (laranja) ancorados no sítio de ligação do alvo tripanotona redutase (PDB ID: 4APN)



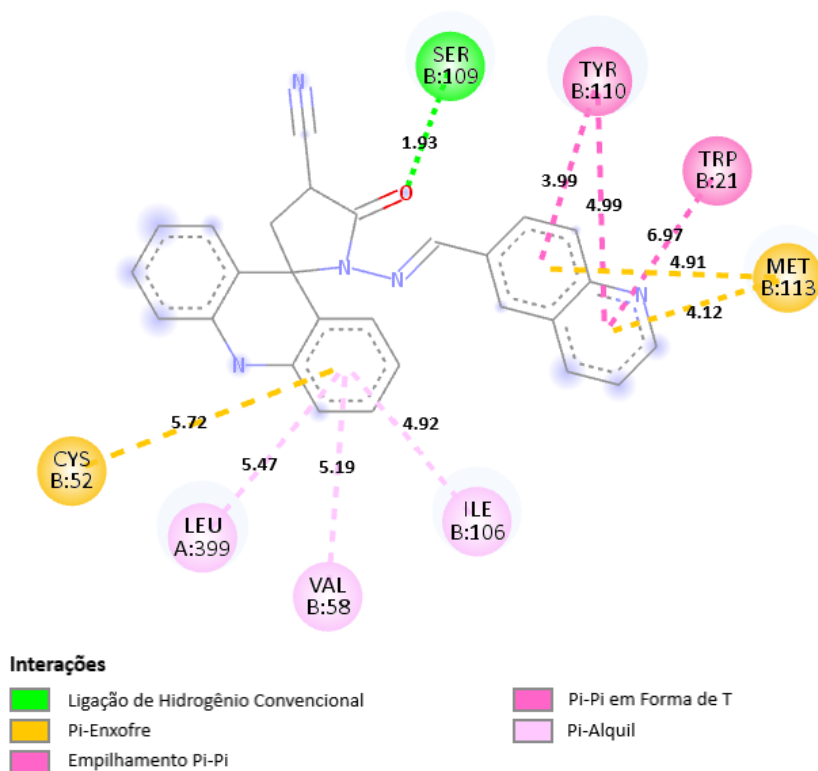
Apêndice 28- Representação 3D dos derivados espiro-acridínicos: AMTAC-01 (roxo), AMTAC-21 (branco), AMTAC-22 (laranja) e AMTAC-24 (amarelo) ancorados no sítio de ligação do alvo tripanotona redutase (PDB ID: 4APN)



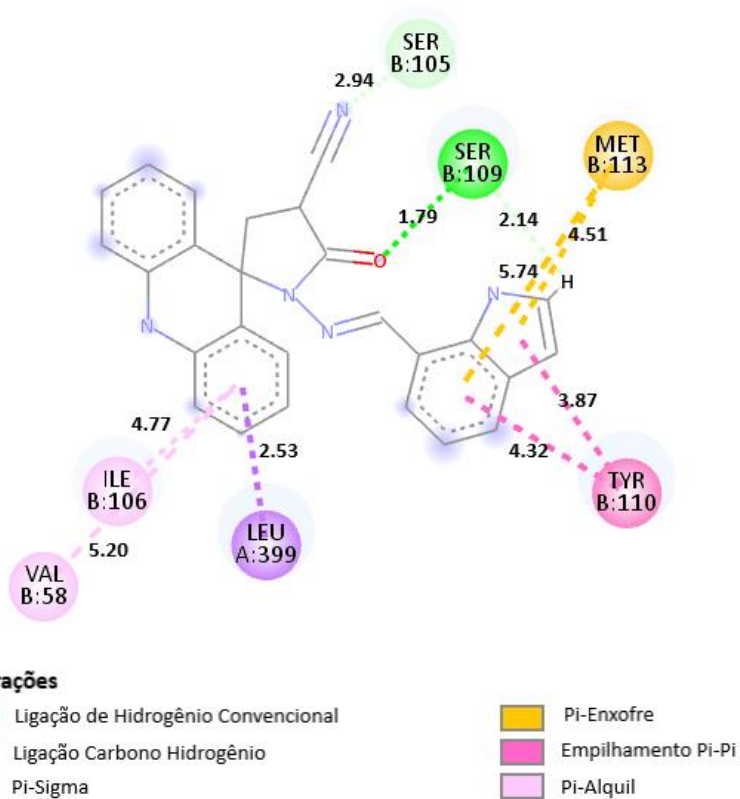
Apêndice 29- Representação 2D do AMTAC-01 ancorado no alvo tripanotiona redutase (PDB ID: 4APN)



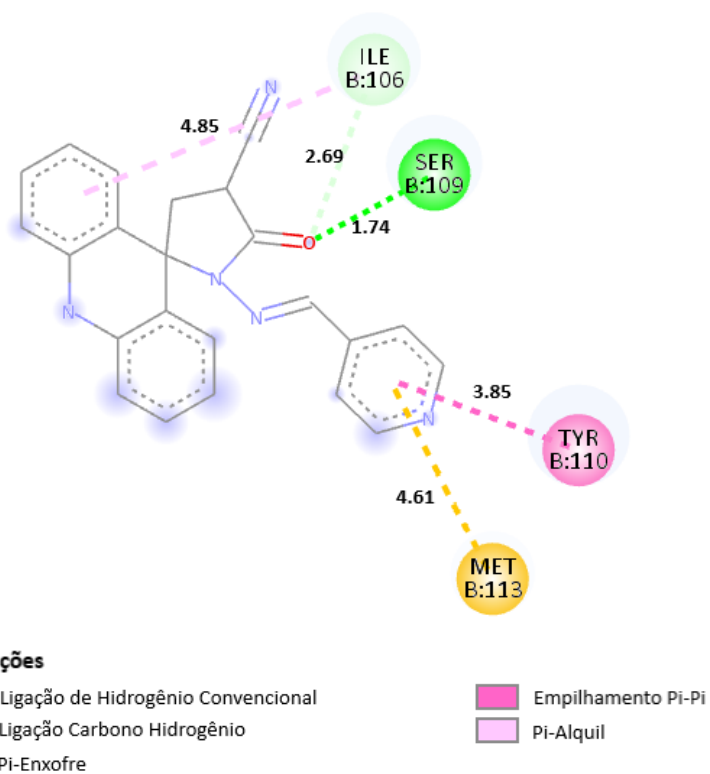
Apêndice 30- Representação 2D do AMTAC-21 ancorado no alvo tripanotiona redutase (PDB ID: 4APN)



