



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MALU MARIA LUCAS DOS REIS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE  
DERIVADOS TIOFÊNICOS-ACRIDÍNICOS**

Recife  
2021

MALU MARIA LUCAS DOS REIS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE  
DERIVADOS TIOFÊNICOS-ACRIDÍNICOS**

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas na área de fármacos e medicamentos.

**Área de concentração:** fármacos e medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

Co-Orientador: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira

Recife  
2021

Catálogo na Fonte  
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

R375d Reis, Malu Maria Lucas dos.  
Desenvolvimento e avaliação da atividade leishmanicida de derivados tiofênicos-acridínicos / Malu Maria Lucas dos Reis. – 2021.  
165 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientador : Ricardo Olímpio de Moura.  
Coorientador : Elquio Eleamen Oliveira.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2021.

Inclui referências e apêndices.

1. Leishmaniose. 2. Acridinas. 3. Tiofenos. 4. Atividade Antileishmania. I. Moura, Ricardo Olímpio de (Orientador). II. Oliveira, Elquio Eleamen (Coorientador). III. Título.

615 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2022-238)

MALU MARIA LUCAS DOS REIS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE  
DERIVADOS TIOFÊNICOS-ACRIDÍNICOS**

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas na área de Planejamento e Síntese de Fármacos.

**Área de concentração:** Planejamento e Síntese de Fármacos

Aprovada em: 26/11/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

---

Profa. Dra. Maria do Carmo de Lima  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Prof. Dr. Tulio Couto  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFPE

---

Prof. Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anekécia Lauro da Silva  
Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF

Aos meus pais (Dona Maria Idê e Seu Francisco Marcondes), por toda compreensão, paciência e dedicação, a Maria Bruna pela compreensão dos meus limites, ao meu namorado (Marcos Vinicius) por todo amor, paciência e força durante os momentos mais difíceis e a todas as vítimas de violência doméstica.

Á vocês, dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Após tantos desafios, estou aqui, hoje, agradecendo a todos que me fortaleceram nessa árdua batalha de ser uma profissional devidamente capacitada e profissional. Sonho com este dia desde os sete anos, enquanto realizava experiências científicas no livro de ciências da escola.

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha mãe, Maria Idê Neiva Lucas dos Reis, por ter sonhado junto comigo e acreditado nesse projeto (de vida) desde que eu ainda era um embrião e por nunca ter me desmotivado ou feito pensar que não seria capaz.

Obrigada ao meu pai, Francisco Marcondes Duarte dos Reis, por entender minhas limitações e enxergar um futuro além do que me foi traçado ao nascer em uma cidade do interior do Ceará, sem perspectiva alguma de ser doutora algum dia. Obrigada a minha irmã que partilharam os medos, anseios e desafios, a Maria Bruna.

Sinto-me lisonjeada por agradecer todos os momentos felizes e tristes ao lado do meu amor, Marcos Vinicius Nicolau Pompeu, que me acompanhou durante esses anos, me encorajando e entendendo todas as minhas limitações.

Existem pessoas na vida que chegam para somar e evoluir, neste momento de evolução cito o meu orientador, Dr. Ricardo Olímpio de Moura, um excelente profissional, pesquisador, professor, amigo. O senhor sabe como tem sido complexo a minha evolução, agradeço pela paciência e o cuidado que o senhor tem comigo e com todos que compõe a nossa equipe. Ao professor Dr. Elquio Eleamen, por sua disposição e paciência no ato de ensinar e promover a tríade da academia, sendo ela: ensina, pesquisa e extensão. As professoras do Laboratório de Imunologia e Morfologia da UnB, Dra. Tatiana Borges e Dra. Selma Kuckellaus e aos alunos Me. Lucas Fraga e Dra. Mayara Gabrielle.

A minha amiga Bruna Pereira, por dividir comigo as aflições, anseios, desejos e dúvidas em relação a pós-graduação e a vida. Ao meu grande amigo de longa data, Cleildo Pereira Santana, que me inspira e me faz acreditar que é possível fazer pesquisa com excelência.

Aos colegas do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, em especial, Ana Lígia, Camila Melo, Ernestine, Marine, Miguel e Felipe. Aos colegas do

Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos, em especial Gleylton, Michellangela, William.

Agradeço a Nerilin e Rilvan por executarem os trabalhos com maestria, sempre nos ajudando e nos dando suporte.

À CAPES, CNPq e FACEPE, por fomentar a pesquisa desenvolvida e por fim, a Universidade Estadual da Paraíba e Universidade Federal da Paraíba (Central Analítica), por fornecerem infraestrutura para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos, muito obrigada.

Ontem à noite foi chute, foi soco, foi choro pela casa toda. Entre lesões e escoriações eu não vejo motivo pra tanta humilhação.  
Eu da minha posição não desejo isso aqui pra nenhuma pessoa. (180 – Alok, MC Davi, MC Dricka, MC Hariel, Mc Leozinho ZS, MC Marks, 2021).

## RESUMO

A leishmaniose se caracteriza como uma doença infecto-parasitária negligenciada, causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania spp.* O tratamento farmacológico utiliza antimoniais pentavalentes, Anfotericina B, Miltefosina e Paromomicina. Porém, esses medicamentos exibem efeitos tóxicos. Sendo assim, existe a necessidade de terapias medicamentosas que forneçam um tratamento mais seguro. No presente estudo, buscou-se planejar e sintetizar derivados tiofênicos-acrídnicos a partir da técnica de substituição por bioisosterismo não clássico (série ACS), previamente sintetizados pelo grupo de pesquisa, e avaliar o potencial leishmanicida e aspectos imunomodulatório. Realizou-se a síntese orgânica a partir da reação de *Gewald*, sendo por via plena e convergente. A partir da obtenção de três compostos, estes foram direcionados a técnicas de elucidação estrutural: IV, EM e RMN. Após a identificação estrutural e avaliação da pureza dos compostos, com auxílio de placas de cromatografia de camada delgada, foram realizados ensaios *in vitro* de citotoxicidade pelo método MTT em células J774, seguido da avaliação do potencial leishmanicida na forma promastigota como também, amastigota de *Leishmania amazonensis* e, por fim, identificou os melhores perfis de seletividade. Em paralelo, a partir da identificação da expressão de macrófagos J774 realizou-se o efeito microbicida para as moléculas MAL2 E MAL3. E assim, verteu-se para a etapa de avaliação das respostas Th1, Th2 e expressão de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Por fim, para conclusão dos testes avaliou-se a partir de ferramentas preditivas a farmacocinética pelo SwissADME; pKCSM e Protox II e o teste de ancoragem molecular com os alvos Tripanotiona redutase (PDB= 2JK6) e 14- $\alpha$ -dismetilase (PDB= 3L4D) utilizando como ferramenta o AutoDock Tools 1.5.6 e em adição a confirmação dos resultados pelo processo de *redocking*. Como resultados, o perfil citotóxico em macrófagos J774 para a série ACS, variou de 15,76 mM a 31,24 mM, de modo que, apresentaram-se como promissores em relação a análise de citotoxicidade em macrófagos demonstrando que as moléculas não foram tóxicas e possuíam viabilidade celular. Os resultados obtidos a partir da avaliação frente a cepas promastigotas ( $IC_{50}$  = 2,95 - 9,98 mM) e amastigotas ( $IC_{50}$  = 4,00-53,68 mM), sendo assim verificou-se que a estratégia técnica de substituição por bioisosterismo não clássico reduziu a ação direta sob o patógeno. A série MAL foi elencada para dar seguimento aos estudos em citometria de fluxo devido à baixa

citotoxicidade e aumento da expressão de macrófagos, seguido de bom efeito microbicida. Portanto, a viabilidade por citometria de fluxo a partir do marcado Anexina-PI, observou-se que nenhuma das moléculas exibiam perfis citotóxicos frente aos macrófagos J774, corroborando com os resultados obtidos em MTT. Por fim, os estudos relativos ao perfil imunomodulador realizaram-se as análises relativa à expressão de ERNS, EROS e citocinas relacionadas a resposta Th1 e Th2. Obtendo elevada secreção de óxido nítrico e EROs e ainda um perfil imunomodulador a partir do aumento das concentrações de IL2, INF- $\gamma$  e discreta ação por TNF- $\alpha$  seguido da redução das citocinas IL-4 e IL-10, sendo que a MAL 3 demonstrou ser o melhor candidato, pois atuou nas menores concentrações. Por fim, a análise farmacocinética preditiva apresentou perfis farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolismo, toxicidade e excreção, de modo a ser obtido informações que os derivados tiofênicos acrídnicos se apresentaram com adequada absorção no TGI (>93%). No que tange o perfil de interação com enzimas CYP-450 destaca-se a possível interação com CYP2D, uma isoenzima capaz de metabolizar várias classes de fármacos, e por fim, a toxicidade *in silico* se apresentou de baixa a moderada. Em relação ao método de ancoragem molecular, as moléculas dos derivados acrídnicos apresentaram boas energias de ligação destacando MAL1 com *multitarget* para as biomacromoléculas avaliadas e a não ativação do receptor endógeno pela MAL3, fortalecendo hipóteses de que esta molécula possui atividade por mecanismo imunomodulatório. Elenca-se a MAL3 como molécula potencial para o tratamento da infecção gerada por *L. amazonensis* por apresentar os melhores perfis de imunomodulação, apresentando maior índice de seletividade dentre a série MAL. Além disso, os ensaios preditivos *in silico* apresentou taxa de absorção no TGI >93% e absorção oral tolerável adquirindo perfil *druglikeness*. Portanto, elenca-se a molécula MAL 3 como potencial *lead* dos derivados tiofênicos acrídnicos estudados.

Palavras-chave: leishmaniose; acridina; tiofeno; atividade antileishmania.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is characterized as a neglected parasitic infectious disease caused by intracellular protozoa of the genus *Leishmania* spp. Pharmacological treatment uses pentavalent antimony, amphotericin B, miltefosine and paromomycin. However, these drugs exhibit toxic effects. Therefore, there is a need for drug therapies that provide safer treatment. In the present study, we sought to plan and synthesize thiophene-acridine derivatives using the substitution technique for non-classical bioisosterism (ACS series), previously synthesized by the research group, and to evaluate the leishmanicidal potential and the immunomodulatory aspects. Organic synthesis was carried out using the *Gewald* reaction, using a complete and convergent route. After obtaining three compounds, they were directed to structural elucidation techniques: IR, MS and NMR. After structural identification and evaluation of the purity of the compounds, using thin layer chromatography plates, *in vitro* cytotoxicity tests were carried out by the MTT method in J774 cells, followed by the evaluation of the leishmanicidal potential in the promastigote form as *L. amazonensis* amastigote and, finally, identified the best selectivity profiles. In parallel, from the identification of the expression of J774 macrophages, the microbicidal effect for the MAL2 and MAL3 molecules was achieved. And so, it was poured into the stage of evaluating Th1, Th2 responses and the expression of reactive oxygen and nitrogen species. Finally, to complete the tests, the pharmacokinetics was evaluated using the predictive tools of SwissADME; pKCSM and Protox II and molecular docking test with Trypanothione reductase (PDB= 2JK6) and 14- $\alpha$ -dismethylase (PDB= 3L4D) targets using AutoDock Tools 1.5.6 as a tool and additionally confirming the results by the reboot process. Accordingly, the cytotoxic profile in J774 macrophages for the ACS series ranged from 15.76 mM to 31.24 mM, so they were promising when compared to cytotoxicity analysis in macrophages demonstrating that molecules n was non-toxic and had cell viability. The results obtained from the evaluation against promastigote (IC<sub>50</sub> = 2.95 - 9.98 mM) and amastigote (IC<sub>50</sub> = 4.00-53.68 mM) strains, it was therefore found that the technical strategy of replacement with non-classical bioisosterism reduced the direct action on the pathogen. The MAL series was selected for further flow cytometry studies due to its low cytotoxicity and increased expression of macrophages, followed by a good microbicidal effect. Therefore, on the viability by flow cytometry of the labeled

Annexin-PI, it was observed that none of the molecules showed cytotoxic profiles against J774 macrophages, corroborating the results obtained in MTT. Finally, studies related to the immunomodulatory profile were carried out with analyzes related to the expression of ERNS, EROS and cytokines related to the Th1 and Th2 response. Achievement of elevated nitric oxide and ROS secretion and an immunomodulatory profile from the increased concentrations of IL2, INF- $\gamma$  and the discrete action of TNF- $\alpha$  followed by reduced cytokines IL-4 and IL-10, and MALUDRIN 3 the best candidate, as it acted in the lowest concentrations. Finally, predictive pharmacokinetic analysis showed pharmacokinetic profiles of absorption, distribution, metabolism, toxicity and excretion, to obtain information that thiophenic acridine derivatives showed excellent absorption in GIT (> 93%). Regarding the interaction profile with CYP-450 enzymes, the possible interaction with CYP2D, an isoenzyme capable of metabolizing several classes of drugs, stands out, and finally, the in-silico toxicity is low to moderate. Regarding the molecular anchoring method, the molecules obtained were complexed with the targets validated for the study of leishmaniasis, the molecules of acridine derivatives showed good binding energies, highlighting MAL1 with multitarget for the biomacromolecules evaluated and the non-activation of the endogenous receptor by MAL3, reinforcing the hypothesis that this molecule has an activity by an immunomodulatory mechanism. MAL3 is listed as a potential molecule for the treatment of infection generated by *L. amazonensis* because it has the best immunomodulation profiles, with the highest selectivity index among the MAL series. In addition, in silico predictive tests showed an absorption rate in the GIT >93% and tolerable oral absorption, acquiring a drug similarity profile.

Keywords: leishmaniasis; acridine derivatives; anti-leishmanial activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico da <i>Leishmania spp</i> .....	31
Figura 2 - Distribuição de casos de LV nas Américas durante os anos de 2001-2016. .....	33
Figura 3 - Letalidade de LV – 2012 a 2018 .....	33
Figura 4 - Incidência de casos de LV no Brasil – Comparativo entre informes. ....	34
Figura 5 - Hepatoesplenomegalia – Paciente com LV.....	35
Figura 6 - Mapa de classificação para relatos de LC em países endêmicos.....	36
Figura 7 - Manifestações clínicas da LC.....	37
Figura 8 - Ulcerações representativas de LMC .....	38
Figura 9 - Fórmula estrutural anfotericina B .....	42
Figura 10 - Estrutura química Miltefosina .....	43
Figura 11 - Estrutura química Paramomicina .....	43
Figura 12 - Estrutura química da Acridina .....	50
Figura 13 - Tiofeno - Estrutura química.....	51
Figura 14 - Derivados 2-aminotiofênicos sintetizados por Rodrigues et al. (2015)....	52
Figura 15 - Estudos conduzidos por Carole et al. 2005 .....	52
Figura 16 - Compostos avaliados por Serafim et al. (2018).....	53
Figura 17 - Compostos intermediários para a síntese da série MAL .....	57
Figura 18 - Série ACS - Serafim et al. (2018).....	59
Figura 19 - Série ACS - Fórmula estrutural .....	72
Figura 20 - Série MAL – Fórmula Estrutural.....	73
Figura 21 - Derivados 2-aminotiofênicos publicados por Rodrigues et al. (2015). ....	85
Figura 22 - Comparativo entre perfis citotóxicos ACS1 e MAL3.....	85

Figura 23 - Avaliação da citotoxicidade dos derivados tiofênicos acrídnicos em linhagens de macrófagos J774 .....	87
Figura 24 - Análise comparativa entre os compostos SB-83 e MAL2. ....	90
Figura 25 - Comparativo entre ACS1 e MAL3 – atividade amastigota .....	91
Figura 26 - Chalconas e influência do grupo metoxila .....	91
Figura 27 - Resultados relativos à atividade microbicida dos derivados tiofênicos acrídnicos .....	93
Figura 28 - Índice de infecção de macrófagos infectados com cepas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> dos compostos tiofênicos acrídnicos – MAL2 e 3 .....	94
Figura 29 - N -[6-(benzoilamino) – 3 – acridina] benzamida .....	95
Figura 30 - Fotomicrografia dos derivados acrídnicos mais promissores classificados a partir de resultados do índice de infecção.....	95
Figura 31 - Avaliação da porcentagem de necrose e apoptose em macrófagos J774 a partir do tratamento com tiofênicos acrídnicos .....	97
Figura 32 - Análise de viabilidade celular dos compostos tiofênicos acrídnicos – MAL .....	98
Figura 33 - Espécies reativas de nitrogênio – Série MAL .....	100
Figura 34 - Log P do composto SB-83 e SB-200 (Rodrigues et al., 2015) e MAL 2 e 3 .....	102
Figura 35 - Espécies reativas de oxigênio – Série MAL.....	104
Figura 36 - Avaliação da resposta imunológica TH1 através dos níveis de IL-2, INF- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ – composto MAL1. ....	107
Figura 37 - Avaliação da resposta imunológica TH1 através dos níveis de IL-2, INF- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ – composto MAL2 .....	109
Figura 38 - Avaliação da resposta imunológica TH1 através dos níveis de IL-2, INF- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ – composto MAL3. ....	111

Figura 39 -Avaliação da resposta imunológica TH2 através dos níveis de IL-4 e IL-10 MAL1. ....	113
Figura 40 -Avaliação da resposta imunológica TH2 através dos níveis de IL-4 e IL-10 MAL2 .....	114
Figura 41 - Avaliação da resposta imunológica TH2 através dos níveis de IL-4 e 10 MAL3. ....	115
Figura 42 - Simplificação molecular – ACS1 deriva MAL3.....	116
Figura 43 - Mapa de ligação 2D – MAL1 (PDB id = 2JK6).....	119
Figura 44 - Mapa de ligação 2D – MAL1, MAL2 e MAL3 (PDB id = 2JK6) .....	120
Figura 45 - Mapas do ligante 2D– MAL1 no sítio de ligação CYP51 .....	123
Figura 46 - <i>Boiled egg</i> – série MAL .....	125
Figura 47 - Derivados benzimidazólicos – compostos nitrogenados.....	127

## LISTA DE QUADROS

Quadro 01 - Doenças mais negligenciadas – classificadas pela OMS.....	30
Quadro 02 - Antimoniais Pentavalentes .....	41

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01 - Delineamento da Pesquisa .....	55
Esquema 02 - Compostos Tiofênicos-Acrídnicos .....	58
Esquema 03 - Rota Sintética dos Derivados Tiofênicos Acrídnicos – Série MAL.....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização físico-química dos derivados tiofênicos acrídnicos.....	75
Tabela 2 - Dados das massas exatas dos íons moleculares .....	76
Tabela 3 - Espectro de Infravermelho – Estiramentos correspondentes aos tiofênicos acrídnicos .....	77
Tabela 4 - Dados do RMN de <sup>1</sup> H dos compostos sintetizados série MAL .....	79
Tabela 5 - Dados do RMN de <sup>13</sup> C dos compostos sintetizados série MAL .....	81
Tabela 6 - Citotoxicidade dos derivados tiofênicos acrídnicos representados pela concentração citotóxica em 50% dos macrófagos J774 (CC <sub>50</sub> ) - ACS.....	83
Tabela 7 - Citotoxicidade dos derivados tiofênicos acrídnicos representados pela concentração citotóxica em 50% dos macrófagos J774 (CC <sub>50</sub> ) – MAL...	84
Tabela 8 - Resultados de IC <sub>50</sub> para cepas promastigotas e amastigotas tratadas com derivados tiofênicos acrídnicos - ACS. ....	88
Tabela 9 - Resultados de IC <sub>50</sub> para cepas promastigotas e amastigotas tratadas com derivados tiofênicos acrídnicos – MAL.....	90
Tabela 10 - Energia de ligação para o alvo biológico - 2JK6 – Tripanotiona redutase - <i>L. infantum</i> .....	118
Tabela 11 - Energia de ligação para o alvo biológico - 3L4D – 14-alfa-desmetilase de esterol - <i>L. infantum</i> .....	122
Tabela 12 - Parâmetros preditivos relacionados ao processo de absorção e com distribuição dos compostos tiofênicos acrídnicos .....	126
Tabela 13 - Parâmetros para predição de permeabilidade em células CACO-2.....	127
Tabela 14 - Interação entre os derivados tiofênicos acrídnicos e as isoformas da com CYP450 .....	128
Tabela 15 - Estudo preditivo <i>in silico</i> de toxicidade dos compostos tiofênicos com acrídnicos.....	129

Tabela 16 - Resultado relativos à análise <i>in silico</i> dos compostos tiofênicos acrínicos no quesito farmacocinético de excreção .....	130
Tabela 17 - Perfil <i>druglikeness</i> - MALs.....	131

## LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	Acridina substituída
DAT	Testes de aglutinação direta
DM	Docking molecular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
IV	Infravermelho
ELISA	Ensaio imuneenzimático
EM	Espectrometria de massas
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
LC	Leishmaniose cutânea
LDSF	Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos
LMC	leishmaniose muco-cutânea
LSVM	Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas
LV	Leishmaniose visceral
MAL	MAL
MS	Massas
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle
OMS	Organização mundial da Saúde
PM	Peso molecular
QM	Química Medicinal
QSAR	Relação estrutura atividade
RMN	ressonância magnética nuclear
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
Rf	Fator de retenção

TyrR

Tripanotiona redutase

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>Kg</b>	Quilograma
<b>g</b>	Grama
<b>mg</b>	Miligrama
<b>µg</b>	Micrograma
<b>°C</b>	Graus celsius
<b>µM</b>	Micromolar
<b>L</b>	Litro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>µL</b>	Microlitro
<b>%</b>	Porcentagem
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>m</b>	Metro
<b>cm</b>	Centímetro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>α</b>	Alfa
<b>Kcal</b>	Quilocaloria
<b>Å</b>	Ångström
<b>Log</b>	Logaritmo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>29</b>
3.1	DOENÇAS NEGLIGENCIADAS.....	29
<b>3.1.1</b>	<b>Leishmaniose: Caracterização da doença e formas de infecção.....</b>	<b>31</b>
3.1.1.1	Ciclo biológico.....	31
<b>3.1.2</b>	<b>Tipos de Leishmaniose.....</b>	<b>32</b>
3.1.2.1	Leishmaniose Visceral (LV).....	32
3.1.2.2	Leishmaniose cutânea (LC).....	35
<b>3.1.3</b>	<b>Leishmaniose mucocutânea (LMC).....</b>	<b>37</b>
3.2	INTERAÇÃO DO PARASITO-HOSPEDEIRO E IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE.....	38
3.3	TERAPÊUTICA DA LEISHMANIOSE.....	41
3.4	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA FRENTE A TERAPIA MEDICAMENTOSA DA LEISHMANIOSE.....	44
3.5	PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS.....	45
<b>3.5.1</b>	<b><i>Docking</i> molecular.....</b>	<b>46</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Modelos Farmacocinéticos.....</b>	<b>48</b>
3.6	QUÍMICA MEDICINAL APLICADA AO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSES.....	49
3.6.1	Derivados acrídnicos.....	50
3.6.2	Derivados Tiofênicos-Acrídnicos.....	51
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>55</b>
4.1	DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	55
4.2	SÍNTESE ORGÂNICA – DERIVADOS ACRÍDINICOS.....	57
<b>4.2.1</b>	<b>Síntese da série MAL.....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Tipo de estudo.....</b>	<b>60</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Células.....</b>	<b>60</b>

4.2.4	<b>Microrganismos.....</b>	61
4.3	ESTUDOS PRELIMINARES – SÉRIE ACS E MAL.....	61
4.3.1	<b>Determinação do efeito citotóxico dos derivados acrídnicos em cultivos de macrófagos J774 - Método MTT.....</b>	61
4.3.2	<b>Determinação do efeito inibitório dos derivados acrídnicos frente a cepas - método de MTT.....</b>	62
4.3.2.1	Cepas promastigotas de <i>L. amazonenses</i> .....	62
4.3.2.2	Cepas amastigotas de <i>L. amazonenses</i> .....	62
4.4	BREVE RELATO DO CENÁRIO MUNDIAL PANDÊMICO E DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA NO BRASIL.....	63
4.5	ANÁLISE BIOLÓGICA – SÉRIE MAL.....	64
4.5.1	<b>Determinação do efeito microbicida dos derivados acrídnicos em cultivos de macrófagos J774 infectados com <i>L. amazonenses</i>.....</b>	65
4.5.2	<b>Citotoxicidade - Método de Anexina-PI.....</b>	65
4.5.3	<b>Análise de espécies reativas e citocinas em macrófagos J774 infectados com cepas amastigotas de <i>L. amazonenses</i>.....</b>	65
4.5.3.1	Infecção dos macrófagos J774.....	65
4.5.3.2	Espécies reativas de nitrogênio (ERNs).....	66
4.5.3.3	Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	67
4.5.3.4	Citocinas.....	68
4.5.3.5	Análise estatística.....	69
4.6	ENSAIO <i>IN SILICO</i> .....	69
4.6.1	<b>Determinação do perfil ADMET.....</b>	69
4.6.2	<b>Ancoragem molecular.....</b>	70
4.6.2.1	Preparação dos ligantes.....	70
4.6.2.2	Estudos de ancoragem molecular para validação ( <i>redocking</i> ).....	70
4.6.2.3	Obtenção das interações 2D entre os alvos e os ligantes.....	71
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	72
5.1	SÍNTESE DOS COMPOSTOS TIOFÊNICOS ACRÍDINICOS.....	73
5.1.1	<b>Síntese dos compostos finais: série MAL.....</b>	74
5.2	ATIVIDADE BIOLÓGICA – DERIVADOS TIOFÊNICOS ACRÍDINICOS.....	82

5.2.1	<b>Determinação do efeito citotóxico dos derivados acrídnicos em cultivos de macrófagos J774 – série ACS e MAL.....</b>	82
5.2.2	<b>Determinação do efeito inibitório dos derivados acrídnicos frente a cepas - promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonenses</i>.....</b>	88
5.2.3	<b>Determinação do efeito microbicida dos derivados acrídnicos em cultivos de macrófagos J774 infectados com <i>L. amazonenses</i>.....</b>	92
5.2.4	<b>Análise da expressão de Anexina-PI no cultivo macrófagos J774 sob exposição de derivados tiofênicos acrídnicos.....</b>	96
5.2.5	<b>Análise de espécies reativas e citocinas em macrófagos J774 infectados com cepas amastigotas de <i>L. amazonenses</i>.....</b>	99
5.2.5.1	Espécies reativas de nitrogênio (ERNs).....	99
5.2.5.2	Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	102
5.2.5.3	Citocinas.....	106
5.3	<b>ESTUDOS <i>IN SILICO</i>.....</b>	116
5.3.1	<b>Ancoragem molecular.....</b>	116
5.3.1.1	<i>Docking</i> molecular em alvos de leishmania para classe dos derivados tiofênicos acrídnicos.....	117
5.3.1.2	Farmacocinética <i>in silico</i> .....	124
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	132
7	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	134
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	135
	<b>APÊNDICE A - Espectro de Massas – MAL1.....</b>	146
	<b>APÊNDICE B - Espectro de Massas – MAL2.....</b>	147
	<b>APÊNDICE C - Espectro de Massas – MAL3.....</b>	148
	<b>APÊNDICE D - Espectro de Infravermelho - MAL1 .....</b>	149
	<b>APÊNDICE E - Espectro de Infravermelho – MAL2 .....</b>	150
	<b>APÊNDICE F - Espectro de Infravermelho – MAL3.....</b>	151
	<b>APÊNDICE G - Espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos compostos sintetizados série MAL1.....</b>	152
	<b>APÊNDICE H - Espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos compostos sintetizados série MAL2.....</b>	153

<b>APÊNDICE I - Espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos compostos sintetizados série MAL3.....</b>	<b>154</b>
<b>APÊNDICE J - Espectros de RMN de <sup>13</sup>C dos compostos sintetizados série MAL1.....</b>	<b>155</b>
<b>APÊNDICE K - Espectros de RMN de <sup>13</sup>C dos compostos sintetizados série MAL2.....</b>	<b>156</b>
<b>APÊNDICE L - Espectros de RMN de <sup>13</sup>C dos compostos sintetizados série MAL3.....</b>	<b>157</b>
<b>APÊNDICE M - Avaliação da citotoxicidade dos derivados tiofênicos acrídnicos em linhagens de macrófagos J774.....</b>	<b>158</b>
<b>APÊNDICE N - Mapas – Ancoragem molecular - Alvo 2JK6</b>	<b>160</b>
<b>APÊNDICE O - Mapas – Ancoragem molecular - Alvo 3L4D</b>	<b>163</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças negligenciadas são classificadas como desordens fisiológicas causadas por agentes infecciosos ou parasitos, acometendo principalmente regiões subtropicais e tropicais, ocorrendo principalmente em continentes como Ásia, África e Américas. Os fatores de risco estão atrelados à ausência de saneamento básico e ao contato direto com os vetores (OMS, 2018). As enfermidades frequentemente relatadas com as desordens negligenciadas são: doença de Chagas, tripanossomíase africana, filariose linfática, dengue, esquistossomose e leishmaniose (WHO, 2017).

As leishmanioses caracterizam-se como uma doença infecto-parasitária, de transmissão vetorial, causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania spp*, ocorrendo de três maneiras: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (FEASEY et al., 2010; WHO, 2010, MACHADO, 2017; WHO, 2019).

Segundo dados do Informe Epidemiológico das Américas, publicados em 2019, foram catalogados 59.769 casos de LV, entre 2001 e 2017, dos quais 96% são relatados no Brasil. Em 2021, foram registrados 3466 casos de LV. No Brasil o que representa uma taxa de 20,8% em relação a todos os países acompanhados pela OMS. Em relação a leishmaniose cutânea (LC), revelou-se a ocorrência de 12.690 casos em 2016 (OPAS, 2018). Em adição, nas Américas, catalogou-se 940.396 novos casos de LC, por 17 países, no intervalo de tempo supracitado (OPAS, 2019; OMS, 2021).

O tratamento farmacológico de primeira linha consiste em antimoniais pentavalentes, sendo eles: antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio. Além disso, fármacos de segunda linha também podem ser uma opção a exemplo da Anfotericina B, Miltefosina e Paromomicina (BAREA et al., 2018).

A utilização das terapias medicamentosas disponíveis, geram diversos efeitos adversos, principalmente mialgia, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos. Além disso, existe ainda o agravante da toxicidade, bem como, da administração dolorosa, por via endovenosa, dos fármacos utilizados para tratar a leishmaniose. Portanto, acredita-se que esses são os principais fatores limitantes para o abandono no tratamento e, por consequência, o surgimento de resistência das

cepas (BALANÃ-FOUCE et al., 1998; FRÉZARD, DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; BASTOS et al., 2016; ELMAHALLAWY et al., 2021).

Assim, tem-se a necessidade da descoberta de novas moléculas químicas e a química medicinal surge como uma alternativa para delinear novas entidades para atividade leishmanicida de modo a solucionar problemas como elevada toxicidade, resistência aos fármacos disponíveis no mercado e ainda melhorar a atividade com base na estrutura do ligante (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVEIRA, 2010). Os derivados acrídnicos são exemplos desses compostos que exibem uma gama de atividades biológicas, como antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, antimalárica, anti-alzheimer, tripanocida e leishmanicida (RODRIGUES et al, 2015; SERAFIM et al, 2018).

Neste contexto, este estudo teve como alvo avaliar as moléculas da série ACS, modificá-las por bioisosterismo não clássico, traçar o perfil citotóxico e leishmanicida da classe denominada derivados tiofênicos-acrídnicos e realizar o estudo *in silico* dos compostos produzidos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Planejar e sintetizar derivados tiofênicos-acridínicos a partir da simplificação molecular dos compostos da série ACS e avaliar o potencial antileishmania e aspectos imunomodulatórios.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Promover a síntese química de 03 novos derivados tiofênicos-acridínicos;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas dos compostos sintetizados;
- Elucidar estruturalmente esses novos derivados através de diferentes técnicas espectroscópicas
- Avaliar a citotoxicidade das moléculas sintetizadas em macrófagos J774
- Testar os compostos desenvolvidos frente as cepas de *L. amazonensis* fases evolutivas promastigotas e amastigotas
- Selecionar os melhores compostos a partir dos ensaios anteriores e realizar os ensaios relativos à expressão de anexina-PI para avaliação mais robusta da citotoxicidade;
- Realizar testes relativos à liberação de ERNs e EROs em macrófagos J774 infectados com *L. amazonensis*;
- Realizar testes relativos à liberação de citocinas envolvidas nas respostas imunológicas Th1 e Th2 em macrófagos J774 infectados com *L. amazonensis*;
- Realizar estudo *in silico* de farmacocinética e *ancoragem molecular*.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define as doenças tropicais negligenciadas (DTNs) como um grupo de enfermidades que são transmissíveis e prevalecem em regiões subtropicais e tropicais em cerca de 149 países (OMS, 2018). Por isso, atribui-se a ocorrência dessas desordens a países com baixo índice de desenvolvimento, relacionando-as a locais com iniquidade de saúde, precárias condições de vida e extrema pobreza (JÚNIOR; AQUINO, 2015).

O Brasil possui uma das economias que mais crescem no mundo, com um PIB (produto interno bruto) crescente e uma renda *per capita* de R\$ 32.747 (IBGE, 2019). Porém, esses números não traduzem a realidade, uma vez que o Brasil possui o índice GINI de 0,515, classificando-se como o décimo país com maior desigualdade em um ranking de 140 países. Deste modo, a fatia representativa da pobreza é de 10% da população brasileira e abaixo da linha da pobreza é possível encontrar um montante de 12 milhões de brasileiros (HOLLING, 1973; PAES DE BARROS; FOGUEL; ULYSSEA, 2004; IBGE, 2018).

Na atual conjuntura econômica do Brasil, o cenário pós pandêmico é ainda mais preocupante pois a população brasileira se apresenta com renda média de R\$ 995,00 e assume a posição de um país mais desigual com uma taxa GINI de 0,674 em 2021, dando um salto gigantesco na desigualdade social (BRASIL, AGÊNCIA; 2021).

As maiores concentrações de pobreza no Brasil se encontram nas regiões norte do estado de Minas Gerais, Noroeste do estado do Amazonas e na região Nordeste, incluindo os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe. Estes estados são representativos do maior foco de incidência de doenças negligenciadas (HOTEZ *et al.*, 2017)

Em 2001, a OMS dividiu as doenças em três tipos, sendo o Tipo I, o grupo que compreende as doenças que afetam indistintamente todas as populações, como o câncer, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias e do sistema nervoso, concentrando nesse grupo um maior investimento monetário por parte das indústrias farmacêuticas.

As enfermidades compreendidas no Tipo II são aquelas que detêm um relativo interesse das indústrias farmacêuticas, sendo denominadas negligenciadas e afetam grupos de pessoas em países em desenvolvimento e em países pobres, como exemplo a AIDS, tuberculose e malária.

Por fim, no tipo III, estão inseridas as doenças mais negligenciadas, acometendo principalmente indivíduos de regiões mais pobres do planeta e não representa qualquer interesse econômico por parte das indústrias farmacêuticas (JUNIOR & AQUINO, 2015). Neste grupo, descreve-se as doenças listadas no quadro 1.

Quadro 1 - Doenças mais negligenciadas – classificadas pela OMS (2017)

DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS	
Chikungunya e dengue	Dracunculíase (doença do verme da Guiné)
Doença de chagas	Equinococose
Envenenamento por picada de cobra	Esquistossomose
Filariose linfática	Hanseníase
Helmintíases transmitidas pelo solo	Leishmaniose
Micetoma, cromoblastomicose e outras micoses profundas.	Oncocercose (cegueira dos rios)
Raiva	Sarna e outros ectoparasitas
Tracoma	<i>Taenia</i> /Cisticercose
Trematodiasas transmitidas por alimentos	Tripanossomíase humana africana
Úlcera de buruli	Yaws (treponematoses endêmicas)

Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2017.