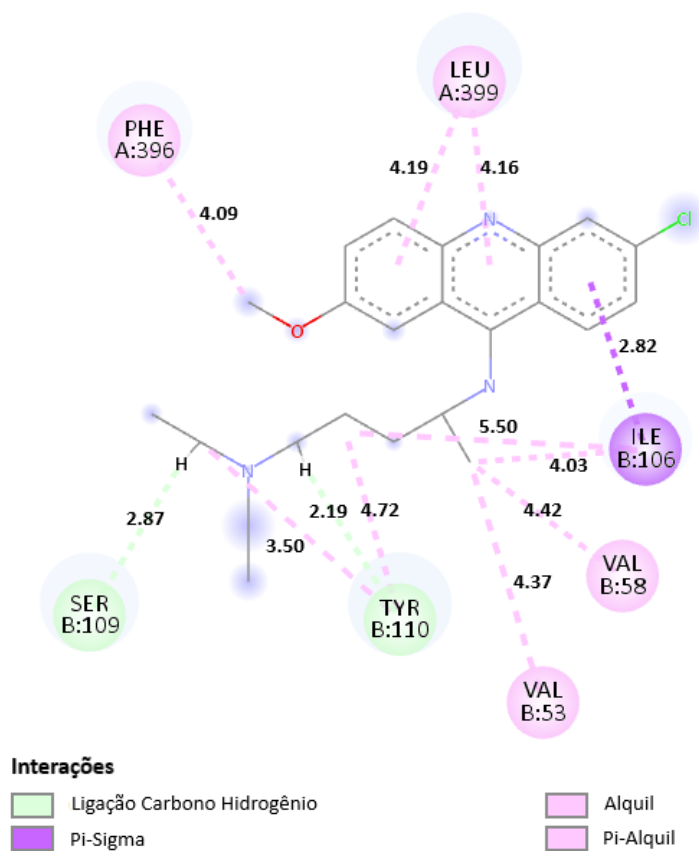
Apêndice 31- Representação 2D do AMTAC-22 ancorado no alvo tripanotiona redutase (PDB ID: 4APN)



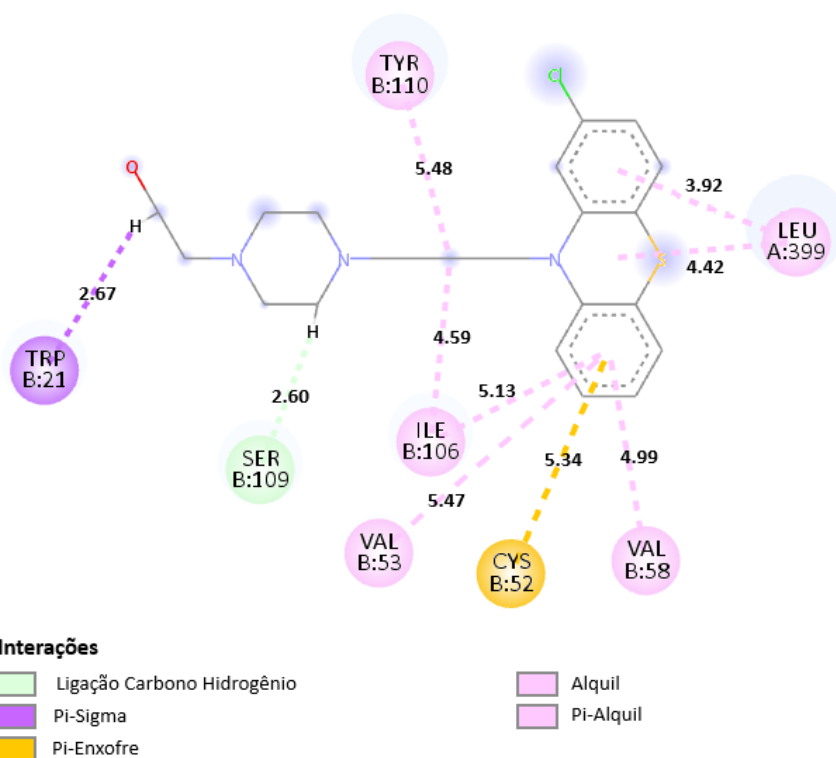
Apêndice 32- Representação 2D do AMTAC-24 ancorado no alvo tripanotiona redutase (PDB ID: 4APN)



Apêndice 33- Representação 2D da mepacrina ancorada no alvo tripanotiona redutase (PDB ID: 4APN)



Apêndice 34- Representação 2D da perfenazina ancorada no alvo tripanotiona redutase (PDB ID: 4APN)



Apêndice 35- Representação 2D do ligante diaril pirrol ancorado no alvo tripanotiona redutase (PDB ID: 4APN)