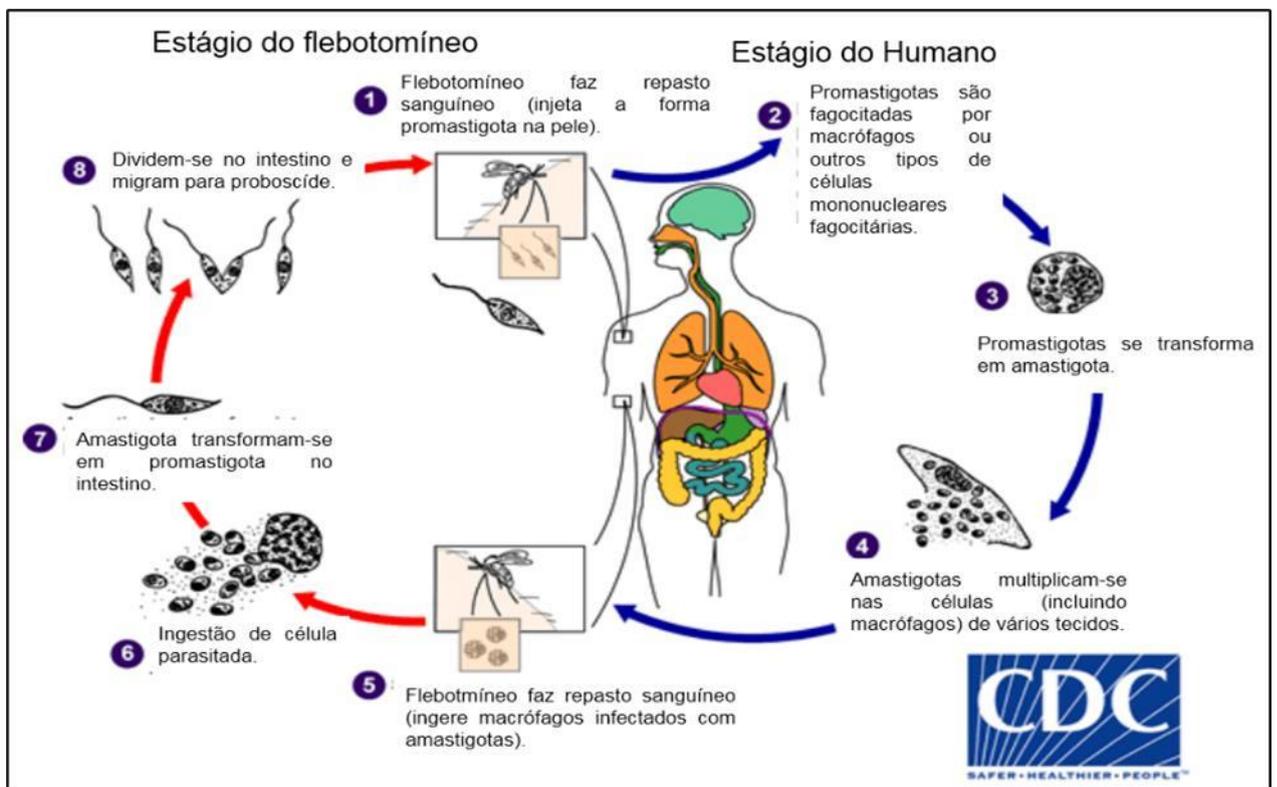
Dentre as doenças do tipo III, a leishmaniose é considerada como uma das mais incidentes no Brasil. É caracterizada por um complexo de doenças parasitárias infecciosas causadas por protozoários pertencente à família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (OMS, 2017).

### 3.1.1 Leishmaniose: Caracterização da doença e formas de infecção

#### 3.1.1.1 Ciclo biológico

O ciclo de vida dos parasitos da leishmaniose é classificado como heteroxênico, descrito na figura 1, possuindo duas formas, sendo uma forma celular flagelada (promastigota), forma infectante, habitando no intestino do vetor (insetos flebotomíneos) e a outra intracelular não flagelada (amastigota), encontrada no interior dos macrófagos e células dendríticas, responsável pelas manifestações clínicas da doença (MACHADO et al., 2017; SILVA et al., 2018).

Figura 1 - Ciclo biológico da *Leishmania* spp.



Fonte: Center for Disease Control and Prevention (2018) – adaptado

O processo de infecção da *Leishmania* é iniciado quando o vetor, representado por mosquitos flebotomíneos (gênero *Lutzomyia* - conhecido vulgarmente como “mosquito-palha”, “cangalhinha”, “birigui”), injetam as cepas promastigotas metaciclícas em um hospedeiro vertebrado, infectando os macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares. Os parasitos, após se modificarem da forma promastigota para a amastigota, replicam-se no interior destas células, provocando o seu rompimento, e extravasam-se para a corrente sanguínea na forma de amastigota, produzindo assim as manifestações clínicas da leishmaniose (CDC, 2018).

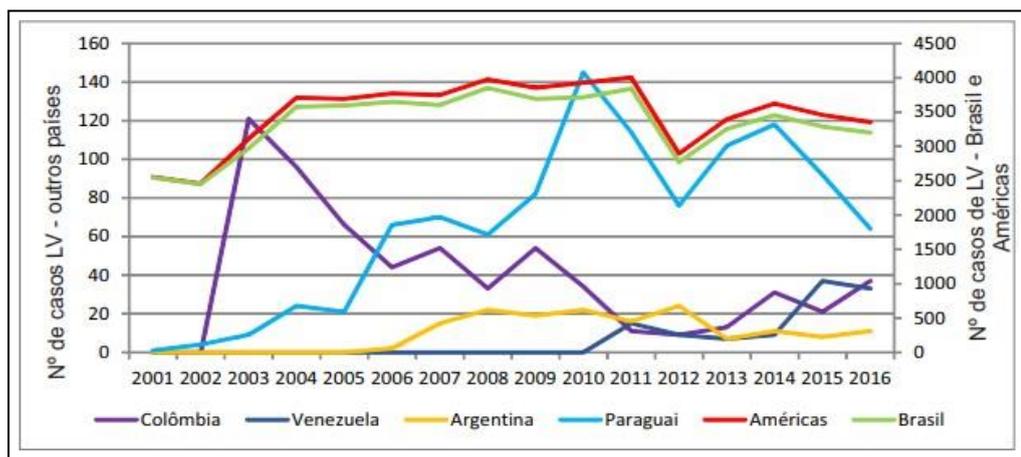
De acordo com o tipo de espécie da cepa, estas desordens fisiológicas podem-se subdividir em: Leishmaniose visceral (LV), Leishmaniose cutânea (LC), Leishmaniose muco-cutânea (LMC) e Leishmaniose cutânea difusa (LCD) (FEASEY et al., 2010; WHO, 2010; MACHADO et al., 2017).

### **3.1.2 Tipos de Leishmaniose**

#### *3.1.2.1 Leishmaniose Visceral (LV)*

A leishmaniose visceral (LV) possui distribuição mundial em 76 países, sendo endêmica em doze países das Américas, onde 96% dos casos são catalogados no Brasil (OPAS; OMS, 2018). Em 2018, a OPAS (Organização Pan-americana de Saúde) publicou um censo avaliando a progressão de casos de LV nas Américas no período de 2001-2016, cujos dados estão descritos na Figura 2. No novo censo, publicado em 2019, observou-se um aumento de 28% nos casos reportados pelo Brasil, seguido da diminuição de casos na Colômbia (21%) e Paraguai (47%) (OPAS, 2019).

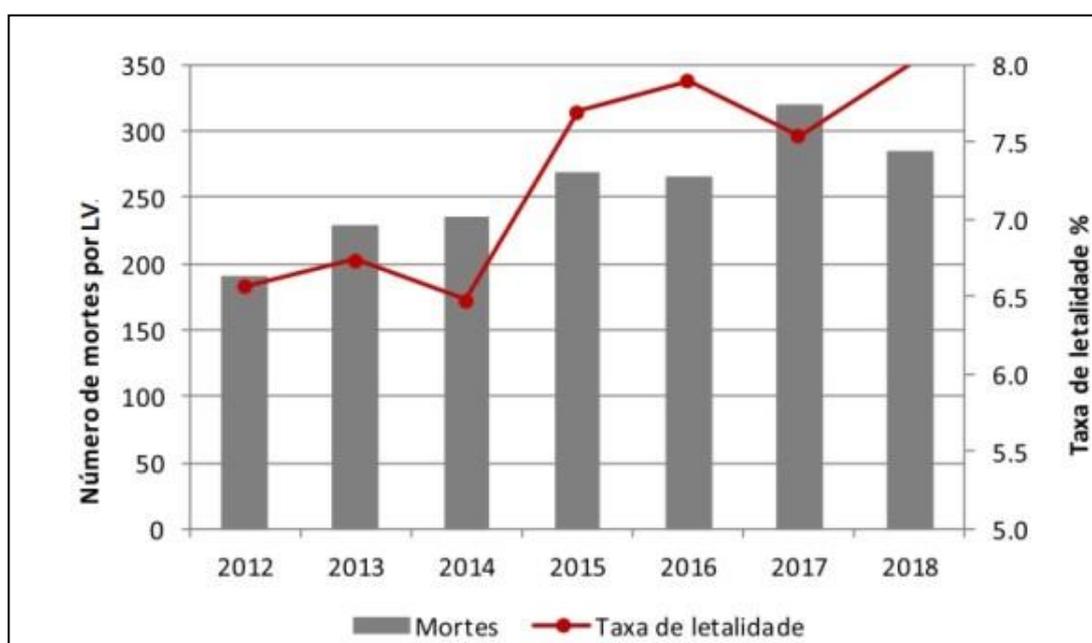
Figura 2 - Distribuição de casos de LV nas Américas durante os anos de 2001-2016.



Fonte: Informe de Leishmanioses Nº 6 - Fevereiro, 2018 – OPAS/OMS – 2018.

No senso nº 8 emitido pela Organização Mundial de Saúde, publicado em 2019, novamente o Brasil assume a porcentagem de 97% dos novos casos catalogados na América, com valor absoluto totalizando 3.466 novos casos. Seguido do aumento da taxa de letalidade das Américas com uma taxa de 8%, a maior taxa desde 2018 (Figura 3).

Figura 3 - Letalidade de LV – 2012 a 2018

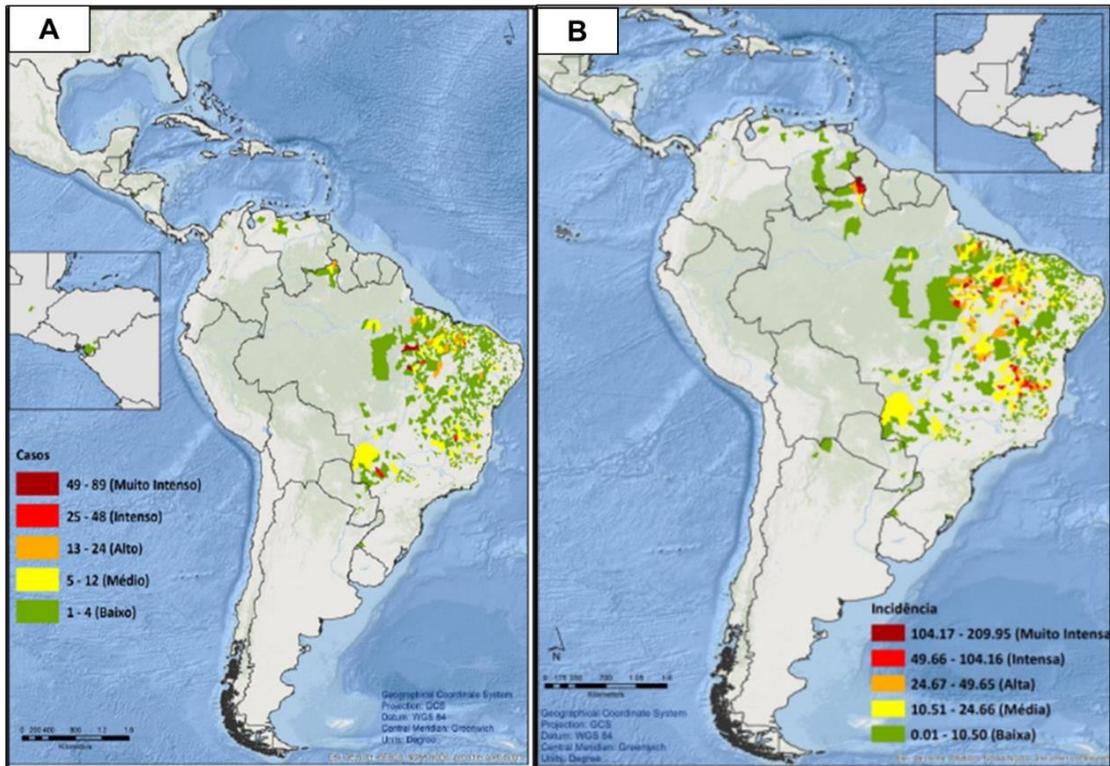


Fonte: Informe de Leishmanioses Nº 8 - Fevereiro, 2019 – OPAS/OMS – 2019.

Neste mesmo senso, verificou-se a incidência dos casos de LV no Brasil de 5,23 casos para cada 100.000 habitantes em 2017. De acordo com a distribuição presente na Figura 4, podemos verificar, em comparação ao senso de 2018, que os

casos de LV demonstraram uma expansão geográfica, seguido de aumento de casos na América Central (OPAS/OMS, 2018; OMS, 2019).

Figura 4 - Incidência de casos de LV no Brasil – Comparativo entre informes.



**Legenda:** A: Informe nº6 (2018) e informe nº 7 (2019) **Fonte:** OPAS/OMS – 2018/2019.

A LV se manifesta a partir da infecção por cepas de *Leishmania donovani* e *L. infantum* (TIWARI; DUBEY, 2018; SILVA et al., 2018). Os parasitos apresentam-se como hospedeiros do sistema mononuclear fagocitário, deste modo, a proliferação exacerbada gera um largo comprometimento ao indivíduo, causando danos como hepatoesplenomegalia (Figura 5), supressão da medula óssea com progressão de quadro clínico a pancitopenia e imunossupressão, tornando-o susceptível a outras infecções (ALMEIDA et al., 2017).

Figura 5 - Hepatoesplenomegalia – Paciente com LV



Fonte: PAHO (2018).

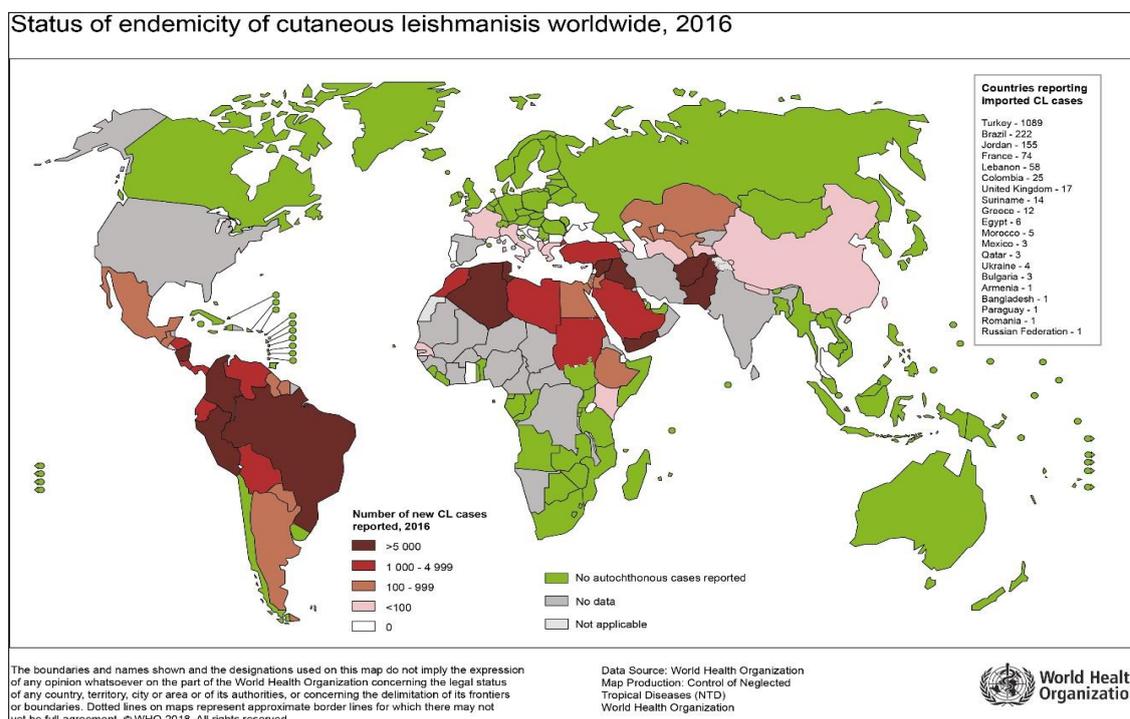
O diagnóstico da LV ocorre a partir de exame clínico, exame de pesquisa de parasitos (material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos) e ainda o exame imunológico composto por testes de aglutinação direta (DAT), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (GONTIJO; MELO, 2004).

### 3.1.2.2 *Leishmaniose cutânea (LC)*

A Leishmaniose cutânea (LC) caracteriza-se como uma doença infecciosa, porém, não contagiosa causada por diferentes tipos de protozoários do gênero *Leishmania*. Os principais são: *L. guyanensis*; *Leishmania braziliensis* e a *L. amazonensis* (BOURREAU et al., 2015; COSTA et al., 2017).

Segundo dados da OMS, esta doença é considerada endêmica em 18 países (Figura 6), sendo relatados, entre os anos de 2001 a 2016, 892.846 casos. Em 2016, os maiores registros foram relatados no Brasil, com 12.690 casos, seguido da Colômbia, que contabilizou 10.996 casos e Nicarágua, com 5.423 casos. No Brasil, em 2017, notificou-se 17.809 casos e entre os anos de 2005 e 2017, 268.601 casos de LC (PAHO; OMS, 2018).

Figura 6 - Mapa de classificação para relatos de LC em países endêmicos



Fonte: OMS (2018).

As lesões cutâneas iniciam-se entre duas semanas e dois meses após o período de incubação, formando na região da picada uma mácula, que evolui posteriormente para uma úlcera de formato arredondado ou ovalado, geralmente indolor e sem prurido, com bordas delimitadas e elevadas, e fundo avermelhado com granulações (BRASIL, 2017). As manifestações clínicas da LC estão representadas na Figura 7, e se subdividem em:

- Forma cutânea localizada: classificada como a mais simples das lesões, com tendência à cura espontânea, comumente associada as cepas de *L. guyanensis* (Figura 7a.)
- Forma cutânea disseminada: ocorre em menor escala que as demais e são causadas por cepas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Figura 7b).
- Forma recidiva cútis: após a cicatrização das lesões aparecem úlceras nas bordas, sendo indicativa de que o tratamento não ocorreu de forma efetiva (Figura 7c.).
- Forma cutânea difusa: Caracterizada como a forma clínica rara e mais grave, sendo causada pelo parasito *L. amazonensis*. O tratamento tende a não ocorrer de maneira eficaz e a resposta imune aos patógenos é prejudicada (Figura 7d).

Figura 7 - Manifestações clínicas da LC



Legenda: 7a: Forma cutânea localizada; 7b. Forma Cutânea disseminada 7c. Forma recidiva cútis; 7d Forma cutânea difusa. **Fonte:** BRASIL (2017).

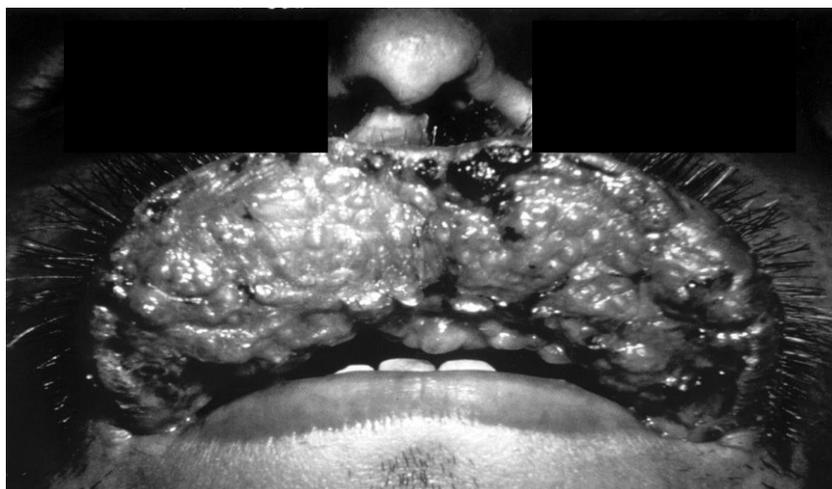
O diagnóstico laboratorial ocorre principalmente por pesquisa de parasitos a partir de microscopia, histologia ou cultura e pelo método de reação em cadeia de polimerase (PCR) e ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática). Além destes, o teste de Montenegro, caracterizado como principal teste de diagnóstico complementar é realizado a partir da inoculação de antígeno de *Leishmania*, onde o resultado positivo consiste na detecção de reação cutânea após 48 horas do início do teste (MAYRINK et al., 2006 VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; FAGUNDES; SILVA, 2007; AERTS et al., 2018).

### 3.1.3 Leishmaniose mucocutânea (LMC)

A leishmaniose mucocutânea foi descoberta pelos pesquisadores Splendore e Gaspar Viana (1911), sendo descrito como agente etiológico as cepas de *Leishmania braziliensis*. A característica principal da LMC é uma reação imunológica intensa com escassez dos parasitos, diferente da LC. A resposta proliferativa e a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são significativamente maiores, promovendo a destruição de partículas antigênicas, e conseqüentemente, a destruição de tecidos (BRASIL, 2017).

A LMC possui período de incubação de 1 a 3 meses e as erupções cutâneas caracterizam-se como ulcerações de progressão lenta, geralmente ocorrendo no nariz, boca, traqueia e orofaringe (STARK et al, 2018), como disposto na Figura 8.

Figura 8 - Ulcerações representativas de LMC.



Fonte: F. Wagner, K.F. (2018).

O diagnóstico ocorre de maneira semelhante a LC. As cepas responsáveis pela infecção de LMC são as cepas de *L. braziliensis* e os ensaios de diagnósticos específicos incluem exames histopatológicos ou citológicos dos tecidos afetados, além de sorologia, ensaios de PCR e cultura de organismos nos tecidos afetados e/ou sangue (SYKES et al., 2014; ITO et al., 2015).

### 3.2 INTERAÇÃO DO PARASITO-HOSPEDEIRO E IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE

A imunologia das leishmanioses está relacionada com algumas moléculas secretadas pela *Leishmania*, que são mediadores-chave na interação parasito-hospedeiro, dentre elas a metaloprotease (GP63), o antígeno de superfície promastigota-2 (PSA-2), a fosfatase ácida secretada (sAcP), proteínas de membrana de cinetoplasto-11 (KMP-11), proteínas de choque térmico (HSP-70) e cisteínas proteases (JAFFE; DWYER, 2013; BHANDAR et al., 2013; CARRILLO ET AL., 2008 SOUZA, 2014).(MARKIKOU-OUNI et al, 2015; GARG G., SINGH, K. ALIDR, V, 2018)

A GP63 apresenta-se expressa majoritariamente pelas formas promastigotas; a sua função não está totalmente esclarecida, porém existem indícios que a

correlacionam à capacidade de virulência das cepas e ainda à promoção de mecanismo de resistência no parasito. A PSA-2 possui função semelhante a GP63, porém não se encontra expressa na espécie *L. braziliensis* (JAFFE; DWYER, 2013; BHANDAR et al., 2013).

A fosfatase ácida (sAcP) possui papel importante como fator de virulência, para a sobrevivência do parasito no mosquito e ainda se relaciona à maturação dos vacúolos em macrófagos pós infecção (GARG G., SINGH, K. ALIDR, V, 2018).

A cinetoplasto-11 (KMP-11) se caracteriza como uma proteína de membrana, encontrada nos parasitos do gênero *Leishmania*, tanto nas formas amastigotas quanto promastigotas, podendo ser detectada na bolsa flagelar e em vesículas intracelulares. A função majoritária da KMP-11 está relacionada à estabilização do LPG (lipofosfoglicano – gliconjugado), responsável por promover a aderência entre as formas evolutivas do parasito do gênero de *Leishmania* e o hospedeiro vertebrado e invertebrado, na membrana do parasito, de modo a regular a pressão da bicamada lipídica e influenciar os fatores de virulência da infecção (AMBROSIO, 2008; SANTOS, 2011; MENDONÇA, 2015; BOUSSOFFARA et al., 2019).

As HSP-70 atuam como antígenos, possivelmente induzindo a secreção de IFN- $\gamma$  e IL-2 em pacientes com LMC, podendo ainda estarem relacionadas à expressão da resposta imune do tipo Th1. A expressão de cisteínas proteases relaciona-se ao metabolismo de aminoácidos e indução da respiração mitocondrial, gerando níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e promovendo a sobrevivência das formas amastigotas dentro do macrófago do hospedeiro (CARRILLO et al., 2008; SOUZA, 2014).

Por fim, as cisteínas proteases são expressas de várias formas, dentre elas as mais extensamente caracterizadas são CPA, CPB e CPC (CPs A, B e C). As funções estão relacionadas a modulação da resposta imune do hospedeiro, capacidade de virulência e podem ainda desempenhar atividade pró-inflamatória (SIQUEIRA-NETO et al., 2018). Portanto, essas moléculas são de fundamental importância para virulência do parasito e patogenicidade, protegendo-o da ação precoce do sistema imune (MARKIKOU-OUNI et al, 2015).

Deste modo, a ativação da resposta imunológica aos parasitos de *Leishmania spp* no hospedeiro, torna-se um fator crítico para o controle e tratamento da leishmaniose. Acredita-se que a resposta imune se inicia no momento que o mosquito injeta os primeiros parasitos no hospedeiro. A saliva do inseto possui agentes pró-

inflamatórios, como por exemplo, maxadilan, apirase e as proteínas da família *yellow*, capazes de gerar vasodilatação, inibir a agregação plaquetária e a coagulação, e ainda liberar componentes capazes de facilitar o desenvolvimento da infecção no hospedeiro, podendo estar relacionada à redução da capacidade de produzir peróxido de oxigênio e óxido nítrico, diminuir a capacidade de apresentação de antígenos pelos macrófagos e ainda induzir a produção de IL-4 por linfócitos e, por fim, inibir a progressão da resposta imune mediada por Th1 e APCs (células apresentadoras de antígenos) (ROMÃO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2015; CAVALCANTI, 2016)

Após a inoculação do parasito, as formas promastigotas metacíclicas irão infectar macrófagos e células dendríticas. Uma vez internalizados nessas células, formam-se os fagossomas, que se caracterizam por compartimentos ricos em enzimas proteolíticas com funções digestivas e microbicidas, que modulam a resposta imune celular, promovendo o surgimento da reação de hipersensibilidade tardia a antígenos no local da picada, inibindo a ação do sistema complemento, de células dendríticas e de macrófagos (FEITOSA et al., 2018).

Os macrófagos possuem a função de fagocitar os patógenos e neutralizá-los intracelularmente, apresentando forte papel microbicida, e sendo ativados por citocinas, como por exemplo o interferon gama ou imunomodulados por fármacos, como o Glucantine® (DUQUE, A.G.; DESCOTEAUX, A. 2015).

As manifestações clínicas da doença estão relacionadas a dois tipos de células T *helper* (Th), descritas como Th1 (IFN- $\gamma$ ,  $\alpha$ TNF, IL-2) e Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13). As citocinas se expressam de maneira particular em cada estágio da doença: quando as infecções se apresentam em expansão na resposta Th2 que guia a progressão do processo infeccioso promovendo um aumento da concentração e proliferação das IL 4 e 10. Este evento difere em relação a resposta Th1, pois envolve o processo fisiológicos de defesa em que existem a expressão das células CD4<sup>+</sup> e liberação das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 (SAHA; MUKHOPADHYAY; CHATTERJEE, 2011; ISLAMUDDIN et al., 2015).

Em adição, a resposta celular pode variar de acordo com a espécie de *Leishmania*, tamanho e números de picadas, variabilidade genética do hospedeiro mamífero e saliva do flebotomíneo sendo necessário realizar uma análise mais criteriosa diante de cada tipo de infecção (MUTISO, 2013; SCOTT & NOVAIS, 2016).

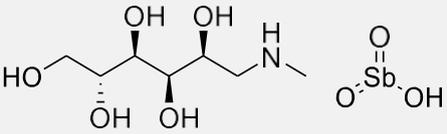
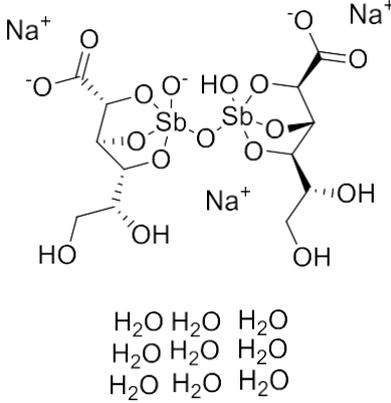
### 3.3 TERAPÊUTICA DA LEISHMANIOSE

Em 1912, Gaspar Viana descobriu o primeiro medicamento para o tratamento da leishmaniose, denominado “tártaro emético”. Posteriormente, houve a introdução de “antimoniais trivalentes” na Itália e Índia, que por seus efeitos adversos tóxicos (intolerância gastrointestinal e cardiotoxicidade), foram substituídos pelos antimoniais pentavalentes (RATH et al., 2003; JUNIOR; AQUINO, 2015).

Os antimoniais pentavalentes (Quadro 2) são utilizados desde 1945 e representam os fármacos de primeira escolha na terapêutica da leishmaniose, representados por antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®) (BASTOS et al., 2016).

Os mecanismos de ação desses fármacos ainda não estão bem esclarecidos, porém, acredita-se que esses compostos inibem as vias bioenergéticas como a glicólise e a oxidação de ácidos graxos em amastigotas da leishmaniose (KUHLMANN, M. F.; FLECKENSTEIN, J. M., 2017).

Quadro 2 - Antimoniais Pentavalentes

FÓRMULA ESTRUTURAL	NOME QUÍMICO
	<p>Antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®)</p>
	<p>Estibogluconato de sódio ou Gluconato de antimônio (V) sódico (Pentostan®)</p>

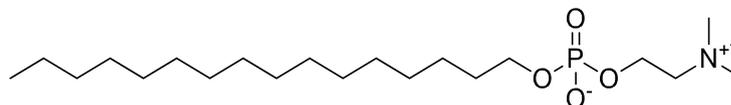
Fonte: RATH et al, 2003.

Os medicamentos são administrados por via intravenosa ou intramuscular, geralmente com a dosagem de 20 mg/Kg, durante 30 dias. A aplicação dos



et al., 2016). A toxicidade deste fármaco é exibida nas células epiteliais do trato gastrointestinal e ainda possui alto potencial hemolítico (PETIT et al., 2018).

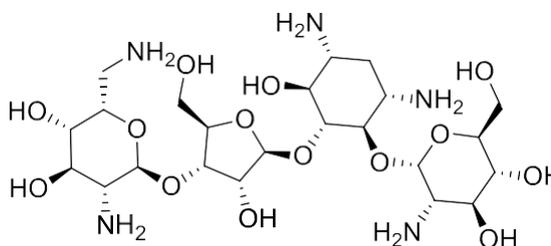
Figura 10 - Estrutura química Miltefosina.



Fonte: *Chemspider*.

Por fim, o fármaco paromomicina (figura 11) pertence à classe dos aminoglicosídeos, cujo potencial leishmanicida foi identificado apenas em 1960. O mecanismo de ação está relacionado à ligação com a subunidade 30S do ribossomo do parasito, que gera a inibição da síntese proteica, ou ainda, pode atuar na inibição do potencial de membrana mitocondrial levando à apoptose e morte celular (KAPIL, S.; SINGH, K; SILAKARI, O., 2018).

Figura 11 - Estrutura química Paramomicina



Fonte: *Chemspider*.

Este fármaco é administrado por via tópica, geralmente para o tratamento de ulcerações provenientes de *L. major* ou demais cepas de *Leishmania spp*. Possui ainda ação sistêmica para LV, cuja dose varia de 25 a 35 mg/kg/dia, em três doses, divididas por 7 dias. As reações adversas comumente relatadas são cólicas, náuseas, vômitos, diarreia, erupção cutânea, dor de cabeça e vertigem (PEARSON et al., 2011; KUHLMANN & FLECKENSTEIN, 2017; EPHROS & ARONSON, 2018).

### 3.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA FRENTE A TERAPIA MEDICAMENTOSA DA LEISHMANIOSE

As falhas na terapêutica da leishmaniose se pautam tanto nas reações adversas dos fármacos disponíveis no mercado, quanto em fatores ligados ao ambiente, ao hospedeiro, à variabilidade genética e ao surgimento de mutações relativas aos parasitos. Os fatores combinados geram o que comumente pode estar descrito como mecanismos adaptativos de sobrevivência ou mecanismos de resistência parasitária, frente ao arsenal terapêutico leishmanicida (BHOR; RAFATI; PAI, 2020; BORSARI et al., 2018).

Os possíveis mecanismos de resistência descritos relacionados aos antimoniais pentavalentes são o efluxo da molécula para o meio extracelular, modulação da desintoxicação de antimônio (Sb), sequestro intracelular do complexo Sb-tiol e resistência múltipla da Proteína 1 (proteína tirosina fosfatase). Além disso, pode-se identificar o mecanismo de resistência gênica mediado por SAT (acetiltransferase) e ABBC2, que estão relacionados à biossíntese e transporte do grupamento tiol nos parasitos do gênero *Leishmania infantum* (DOUANNE et al., 2020; HENDRICKX et al., 2018; KAZEMI-RAD et al., 2013; MUKHERJEE et al., 2013).

A Miltefosina, fármaco classificado como seguro no tratamento de LV, demonstra mecanismos de resistência pouco elucidados, porém relacionados à mutação gênica da proteína LdMT (*Leishmania donovani miltefosine transporter*), localizada na membrana plasmática do parasito, na região da subunidade  $\beta$  não catalítica. Tais alterações geram um aumento do efluxo do medicamento e modificações da membrana plasmática, causando morte celular (PÉREZ-VICTORIA et al., 2006; SRIVASTAVA et al., 2017). Os eventos de resistências foram encontrados nas espécies *L. donovani*, *L. major* e *L. infantum* (COELHO et al., 2012).

Porém, estudos conduzidos por Coelho (2014) avaliaram a susceptibilidade da Metilfosina frente a uma cepa isolada de paciente infectado com tipo *L. amazonensis* resistente a Anfotericina e aos antimoniais pentavalentes. A cepa se apresentou com mutação na região nucleotídeo G852E e outro grupo analisado avaliou-se a mutação no gene da proteína LdMT. Os animais foram infectados com as cepas resistentes e obteve-se, como resultado, a efetividade terapêutica no grupo mutado G852E e de ineficiência farmacológica em relação ao grupo mutado no gene LdMT, fortalecendo teorias sobre o mecanismo de resistência da Miltefosina.

A paramomicina assume a posição de medicamento importante para o tratamento da leishmaniose como descritos nos estudos de Olliaro et al (1998), Sundar et al (2008) e Sousa et al (2019). O mecanismo de resistência pode estar

relacionado a dano no processo de respiração celular, mutação ribossomal e inativação do fármaco pelo parasito a partir do sistema transportador ABC, com possível modulação da enzima acetiltransferase (BHANDARI et al., 2014; CHAWLA et al., 2011; JHINGRAN et al., 2009; VERMA et al., 2017; MATOS et al., 2020;).

Portanto, as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento da leishmaniose são consideradas tóxicas e com perfil de resistência significativo, sendo necessário o estudo de novas alternativas farmacológicas, a fim de promover avanço no tratamento desta doença grave que acomete as populações mais carentes do planeta (KAPIL, S.; SINGH, K; SILAKARI, O., 2018).

### 3.5 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

Com o avanço populacional, o surgimento de mecanismos de resistência dos patógenos às terapias convencionais e a dificuldade na descoberta e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, surge a necessidade de novas metodologias para descoberta de fármacos. Para isto, uma importante ferramenta é a utilização de programas computacionais que realizem experimentos *in silico* entre moléculas ativas e ligantes endógenos, buscando compostos promissores na busca de terapias alternativas (LUNDSTROM, 2017; ARRASATE, 2018).

Existem inúmeros percalços durante os estágios iniciais para o desenvolvimento de um fármaco, o principal ocorrendo nos testes pré-clínicos, sendo representado pelo estudo da farmacocinética – sistema ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Na atualidade, emprega-se técnicas computacionais preditivas, de modo a avaliar os efeitos sobre o metabolismo, a exemplo da via citocromo P450 (CYP), e interação fármaco-receptor. Esses processos podem ser baseados em técnicas de *docking* molecular e modelos farmacocinéticos *in silico* (ZHENG et al., 2013; MILLER et al., 2017).

As principais vantagens de metodologias computacionais são o baixo custo experimental, uma vez que as propriedades moleculares são obtidas através de métodos teóricos, bem como a otimização de tempo e predição de resultados seguros. A partir disso, pode-se estudar as moléculas antes de iniciar o processo de síntese e ainda durante a fase de identificação do composto protótipo (GLEESON et al., 2011; VILLOUTREX et al., 2017).

### 3.5.1 *Docking* molecular

A utilização do método de *docking* molecular (DM) ou ancoragem molecular iniciou em 1982 e possui o uso voltado para triagem *in silico* de moléculas promissoras, a partir da determinação das interações que ocorrem no composto, com a formação do complexo fármaco-receptor. Este método, porém, possui limitações como diferenças bioquímicas, de cargas elétricas, de possível mecanismo de solvatação e de arcabouço de ligação (LUO et al., 2019).

A análise de DM preocupa-se com as posições ideais e orientações que ocorrem entre a molécula teste e o receptor, permitindo assim a correlação entre a afinidade e a forma como ocorre a interação entre eles. Leva-se em consideração quesitos como eficiência e energia de ligação, baseando-se na análise de moléculas predefinidas em uma estrutura biológica de interesse (SLED; CAFLISCH, 2018; ZENG et al., 2013).

Na terapia para doenças negligenciadas, os métodos computacionais são amplamente utilizados como ferramenta preditiva, que analisa vários compostos em relação a determinadas proteínas-alvo, selecionando-os a partir do potencial de interação, seletividade e atividade celular. Porém, existem poucos alvos descritos e validados, devido à não completa elucidação do mecanismo de inúmeros medicamentos ligados a ação biológica leishmanicida (RAJASEKARAN; CHEN, 2015).

Em relação à leishmaniose, apesar dos alvos biológicos não estarem completamente elucidados, existem algumas enzimas-alvo relacionadas a vias enzimáticas e metabólicas essenciais ligadas aos parasitos, como proteases, complexo tripanotiona, proteínas quinases, topoisomerases, metacaspases e enzimas do citocromo P51 (MACHADO et al., 2015).

No estudo conduzido por Romero & López (2018), foram avaliadas moléculas promissoras com estudos *in vitro* para atividade leishmanicida e tripanocida, as 4-ftalazinil-hidrazonas. A fim de avaliar o mecanismo de interação desses compostos, realizou-se o estudo de *docking* molecular frente aos alvos superóxido dismutase (SOD), tripanotiona redutase (TryR), cisteinoprotease (CP) e pteridina redutase 1 (PTR1). As energias de ligação dos complexos composto-macromolécula sugeriram que a possível ação das ftalazinas esteja ligada à inibição da tripanotiona redutase e ainda pôde-se sugerir modificações estruturais das moléculas a fim de determinar um

melhor perfil de inibição desses compostos e, assim, traçar caminhos para o desenvolvimento de novos agentes contra cepas de *Leishmania* e *T. cruzi*.

Os ensaios preditivos de ancoragem molecular chegam ao meio científico como “guias” que atuam de modo a nortear estudos voltados ao desenvolvimento de novos potenciais terapêutico (HAN *et al.*, 2019). O ensaio conduzido por Shokri *et al.* (2018), por exemplo, avaliou o composto luliconazol frente à macromolécula 14 $\alpha$ -desmetilase de esterol (CYP51) obtendo como principais resultados a interação com o grupamento heme e várias interações hidrofóbicas, sugerindo que ocorra a inibição deste alvo bloqueando a biossíntese de esteróis comprovando os resultados obtidos pelos ensaios *in vitro*.

No estudo guiado por Romero & López (2017) avaliou-se as algumas moléculas 4-ftalazinil-hidrazonas testadas previamente para atividade antitripanossomal e antileishmaniana a fim de entender e verificar uma possível rota de atividade biológica. Nos estudos, foram testados os alvos: Pteridina redutase - PTR1 (PDB: PTR1) e Tripanotiona redutase - TyR (PDB: 2JK6), além de estudo mecanístico com a Óxido nítrico sintase - iNOS (1TLL). A correlação positiva foi identificada a partir da expressão da TyR e ainda baixa a interação com o iNOS, fortalecendo o resultado obtido nos estudos realizados previamente, em que visualizava-se o aumento na expressão de óxido nítrico após os tratamentos dos compostos sob o macrófago infectado (ROMERO *et al.*, 2017; ROMERO; LÓPEZ, 2017).

No trabalho conduzido por Serafim *et al.* 2018, analisou-se derivados acrídnicos em estudos de *docking molecular* frente às enzimas piruvato quinase (PDB: 3PP7) e complexo arginase (PDB: 4IU0). Ambas as enzimas atuam sobre o metabolismo e sobrevivência do parasito. O estudo avaliou as moléculas tiofênicas acridínicas e concluiu que as moléculas possuíam melhor perfil de interação com a proteína piruvato quinase demonstrando como melhor perfil de interação as moléculas: ACS01 a ACS06 (D'ANTONIO *et al.*, 2013; LIMA SERAFIM, DE *et al.*, 2018; MORGAN *et al.*, 2011).

Diante do exposto, é imprescindível ressaltar algumas proteínas envolvidas em processos de ancoragem molecular, dentre elas destaca-se: Tripanotiona redutase e 14 $\alpha$ -desmetilase. A tripanotiona caracteriza-se como um ditiol obtido a partir da conjugação de uma molécula de espermidina e duas de glutathiona. Exerce função no metabolismo antioxidante do parasito sendo que exerce um papel de defesa frente a mecanismos agressores (FONSECA, 2017; FIGUEIREDO *et al.*, 2018).

Diante do exposto, neste estudo buscou-se a análise de ancoragem molecular a partir de enzimas ligadas diretamente ao metabolismo, constituição e crescimento do parasito, a fim de testar o potencial dos derivados acrídnicos frente aos seguintes alvos biológicos elencados como fundamentais do gênero *Leishmania*, de modo a determinar a orientação e conformação (pose) do ligante (composto candidato a fármaco) junto ao sítio ativo de uma biomacromolécula alvo, permitindo verificar a afinidade entre eles, bem como observar os resíduos envolvidos e os seus tipos de interação na formação do complexo ligante-receptor (RIBEIRO, 2018).

### 3.5.2 Modelos Farmacocinéticos

Os modelos computacionais preditivos ganham espaço a cada dia devido à facilidade e ao baixo custo na obtenção de resultados. A ferramenta computacional de análise farmacocinética *in silico* surge como adição a métodos de *docking* molecular. Então, consegue-se analisar as características relacionadas a farmacocinética e, portanto, torna-se possível compreender como moléculas promissoras comportam-se nas etapas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e em relação ao potencial tóxico (ALQAHTANI, 2017).

A análise da farmacocinética *in silico* compreende aspectos como a regra de *Lipinski*, que considera parâmetros ideais para absorção oral, sendo eles: Massa molecular < 500 Da LogP < 5, Número de doadores de ligação de hidrogênio < 5, e, por fim, número de aceptores de ligação de hidrogênio < 10. Além disso, busca-se prever aspectos relacionados à dosagem do fármaco, posologia, biodisponibilidade, facilidade de penetração pela barreira hemato-encefálica, volume de distribuição e ainda metabolismo hepático pelo complexo citocromo-P450 e este conjunto de informações permite atribuir a capacidade de determinados compostos serem *druglikness* (CASABONA et al., 2019; COLMENAREJO, 2005; VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

O estudo conduzido por Da Silva-Filho et al. (2019), avaliaram parâmetros farmacocinéticos de derivados acrídnicos quanto à administração por via oral, além de absorção no trato gastrointestinal, passagem pela BHE (Barreira Hematoencefálica). Os resultados mostraram que os compostos acrídnicos obedeceram às regras de *Veber* e *Lipinski*, sendo moléculas com potencial para a

absorção no trato gastrointestinal e que possuem baixa capacidade de ultrapassar a BHE, pressupondo segurança na administração destes fármacos.

Portanto, a análise preditiva assume a posição de direcionamento de candidatos a fármacos, avaliando critérios importantíssimos para veiculação em formas farmacêuticas e possibilitando um avanço na terapêutica (COLMENAREJO, 2005; HAN et al., 2019).

### 3.6 QUÍMICA MEDICINAL APLICADA AO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSES

A população mundial tem crescido exponencialmente, junto aos problemas de saúde, que estão cada vez mais graves. Os medicamentos para o tratamento das leishmanioses exibem uma determinada resistência e ineficácia, e por isso, torna-se urgente a descoberta e projeção de novas moléculas, reestabelecendo a esperança de cura de inúmeras doenças (IMMING, 2015)

A química medicinal surge como uma ciência capaz de descobrir, desenvolver, identificar e interpretar o mecanismo de ação de compostos bioativos e seus metabólitos a nível molecular, com finalidade terapêutica, a fim de curar ou aliviar doenças (SHAH & VERMA, 2018).

Para tanto, a química medicinal no âmbito do avanço da terapêutica das leishmanioses, apresenta-se como a principal aliada no desenvolvimento de candidatos a *leads*, utilizando técnicas como a hibridação molecular, que torna possível combinar moléculas bioativas e também fragmentos de moléculas presentes em compostos bioativos, a fim de produzir compostos dotados de maior afinidade com o ligante endógeno e promover eficácia biológica satisfatória, refletindo em um caráter mais seletivo ao receptor e gerando uma redução massiva dos efeitos adversos (LIMA, 2007; SERAFIM et al., 2018).

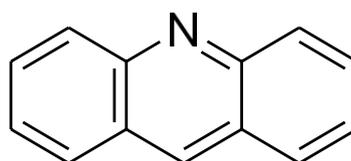
Os derivados acrídnicos são exemplos desses compostos, exibindo uma gama de atividades biológicas, como antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, antimalárica, anti-alzheimer, antitripanossoma e antileishmania (RODRIGUES et al., 2015).

#### 3.6.1 Derivados acrídnicos

Os compostos heterocíclicos surgem como possibilidade de integrar o arsenal terapêutico para o tratamento da leishmaniose, pois apresentam amplamente distribuídos na natureza e possuem desenvolvimento sintético versátil, bem como atividade biológica significativa. Estes compostos são considerados ferramentas de trabalho para os químicos sintéticos na descoberta de novas moléculas ativas (NIGASSA et al., 2018; SHAH & VERMA, 2018).

Como exemplo, a acridina (Figura 12) é caracterizada como composto heterocíclico derivado dos antracenos, constituída por dois anéis condensados unidos com uma piridina na posição central. A acridina recebe outras nomenclaturas, como dibenzo-piridina, 10-azaantraceno e 2,3-dibenzoquinolina (SILVA et al., 2018).

Figura 12 - **Estrutura** química da Acridina



Fonte: Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9215#section=2D-Structure> – acessado 20/02/2018).

Os derivados acrídnicos são utilizados desde o século XIX, primeiramente como agentes anti-infecciosos em ambientes clínicos. Posteriormente, evidenciou-se a capacidade de intercalar pares de bases do DNA, atribuindo-se assim a atividade antitumoral. O primeiro medicamento com esta molécula em sua estrutura foi a amsacrina, com atividade frente a leucemia mieloide aguda e alguns tipos de linfoma. O mecanismo de ação estaria relacionado à interação e inibição dos complexos DNA-topoisomerase I e II, telomerasas e proteínas quinases, desta forma, desencadeando a produção de radicais livres danosos às células tumorais, bem como às células saudáveis (ALMEIDA et al., 2015; GOUVEIA et al., 2018).

### 3.6.2 Derivados Tiofênicos-Acrídnicos

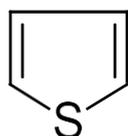
O Tiofeno (Figura 13) é um heteroaromático contendo 5 membros, o enxofre representa o heteroátomo na estrutura, com nome químico de tiociclopentadieno e fórmula química  $C_4H_4S$ . Foi descoberto primariamente como contaminante do benzeno. Possui massa molecular de 84,14 g/mol, densidade d 1,051 g/mL e ponto

de fusão de  $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Considera-se solúvel em solventes orgânicos, como éter, álcool, acetona e insolúvel em água (SHAH & VERMA, 2018).

Devido ao alto potencial reativo, esta espécie química pode sofrer reações como sulfonação, nitração, halogenação e acilação, porém não pode ser diretamente alquilado ou oxidado (CHAUDHARY A. et al., 2012).

Este composto está entre os heterocíclicos mais estudados na atualidade, devido à estabilidade química, facilidade no processamento e purificação e ainda por exibir uma síntese orgânica relativamente simples (AGUIAR et al., 2016; SAEED et al., 2017).

Figura 13 - Tiofeno - Estrutura química



Fonte: SHAH & VERMA (2018).

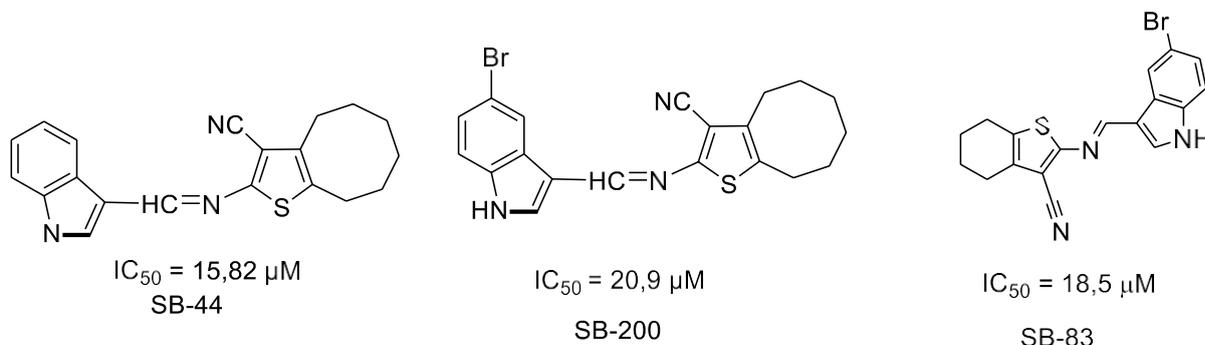
Compostos à base de tiofeno ganham espaço na comunidade científica por apresentarem um amplo espectro de atividades farmacológicas, como hipoglicemiante, antihipertensiva, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, antinociceptiva, anticonvulsivante, antiarrítmica, inibidores de colesterol, antivirais e leishmanicida (MABKHOT, Y. N., 2017; RODRIGUES et al., 2018).

Alguns estudos foram conduzidos para testar os núcleos de maneiras isoladas e acopladas. Rodrigues et al. (2015) realizaram estudos com os derivados 2-aminotiofênicos. Estes foram obtidos a partir de dois processos: o primeiro passo foi a reação entre malononitrila e uma cetona cíclica, cujo meio reacional era etanol e morfolina; após essa etapa, prosseguiu-se com a reação de *Gewald* (primeira etapa), onde o aduto obtido na etapa anterior reagiu com aldeídos aromáticos em meio etanólico (reação de condensação de Knoevenagel). Todos os compostos foram caracterizados com técnicas espectroscópicas como RMN, MS e IV. As espécies químicas produzidas foram avaliadas quanto ao potencial anti-leishmania frente a cepas promastigota e amastigota de *L. amazonensis*, e todos os dez compostos avaliados exibiram inibição no crescimento das cepas testadas.

Os compostos que apresentaram melhor perfil leishmanicida foram os SB-200 ( $\text{IC}_{50} = 20,9\text{ }\mu\text{M}$ ), SB-44 ( $\text{IC}_{50} = 15,82\text{ }\mu\text{M}$ ) e SB-83 ( $\text{IC}_{50} = 18,5\text{ }\mu\text{M}$ ), estes apresentando

um anel indol, como visto na figura 14, que pode estar relacionado ao aumento da atividade farmacológica testada.

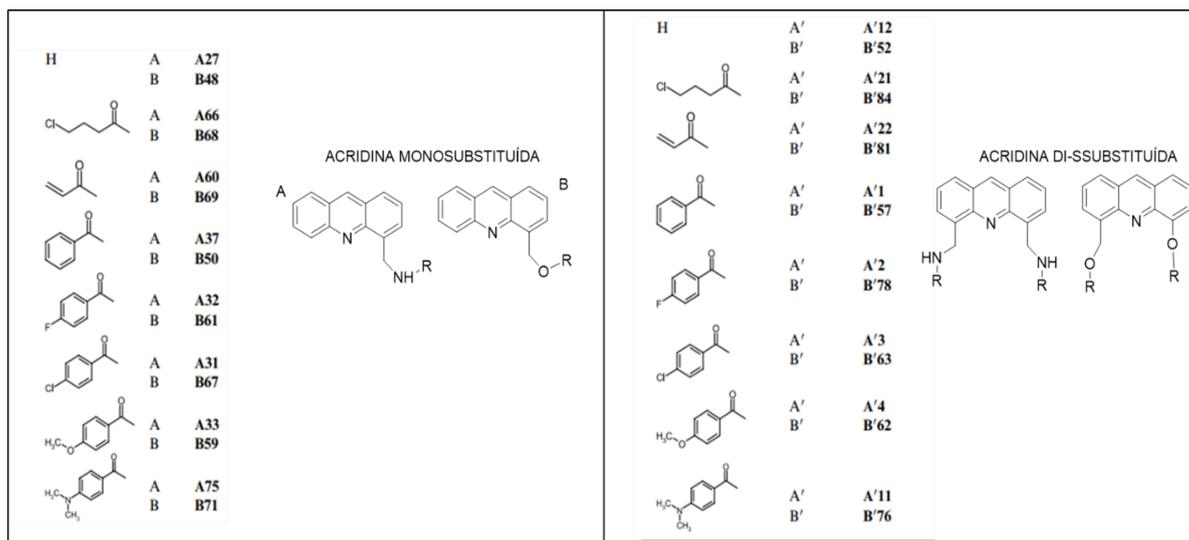
Figura 14 - Derivados 2-aminotiofênicos sintetizados por Rodrigues et al. (2015).



Fonte: Rodrigues et al. (2015)

Por sua vez, o estudo conduzido por Carole et al (2005), envolveu a síntese de 4,5-acridinas mono e di-substituídas (Figura 15), avaliando o potencial leishmanicida frente a cepas de *L. infantum* nas formas promastigota e amastigota. Todos os compostos apresentaram resposta significativa frente às cepas estudadas, porém as acridinas mono-substituídas mostraram-se mais ativas, como podemos ver na figura abaixo:

Figura 15 - Estudos conduzidos por Carole et al. 2005.

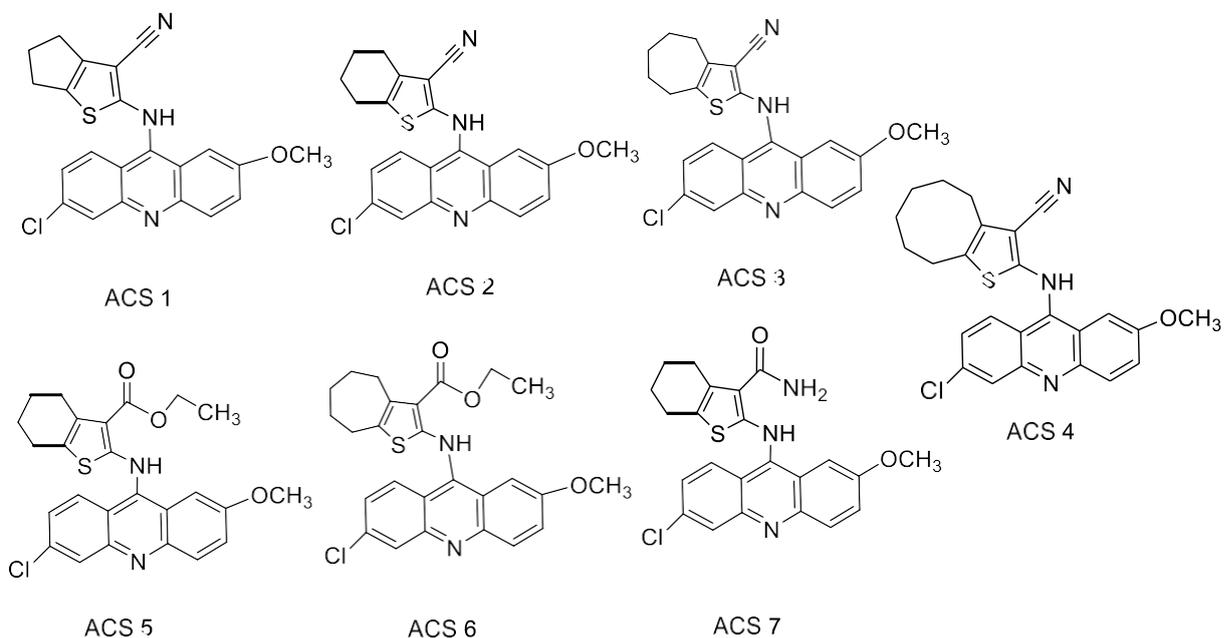


Fonte: D. G. Carole et al. (2005)

Diante do exposto, supõe-se que os compostos tiofênicos acoplados aos compostos com anel acridínico potencializariam as atividades farmacológicas de ambos, uma vez que, os derivados acridínicos também apresentam versatilidade quanto à estrutura química, sendo considerados compostos promissores, uma vez que exibem ações terapêuticas como, antitumoral, antimalárica, anti-inflamatória antileishmania (KUMAR et al., 2013; SERAFIM et al., 2018)

Como pode ser visto no estudo conduzido por Serafim et al. (2018), em que, a partir da obtenção de indícios de atividade leishmanicida nos núcleos tiofênicos e acridínicos, foram realizados estudos com derivados tiofênicos acridínicos (figura 16). Os compostos foram obtidos a partir da reação de *Gewald*, as porções do núcleo tiofênico foram acopladas a acridinas por reação de substituição aromática nucleofílica, sendo as estruturas confirmadas pelas técnicas espectroscópicas usuais.

Figura 16 - Compostos avaliados por Serafim et al. (2018).



Fonte: Serafim et al. (2018).

Os compostos obtidos foram testados frente a cepas de *L. amazonensis* na forma promastigota, obtendo valores de  $IC_{50}$  menores que 10  $\mu$ M, apresentando melhor resposta leishmanicida em relação aos antimoniais pentavalentes, e permanecendo o efeito quando expostos a cepas resistentes aos medicamentos de primeira e segunda escolha para o tratamento da leishmaniose. Segundo este estudo,

sugeriu-se que possivelmente os fármacos ACS01 e ACS02 atuam como intercaladores de DNA.

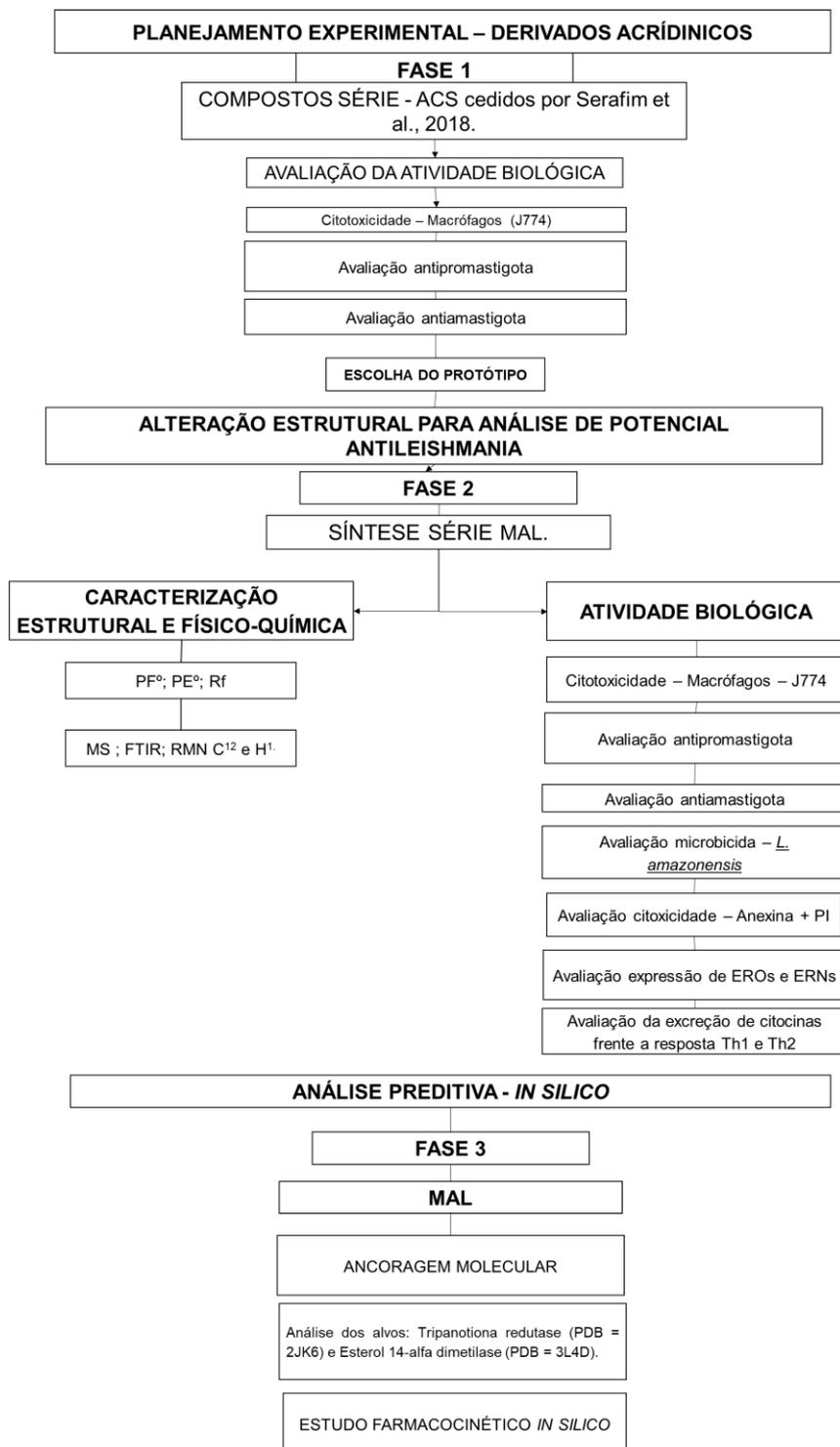
Diante do exposto, os compostos acrídnicos possuem atividade significativa para cepas de *L. amazonensis*, porém não existem estudos realizados com a complexação entre o núcleo tiofênico e o acrídnicos sem substituintes fornecendo um caráter inédito ao presente trabalho

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

O delineamento deste trabalho, demonstrado no **esquema 1**.

Esquema 1 - Delineamento da Pesquisa



Fonte: REIS (2021).

O delineamento da pesquisa descrito anteriormente iniciou-se com a avaliação biológica dos compostos tiofênicos acrídnicos - série ACS, obtidos a partir da quimioteca do Laboratório de Sínteses e Vetorização de Moléculas, LSVM, situado no campus V da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), sintetizada e cedida por Serafim et al. (2018).

O trabalho por Serafim et al. (2018) demonstrou que os núcleos tiofênicos nitrilados possuem atividade biológica significativa frente a cepas promastigotas de *L. amazonensis*. E deste modo, no presente estudo iniciou-se a avaliação da atividade biológica destes compostos a partir do teste de citotoxicidade de macrófagos - J774, e repetiu-se os ensaios em cepas promastigotas de *L. amazonensis*, seguido da análise frente a cepas amastigotas da mesma espécie de patógeno.

A partir dos dados obtidos elencou-se um composto protótipo promissor e realizou-se a síntese da série MAL – MAL, de modo a manter os mesmos núcleos, diferenciando-se apenas pela ausência do grupo metoxila – OCH<sub>3</sub> e do átomo de cloro – Cl na série MAL, por uma estratégia de simplificação molecular e bioisoterismo não-clássico a partir do núcleo acrídínico.

A série MAL foi sintetizada de maneira inédita no Laboratório de Desenvolvimento e Síntese Farmacêutica – LDSF, situado no Campus I – Campina Grande – PB da UEPB em parceria com LSVM. O processo de síntese e ressíntese foi coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura. As moléculas sintetizadas tiveram as características físico-químicas avaliadas e a elucidação estrutural realizada por meio de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, além de espectroscopia de massa.

Quanto à série MAL, foram realizadas as análises biológicas preliminares de citotoxicidade em J774 pelo método de MTT. Em adição, realizou-se as análises biológicas dos compostos descritos acima frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, bem como o estudo de prováveis citocinas liberadas a partir do macrófago infectado com os parasitos responsáveis pela leishmaniose.

Ao identificar-se a possibilidade de um perfil imunomodulador destas espécies químicas, traçou-se a avaliação de macrófago infectado com formas amastigotas de *L. amazonensis* e complementou-se com análise mais sensível de citotoxicidade pela exposição de macrófagos infectados e tratados com as MAL's, avaliando a expressão de Anexina-PI, além de identificar prováveis mecanismos de ação que envolvem

imunomodulação, como as dosagens de EROS, ERNS e interleucinas relativas à resposta Th1 (IL-2; INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e Th2 (IL-4, IL-10).

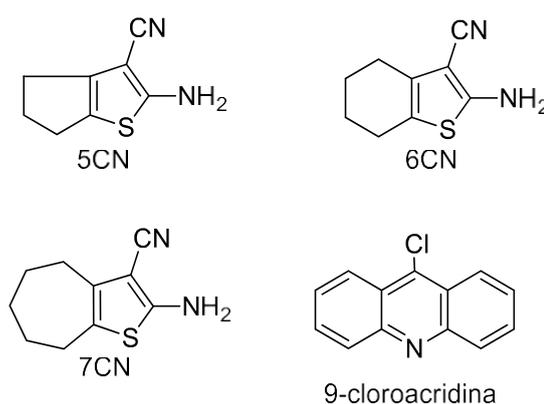
Por fim, realizou-se a análise comparativa entre as séries e ensaios preditivos de mecanismo de ação a partir do método de ancoragem molecular e traçou-se o perfil farmacocinético *in silico* a fim de identificar o potencial *druglikeness* das séries testadas.

#### 4.1 SÍNTESE ORGÂNICA – DERIVADOS ACRÍDICOS

Para a síntese orgânica da série MAL, os compostos intermediários foram obtidos a partir da quimioteca do Laboratório Síntese e Vetorização de Moléculas, os quais encontravam-se devidamente caracterizados pelas técnicas espectroscópicas usuais (RMN, EM e IV) conforme consta nos trabalhos de MENDONÇA-JUNIOR et al. (2011) e SOUZA et al. (2012) e, portanto, disponíveis para os processos sintéticos do presente estudo.

Os intermediários estão representados na figura 17, são eles: Derivados 2-amino tiofênicos (5 CN, 6 CN e 7 CN) e a 9-cloroacridina.

Figura 17 - Compostos intermediários para a síntese da série MAL



Fonte: REIS (2021).

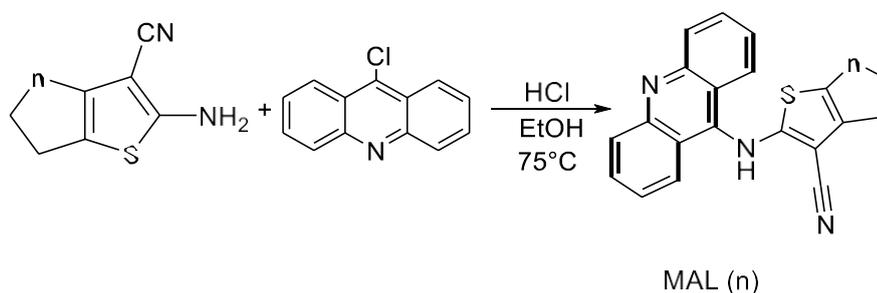
##### 4.1.1 Síntese da série MAL

Em um balão de 50 mL de fundo redondo, foram adicionados 0,200 g (0,94 mmol) do núcleo 9-cloro-acridina com 0,88 mmol do núcleo 2-amino-tiofênico para o núcleo 7CN, em adição 0,94 mmol para o núcleo 6CN e por fim, 0,94 mmol e 5CN com adição de 0,46 mmol, em equivalência molar 1:1, os quais foram diluídos em 10 mL de etanol seguido da adição de três gotas do catalisador HCl. A solução obtida foi exposta a agitação magnética e a uma temperatura de 75 °C (**Esquema 2**).

A reação foi acompanhada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), sendo concluída após três horas. A solução obtida foi tratada com água gelada, de modo a favorecer a precipitação, com posterior filtração, e os produtos obtidos foram deixados em uma capela de exaustão por alguns dias para secagem. Repetiu-se esse protocolo para todas as MALs (01, 02 e 03) produzidas.

As estruturas foram elucidadas a partir de técnicas espectroscópicas, utilizando majoritariamente Espectrometria de Massas (EM – Espectrômetro *Íon-Trap*, Bruker<sup>®</sup>, modo positivo), espectroscopia de infravermelho (IV – FTIR, IRPrestige-21, da Shimadzu<sup>®</sup>, com dados tratados no programa Origin 8.0<sup>®</sup>), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup>H) e de carbono (RMN de <sup>13</sup>C – APT) Todos os ensaios de ressonância magnética foram realizados em equipamento Bruker Avance, 400 MHz de potência, situado na Central Analítica da Universidade Federal da Paraíba. Os espectros de RMN foram tratados e interpretados no programa MestReNova<sup>®</sup> 11.0.3.

Esquema 2 - Compostos Tiofênicos-Acrídnicos



n = 1 - 7CN (MAL1)  
 n = 2 - 6CN (MAL2)  
 n = 3 - 5CN (MAL3)

Fonte: REIS (2021).

Para todos os compostos obtidos realizou-se os ensaios de caracterização físico-química, representada por: aparência, solubilidade, cálculo do fator de retenção (Rf), faixa de fusão e rendimento.

O rendimento dos compostos foi calculado pesando a massa do produto obtido em gramas e em seguida obtendo-se o número de mols referente à massa através da fórmula  $n^{\circ} = m/PM$ . Desta forma, calculou-se a porcentagem do rendimento de acordo com a fórmula 1:

Fórmula 1 - Cálculo de Rendimento

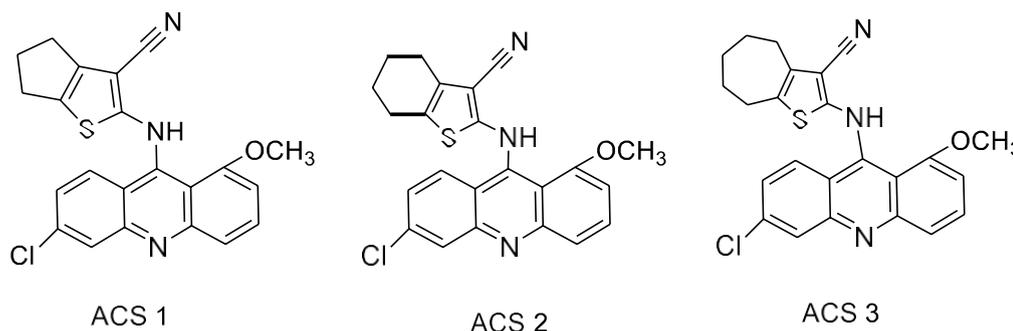
$$\text{Rendimento} = \frac{\text{número de mols do produto obtido}}{\text{número de mols do produto de partida}} \times 100$$

Fonte: REIS, 2021.

As pesagens dos reagentes e dos compostos foram realizadas em balança analítica com cinco casas decimais Shimadzu<sup>®</sup>, modelo AUW220D. As faixas de fusão dos compostos foram obtidas com o aparelho Quimis<sup>®</sup> Modelo Q-340M. As CCD's foram realizadas em placas FLUKA Analytical - sílica gel de 0,2 mm de espessura. As revelações foram realizadas por luz ultravioleta (254 ou 365nm). A aparência dos compostos (cor e textura) foram avaliadas por observação visual dos produtos obtidos e os cálculos relativos ao LogP foram estimados pelo programa computacional ChemDraw Ultra 12.0<sup>®</sup>.

Os derivados tiofênico-acrídnicos contendo a acridina substituída em sua estrutura foram sintetizados e publicados por Serafim et al. (2018), e se encontram dispostos na figura 18. Estes compostos fazem parte da quimioteca do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas – LSVM da Universidade Estadual da Paraíba, tendo sido re-sintetizados e caracterizados sob a coordenação do Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura.

Figura 18 - Série ACS - Serafim et al. (2018)



Fonte: Serafim et al., 2018.

## 4.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA – DERIVADOS ACRÍDICOS

### 4.2.1 Tipo de estudo

Tratou-se de um estudo experimental, *in vitro*, de fase não-clínica para determinar o efeito microbicida de derivados acrídnicos em cultivos de protozoários do gênero *Leishmania* e macrófagos. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília sob coordenação da Profa. Dra. Selma Kuckelhaus e da Profa. Dra. Tatiana Borges.

### 4.2.2 Células

As células utilizadas para os experimentos foram linhagens de macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67), caracterizados como macrófagos murinos obtidos de tumor reticular de ascite de camundongos *Mus musculus*, fêmeas adultas, BALB/cN. As células utilizadas no experimento foram mantidas criopreservadas no Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Para tanto, o processo de descriopreservação iniciou-se com a transferência do conteúdo criopreservado a um tubo de Falcon contendo 5 mL de meio de cultura DMEM (Gibco®), suplementando-o com 10% de soro fetal bovino inativado, além de 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de sulfato de gentamicina. O tubo foi centrifugado a 200 rpm durante 10 minutos. Após essa etapa, desprezou-se o sobrenadante, ressuspensando-se as células em meio de cultura, transferindo-as para uma garrafa de cultura que foi mantida em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.2.3 Microrganismos

Para o estudo inicial dos derivados acrídnicos, foram utilizados cultivos amastigotas de *Leishmania amazonensis* MHOM/BR/PH8. As cepas de *L.*

*amazonensis* foram mantidas sob criopreservação no laboratório de Leishmaniose do Instituto de Medicina Tropical, da Universidade de Brasília. Para a descriopreservação, uma alíquota foi transferida para meio *NNN (Novy-MacNeal-Nicolle)* e mantida a 26 °C até que os parasitos alcançassem a fase Log de crescimento. Em seguida, a suspensão foi transferida para o meio de cultura *Schneider (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA)*, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 0,2% de sulfato de gentamicina, a 26 °C, de modo que os parasitas voltassem a fase Log de crescimento. Após essa etapa, as formas promastigotas puderam ser vertidas para teste nesta etapa.

Para as formas amastigotas, ocorreu a transformação a partir das cepas promastigotas. As cepas foram transferidas para estufa a 37 °C, realizando-se a curva de crescimento e formação das cepas amastigotas axênicas. Todo o processo foi acompanhado por microscopia eletrônica Microscópio Nikon Eclipse Ts2.

#### 4.3 Estudos preliminares – série ACS e MAL

##### **4.3.1 Determinação do efeito citotóxico dos derivados acrídnicos em cultivos de macrófagos J774 - Método MTT**

A fim de avaliar o efeito citotóxico em cultivos de macrófagos J774, os ensaios ocorreram em placa de 96 poços. Primeiramente, realizou-se as diluições dos compostos a partir de uma solução estoque de 1 mg/mL (cujo solvente foi o DMSO) de cada composto analisado para as seguintes concentrações a serem diluídas a partir da solução estoque, porém com o meio de cultura: 2, 4, 8, 16, 32 µg/mL; paralelamente, distribuiu-se  $1,0 \times 10^5$  macrófagos J774 por poço. Após o plaqueio com as moléculas testadas, as placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, com temperatura de 37 °C por um período de 24 horas.

Em seguida, adicionou-se 10 µL de MTT por poço, incubando novamente por um período de quatro horas. Por fim, após o tempo de incubação, adicionou-se 50 µL de DMSO em cada poço, aguardando dez minutos e efetuando a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro de placa SpectraMAX GeminiXS® (*Molecular Devices LLC*), no comprimento de onda de 550 nm.

### 4.3.2 Determinação do efeito inibitório dos derivados acrídnicos frente a cepas - método de MTT

#### 4.3.2.1 Cepas promastigotas de *L. amazonensis*

Para analisar o efeito dos derivados tiofênicos acrídnicos frente as cepas promastigotas de *L. amazonensis*, em uma placa de 96 poços adicionou-se  $1,0 \times 10^6$  promastigotas por poço. Realizou-se a produção de uma solução estoque contendo 1mg/mL de cada compostos a ser testado e a partir das soluções das amostras teste, previamente preparadas nas concentrações de: 32, 16, 8, 4 e 2  $\mu\text{g/mL}$ , procedeu-se com o plaqueio incubando-se as amostras a 26 °C durante 72 horas. Após este período, adicionou-se o reagente MTT em concentração de 5 mg/mL, incubando-se por 4 horas em estufa e adicionando-se, posteriormente, SDS a 10%. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro SpectraMAX GeminiXS (Molecular Devices LLC) em comprimento de onda de 550 nm.

#### 4.3.2.2 Cepas amastigotas de *L. amazonensis*

A fim de avaliar o efeito leishmanicida em formas amastigotas de *L. amazonensis* os ensaios foram realizados em placa de 96 poços, de modo que, primeiramente, realizou-se as diluições dos compostos analisados optando-se por utilizar as seguintes concentrações: 2, 4, 8, 16, 32  $\mu\text{g/mL}$ ; em paralelo, distribuiu-se em cada poço  $2,0 \times 10^5$  amastigotas axênicas. Realizou-se a incubação das cepas juntamente com as moléculas teste por 24 horas à temperatura de 37 °C. Em seguida, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de MTT por poço, incubando-se novamente por um período de quatro horas. Por fim, após o tempo de incubação, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de DMSO em cada poço, aguardando dez minutos e efetuando a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro de placa SpectraMAX GeminiXS (Molecular Devices LLC) no comprimento de onda de 550 nm.

### 4.4 Breve relato do cenário mundial pandêmico e desenvolvimento da pesquisa no Brasil

Para conhecimento dos leitores, é necessária uma breve explicação sobre o desenvolvimento dos estudos científicos no Brasil e que levaram aos resultados obtidos nesta tese.

Devido a pandemia relativa à progressão viral do patógeno Sars-CoV-2 e os riscos iminentes diante da infecção ainda desconhecida e sem tratamento aparente optou-se pelo fechamento das unidades de ensino, bem como dos laboratórios de pesquisa. Os laboratórios de cultivo e centros de pesquisa estão em processo de abertura e infelizmente não disponíveis para usuários externos, além do programa de vacinação estar caminhando vagarosamente. Deste modo, estes fatos foram determinantes para uma readequação no plano de pesquisa.

Os estudos a respeito do efeito microbicida em macrófagos infectados com *L. amazonensis* para as moléculas ACS1, ACS2, ACS3 e MAL1, além da quantificação das ERNS, EROS e citocinas liberadas nas respostas Th1 e Th2 diante de macrófagos infectados não foi possível ser realizado, devido à escassez de espécies celulares uma vez que os laboratórios interromperam os cultivos e as células dos macrófagos possuem um tempo elevado de cultura bem como o cultivo dos parasitos da *Leishmania*. Portanto, em comum acordo com o orientador Dr. Ricardo Olímpio de Moura priorizamos a análise dos compostos da série MAL, uma vez que, apresentavam com melhores perfis citotóxicos e possuíam indícios de atividade imunomoduladora frente as células J774.

#### 4.5 Análise biológica – série MAL

A partir da identificação do composto promissor ACS3, desenvolveu-se modificações estruturais que resultaram na série MAL, e dessa forma, repetiu-se os testes preliminares de citotoxicidade J774, atividade antipromastigotas e anti-mastigota de acordo com as metodologias supracitadas e, a partir do aumento da expressão de macrófagos no teste de citotoxicidade em MTT, optou-se por realizar testes que avaliariam a capacidade imunomoduladora da série. Deste modo, seguiu-se com o teste de citotoxicidade por Anexina-PI e a detecção da expressão de EROS, ERNS e IL relativas às respostas Th1 e Th2.

#### **4.5.1** Determinação do efeito microbicida dos derivados acrídnicos em cultivos de macrófagos J774 infectados com *L. amazonensis*

A partir das etapas anteriores, foram selecionados os compostos mais promissores para a continuidade dos trabalhos. Para tanto, limitou-se às concentrações de 1, 16 e 32 µg/mL. Os compostos selecionados foram destinados ao ensaio do efeito microbicida frente a macrófagos J774 infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*.

As células J774 foram quantificadas e distribuídas ( $1,5 \times 10^5$  células/poço) em meio DEMEM, as placas utilizadas foram as de micro cultivo contendo 24 poços cada placa às quais adicionou-se lamínulas previamente lavadas em cada poço, a fim de promover a aderência das células, sendo posteriormente incubadas por duas horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, com temperatura de 37°C. Após o processo de aderência das células, os poços foram lavados com STF pH 7,2; 37°C. Logo em seguida, adicionou-se as amastigotas de *L. amazonensis* ( $1,5 \times 10^6$ / escavação) novamente incubando-as por doze horas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, em meio DMEM, acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), para a infecção dos macrófagos.

Após o tempo pré-determinado, realizou-se a lavagem dos poços, lavando três vezes cada poço com STF a 37°C estéril, a fim de remover as leishmanias não fagocitadas. Após esse processo, incubou-se as moléculas selecionadas nas concentrações supracitadas durante um período de tratamento de duas horas. Por fim, retirou-se o meio excedente, as células foram expostas a secagem e fixadas em metanol, sendo posteriormente coradas com solução Giemsa a 10% e avaliadas por microscopia ótica (1000x).

O efeito microbicida foi avaliado pela determinação de infecção em 200 macrófagos, sendo expresso como produto da média das leishmanias fagocitadas pelo percentual de macrófagos infectados. Para a determinação do percentual estimado de macrófagos aderidos sobre as lamínulas, quantificou-se as células presentes em 10% das lamínulas com auxílio da microscopia ótica (400 x).

#### **4.5.2** Citotoxicidade - Método de Anexina-PI

Os compostos que apresentaram melhor perfil citotóxico e com menor IC<sub>50</sub>, **MALs 1, 2 e 3**, foram destinados aos ensaios de citotoxicidade em macrófagos pelo método de Anexina-PI por citometria de fluxo (citômetro BD LSR Fortessa™<sup>®</sup>).

As análises ocorreram em placas de 96 poços em que foram distribuídos 4,0 x 10<sup>4</sup> macrófagos por poço e em seguida adicionou-se as moléculas promissoras, na concentração de 32 µg/mL (máxima concentração utilizada nos experimentos), incubando-as em meio DMEM<sup>®</sup> por duas horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após esta etapa, acrescentou-se 2 µL de anexina + 2 µL de PI em cada poço, incubando-se as placas novamente por dez minutos. Por fim, centrifugou-se as placas por dez minutos, retirando-se 100 µL do sobrenadante e adicionando-se 200 µL de salina. Em seguida, realizou-se as leituras em citômetro de fluxo. As análises foram realizadas em sextuplicata.

#### **4.5.3 Análise de espécies reativas e citocinas em macrófagos J774 infectados com cepas amastigotas de *L. amazonensis***

##### *4.5.3.1 Infecção dos macrófagos J774*

Os macrófagos J774 foram infectados de acordo com a metodologia descrita por SUAREZ et al. 2020. Os macrófagos previamente cultivados de acordo com metodologia descrita no tópico 4.4.2, foram dispostos em placas 96 poços em uma razão de 1 x 10<sup>6</sup> células / mL em meio DEMEM suplementado com 10% de SFB. Em seguida, foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* MHOM/BR/PH8 em uma proporção de 10:1, por um período de 24 horas, sob incubação em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 35 °C. Após a incubação, removeu-se os parasitos não internalizados por meio da lavagem das células com solução salina de NaCl a 0,9% (Baxter International, Deerfield, IL, EUA). As células foram incubadas novamente por 24 horas e, em seguida, tratadas com os compostos tiofênicos acrídnicos. Em seguida, as células foram incubadas com 1,0 x 10<sup>6</sup> leishmanias na forma promastigota, sendo acompanhado o processo de infecção durante as 24 horas de exposição e comprovado por via de microfotografias com microscópio Nikon Eclipse Ts2, seguido pelo tratamento com as moléculas em estudo.

#### 4.5.3.2 *Espécies reativas de nitrogênio (ERNs)*

Para a avaliação da influência dos compostos tiofênicos acrídnicos sobre a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) em células de macrófago infectado com cepas amastigotas de *L. amazonensis*, foi realizada a quantificação de ERNs, utilizando-se a sonda 4-amino-metilamino-2-7-difluoresceína diacetato (DAF-FM diacetato), que é permeável à membrana celular e não fluorescente. Este composto, na presença de ERNs, produz a 4-amino-metilamino-2-7-difluoresceína (DAF-FM), que apresenta fluorescência e permanece no interior celular.

Neste experimento, as células foram primeiro lavadas com meio DMEM estéril, suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), pH 7,2, sem o acréscimo de soro fetal bovino, quantificadas em hematocítômetro e incubadas em placa estéril de 96 poços de fundo chato, na concentração de  $2,0 \times 10^4$  células por poço, por 2 horas, em câmara úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> para adesão das células ao fundo da placa. Passado este tempo, o sobrenadante foi desprezado para remoção das células não aderidas.

Em seguida, as células foram incubadas com  $1,0 \times 10^6$  leishmanias na forma promastigota, sendo acompanhado o processo de infecção durante as 24 horas de exposição e comprovado por via de microfotografias com microscópio Nikon Eclipse Ts2, seguido pelo tratamento com as moléculas em estudo.

Após o período de tratamento de 24 horas, as placas foram centrifugadas em centrífuga de placas Shimadzu CR22N, o sobrenadante das células foi desprezado e estas foram incubadas por 1 hora com a sonda DAF-FM diacetato diluída em STF pH 7,2, em câmara úmida a 37°C com 5 % de CO<sub>2</sub>, ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com STF, pH 7,2, à temperatura ambiente e re-suspendidas com 200 µL de STF sob as mesmas condições.

A intensidade de fluorescência do marcador em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando-se o *software* o programa DIVA versão 7 (BD Bioscience) e a intensidade média de fluorescência (MFI) foi obtida após o tratamento dos dados no programa FlowJo™ versão 10.6.1. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram calculados através da diferença de MFI em cada grupo.

#### 4.5.3.3 *Espécies reativas de oxigênio (EROs)*

Para a análise relativa à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre os macrófagos infectados com cepas amastigotas de *L. amazonensis*, foi realizada a quantificação por meio da sonda 2-7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DFC-DA), que é permeável à membrana celular e não fluorescente. Este composto, na presença de EROS, produz a 2-7-diclorofluoresceína (DCF), que apresenta fluorescência e permanece no interior celular.

Neste experimento, as células foram primeiro lavadas com meio DMEM estéril, suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), pH 7,2, sem o acréscimo de soro fetal bovino. As células foram quantificadas em hematocitômetro e incubadas em placa estéril de 96 poços de fundo chato, na concentração de  $2,5 \times 10^4$  células por poço, por 2 horas, em câmara úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, para adesão das células ao fundo da placa. Passado este tempo, o sobrenadante foi desprezado para remoção das células não aderidas.

Após o período de tratamento de 24 horas, as placas foram centrifugadas em centrífuga de placas Shimadzu CR22N, o sobrenadante das células foi desprezado e estas foram incubadas por 30 minutos com a sonda DCF-DA diluída em STF pH 7,2, em câmara úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com STF, pH 7,2, à temperatura ambiente e re-suspendidas com 200 µL de STF sob as mesmas condições.

A intensidade de fluorescência do marcador em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando-se o programa DIVA versão 7 (BD Bioscience) e a intensidade média de fluorescência (MFI) foi obtida após o tratamento dos dados no programa FlowJoTM versão 10.6.1. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram calculados através da diferença de MFI em cada grupo.

#### 4.5.3.4 *Citocinas*

A partir dos resultados obtidos nos testes biológicos anteriores, foram avaliadas as citocinas presentes em macrófagos J774 infectados com cepas amastigotas de *L. amazonensis*. Realizou-se a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, INF-γ e TNF-α no sobrenadante dos cultivos celulares por meio do ensaio por *beads* para citometria (CBA), conforme instruções do fabricante (*BD Bioscience*).

O ensaio foi composto por *beads* de captura e pelo reagente de detecção. Os *beads* possuem tamanho e fluorescência conhecidos, e cada um é conjugado a anticorpos específicos para a captura de citocinas, o que possibilita a detecção e análise. O reagente de detecção é composto por uma mistura de anticorpos conjugados a ficoeritrina (PE), que promove a sinalização por fluorescência de acordo com a quantidade de analito na amostra. Quando os *beads* de captura e o reagente de detecção são incubados com uma amostra, forma-se um complexo com *beads* de captura-analito-reagente de detecção e este complexo é quantificado por citometria de fluxo.

Neste experimento, as células foram primeiro lavadas com meio DMEM estéril, suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), pH 7,2 sem o acréscimo de soro fetal bovino, quantificadas em hematocítmetro e incubadas em placa estéril de 96 poços de fundo chato, na concentração de  $2,5 \times 10^4$  células por poço, por 2 horas em câmara úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, para adesão das células ao fundo da placa. Passado este tempo, o sobrenadante foi desprezado para remoção das células não aderidas.

A próxima etapa seguiu com tratamento com as moléculas em estudo. Após o período de tratamento de 24 horas, foram transferidos 50 µL do sobrenadante de cada poço para um tubo cônico, seguido do acréscimo de 50 µL da mistura de *beads* de captura e 50 µL do reagente de detecção. As amostras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após o tempo de incubação, foram acrescentados 500 µL do tampão de lavagem, em cada tubo, seguido de centrifugação a 200 G por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e acrescentado 300 µL do tampão de lavagem. Foi acrescentada ao experimento uma curva de calibração contendo as seguintes concentrações de cada citocina: 0 pg/mL, 20 pg/mL, 40 pg/mL, 80 pg/mL, 156 pg/mL, 312,5 pg/mL, 625 pg/mL, 1250 pg/mL, 2500 pg/mL e 5000 pg/mL.

A intensidade de fluorescência em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando-se o programa DIVA versão 7 (*BD Bioscience*) e os dados de fluorescência foram tratados utilizando-se o programa FCAP *array* versão 3 (*BD Bioscience*). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como pg/mL.

#### 4.5.3.5 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa *Graphpad Prism* para *Windows* versão 8 (*GraphPad Software* – San Diego, USA). Para avaliar a normalidade da amostra foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. De acordo com a normalidade ou não das amostras, foram utilizados teste paramétrico ou não paramétrico, respectivamente. Quando avaliados quatro grupos, o teste utilizado foi ANOVA seguido de teste de Tukey para comparação múltipla entre os grupos, para amostras com distribuição normal. O teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de comparação múltipla de Dunn foi utilizado quando a distribuição das amostras não era normal. Para comparação entre dois grupos, foi utilizado o teste *t* de student quando a distribuição das amostras foi normal, ou o teste de Mann-Whitney quando a distribuição não foi normal.

As diferenças observadas foram consideradas estatisticamente significativas quando a rejeitar a hipótese nula quando se apresenta como verdadeira, de modo que seja que 5% ( $p < 0,05$ ). Nas figuras, os dados foram representados em gráfico de barras com barra de erro e asteriscos indicando significância.

## 4.6 ENSAIO *IN SILICO*

### 4.6.1 Determinação do perfil ADMET

Para análise de características farmacocinéticas *in silico*, optou-se pela utilização da ferramenta online SwissADME e pkCSM disponíveis gratuitamente nos seguintes endereços eletrônicos: <http://www.swissadme.ch/index.php> e o <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/>. Com intuito de avaliar critérios envolvidos nos principais processos farmacocinéticos no que tange absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Os aspectos relacionados aos eventos de toxicidade *in silico* foram avaliados a partir da plataforma online Protox-prediction II ([https://tox-new.charite.de/protox\\_II/index.php?site=compound\\_input](https://tox-new.charite.de/protox_II/index.php?site=compound_input)) (COLMENAREJO, 2005; GÜLLER, 2021; HAN *et al.*, 2019).

#### 4.6.2 Ancoragem molecular

Uma triagem virtual nada mais é do que docagens sequenciadas com vários ligantes em um único alvo, permitindo selecionar as moléculas que apresentam melhores interações com o sítio ativo, baseando-se no ranqueamento dos escores de energia de interação na formação do complexo (RIBEIRO, 2014).

A obtenção e preparação dos alvos biológicos para análise da interação molécula- alvo, a macromolécula foi extraída do banco de dados PDB e analisada no programa PyMOL Win, que foi realizado o tratamento em relação ao excesso de alguns ligantes, como por exemplo, água e pequenas moléculas (ex: Mg, Cl, Fe). A macromolécula foi direcionada aos estudos de ancoragem molecular e ainda a produção do ensaio de *redocking*. Os alvos moleculares foram Tripanotiona redutase – TR e 14- $\alpha$ -Esterol-Desmetilase - 3L4D.

##### 4.6.1.1 Preparação dos ligantes

Os ligantes foram desenhados no ChemDraw Ultra 12.0 e, em seguida, submetidos no programa Chem3D Pro 12.0 para análise conformacional através do cálculo de mecânica molecular mínima e dinâmica (MM2) obtendo a conformação com menor energia. Após o cálculo do MM2, os compostos foram salvos no formato MOL2.

##### 4.6.1.2 Estudos de ancoragem molecular para validação (*redocking*)

Visto que as estruturas cristalográficas dos alvos biológicos estão co-cristalizadas com os ligantes, foi realizada a redocagem como método de validação. Este método baseia-se em submeter o mesmo ligante co-cristalizado com o biorreceptor em questão aos estudos de ancoragem molecular, de modo a observar se as interações com os resíduos de aminoácidos chave e a orientação espacial do ligante, ou seja, que o RMSD (root-mean-square deviation) entre o ligante cristalográfico e a proteína ou enzima seja o menor possível, de modo a comprovar a capacidade preditiva do modelo *in silico* (MOURA, 2019).

Para realizar a validação do método além do programa AutoDock Tools 1.5.6 foi utilizado o Discovery Studio 2.0 no qual é possível observar a sobreposição entre o ligante cristalografado e a molécula em estudo.

#### 4.6.1.3 *Obtenção das interações 2D entre os alvos e os ligantes*

As ilustrações 2D foram geradas através do programa Discovery Studio 2.0, no qual foi possível definir as interações ocorridas entre o alvo e o ligante, assim como as distâncias das mesmas. E dessa forma, foi possível analisar os tipos de interações envolvidas, os resíduos que estão interagindo com a molécula e as ligações mais estáveis através da análise da distância de ligação molécula- alvo.

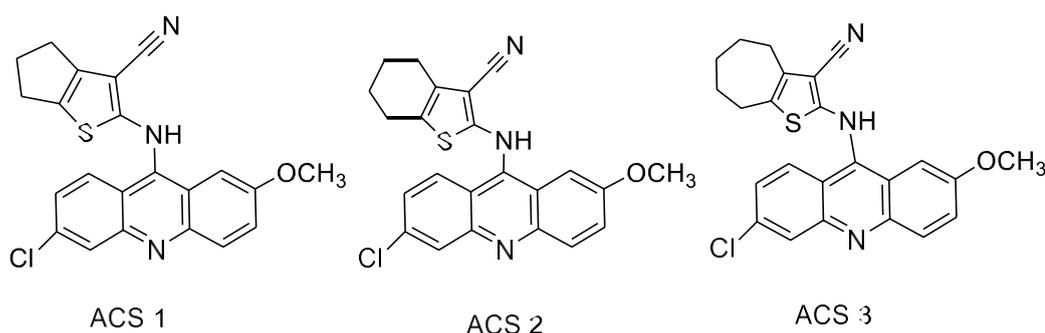
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por intuito a obtenção de compostos derivados tiofênicos acrídnicos a partir de metodologia sintética simples, econômica e com produção mínima de resíduos. Deste modo, objetivou-se a obtenção de compostos com boa disponibilidade, especificidade com o ligante, baixa toxicidade e ação terapêutica para a leishmaniose.

As moléculas analisadas no presente estudo, são classificadas como tiofênicos acrídnicos e as séries elencadas foram: ACS e MAL.

A série ACS (Figura 19) foi previamente publicada no trabalho conduzido por Serafim e colaboradores (2018). Os compostos foram obtidos a partir de uma reação de substituição nucleofílica entre o núcleo acrídico substituído com o núcleo tiofênico, estando este acoplado com os grupamentos: 5CN (ACS1), 6CN (ACS2) e 7CN (ACS3). Os ativos químicos foram resintetizados e caracterizados durante a condução desta pesquisa. Apesar de serem compostos previamente publicados, neste estudo foram apresentados resultados biológicos inéditos, a exemplo da citotoxicidade em macrófagos J774 e da atividade antileishmania em cepas amastigotas em *L. amazonensis*.

Figura 19 - Série ACS - Fórmula estrutural



Fonte: Serafim et al. (2018).

De modo a identificar a influência dos substituintes no núcleo acrídico, realizou-se a síntese inédita da série MAL (Figura 20) com a ausência do átomo de cloro e do grupamento metoxila no núcleo acrídico e, seguiu-se com o acoplamento com os núcleos tiofênicos: 7CN (MAL 1); 6 CN (MAL 2) e 5CN (MAL 3), realizando-se



Sendo assim, a síntese dos derivados Tiofênicos-acridínicos ocorreu de acordo com uma via paralela e convergente, a partir da obtenção do núcleo acridínico (9-cloroacridina) e intermediários 2-amino-tiofênicos, que foram cedidos pela quimioteca do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, situado na Universidade Estadual da Paraíba sob coordenação do prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura. Os intermediários foram acoplados a partir de uma reação de substituição nucleofílica gerando os derivados tiofênicos acridínicos.

Os compostos finais da série **MAL** foram devidamente caracterizados por métodos físico-químicos e as estruturas foram elucidadas por técnicas espectroscópicas e espectrométricas (IV, EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ).

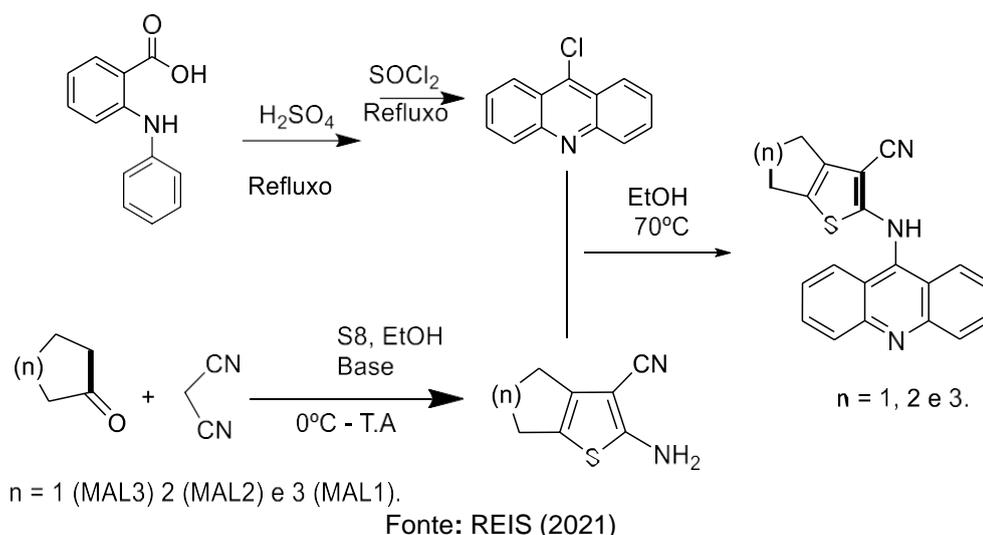
Os derivados tiofênicos acridínicos contendo acridina substituída foram resintetizados no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas a partir de metodologias publicadas nos trabalhos de Serafim et al. (2018).

### 5.1.1 Síntese dos compostos finais: série MAL

A série MAL foi iniciada com a obtenção da 9-cloroacridina e dos núcleos da série 2-aminotiofenos disponíveis na quimioteca do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas – LSVM, situado no campus V da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) na cidade de João Pessoa.

Sendo assim, os derivados tiofênicos acridínicos foram obtidos de acordo com o esquema 3, por meio de uma de uma reação de substituição nucleofílica obtendo uma série de três compostos, denominados **MAL 1**, **MAL 2** e **MAL 3**, onde o n corresponde ao número de carbonos adicionados ao anel cicloalquil tiofênico

## Esquema 3. Rota Sintética dos Derivados Tiofênicos Acrínicos – Série MAL



A fim de comprovar a identidade química dos compostos obtidos iniciou-se os procedimentos de caracterização físico-química e elucidação estrutural. A tabela 1 fornece dados referentes a caracterização físico-química e pode-se observar que as moléculas obtidas estão em conformidade com a regra de *Lipinski*, exceto o logP, de acordo com os dados obtidos a partir da análise farmacocinética *in silico*, o que demonstra um adequado perfil de biodisponibilidade podendo ser considerado protótipos interessantes para o desenvolvimento de fármacos (PICCIRILLO & AMARAL, 2018).

Tabela 1 - Caracterização físico-química dos derivados tiofênicos acrínicos

NOME DO COMPOSTO	MAL 1	MAL2	MAL3
PM (g/mol)	369,49	355,11	341,43
LOGP	6,78	6,33	5,89
FÓRMULA MOLECULAR	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> S	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> S	C <sub>21</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> S
APARÊNCIA	amorfo	amorfo	amorfo
COR	Marrom claro	Marrom avermelhado	Marrom escuro
RF <sup>A</sup>	0,56	0,54	0,54
PF (°C)	202-205	278-281	207-208
RENDIMENTO (%)	91,95	87,89	81,54

Legenda: PM= Peso molecular Rf: a= sistema 7:3 Hexano/Acetato Fonte: REIS (2021).

A análise realizada por espectrometria de massas objetiva a detecção de compostos em baixas concentrações, considerada como uma técnica sensível, devendo apresentar baixa interferência de possíveis contaminantes, estabelece uma relação entre massa ( $m$ ) e carga ( $z$ ). O detector *ion-trap* realiza a captura dos íons que foram dispersos pelo equipamento retendo-os de modo a gerar uma radiofrequência que é exposta na amostra favorecendo a liberação do íon molecular relativo que identifica a molécula a partir de uma correlação entre a  $m/z$  pertinente (CHIARADIA; 2008; ZHANG, 2018).

Os resultados obtidos a partir da análise no *MS-ÍON TRAP* estão dispostos na Tabela 2, onde pode-se perceber as massas que encontradas estão de acordo com as razões encontradas a partir da análise da estrutura por métodos computacionais (ChemDraw®).

Tabela 2 - Dados das massas exatas dos íons moleculares

NOME DO COMPOSTO	MASSA CALCULADA [M/Z]	[MH]	MASSA ENCONTRADA
MAL1	369,49	370,49 <sup>[M+H]</sup>	370,13
MAL 2	355,11	356,11 <sup>[M+H]</sup>	356,12
MAL3	341,43	342,43 <sup>[M+H]</sup>	342,10

Fonte: REIS, 2021.

Sendo assim, dada a importância da determinação da massa exata para a comprovação estrutural de compostos, foram obtidos espectros de massa das moléculas por meio espectrômetro de massa de alta resolução por ionização química e os ensaios procederam-se pela análise em modo positivo para os compostos da série. Obtendo os seguintes resultados: **MAL1** obtendo-se a  $m/z$  de 370,13 g/mol e os ensaios das moléculas **MAL2** e **MAL3** encontrando-se os valores de  $m/z$  356,12 g/mol e 342,10 g/mol, respectivamente como demonstrado nos espectros dispostos no **APÊNDICE A, B e C**.

A análise realizada a partir do espectrofotômetro na região do infravermelho ocorre a partir da identificação de mudanças no estado de energia vibracional correspondente aos grupos funcionais presentes nas moléculas, a faixa de detecção está entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$  (MOHAMED, 2017). Portanto, os resultados estão

dispostos na tabela 3 e os espectros estão dispostos na sessão **APÊNDICE D, E e F**. Os estiramentos foram analisados a partir de Pavia et al., 2010.

Tabela 3 - Espectro de Infravermelho - IV – FTIR, IR Prestige-21, da Shimadzu® – Estiramentos correspondentes aos tiofênicos acrídnicos

NOME DO COMPOSTO	ESTIRAMENTO	NÚMERO DE ONDA (cm <sup>-1</sup> )
MAL1	-N=C (aromático)	3276; 3240.
	C≡N	2221
	C-N (aromático)	1346; 1028.
	C-H (aromático)	3126
	C-H (alceno)	3088
	C=N	1640
	C=C (aromático)	1591; 1541; 1507; 1476.
	C-H	911; 876; 861; 846; 792; 762; 754; 712.
	C-S	2653
MAL2	-N=C (aromático)	3279; 3241.
	C-H (aromático)	3120
	C≡N	2217
	C-N (aromático)	1342; 1037.
	C-H (alceno)	3090
	C=N	1635
	C=C (aromático)	1584; 1545; 1497; 1472; 1457.
	C-H	904; 880; 859; 844; 812; 791; 752; 714.
	C-S	2743

MAL3	-N=C (aromático)	3277; 3240.
	C-H (aromático)	3117
	C≡N	2222
	C-N (aromático)	1345; 1029.
	C-H (alceno)	3087
	C=N	1637
	C=C (aromático)	1586; 1542; 1509; 1473
	C-H	915; 860; 845; 795; 765; 747; 710.
	C-S	2763

Fonte: REIS, 2021

As análises dos estiramentos procederam-se de acordo com Pavia et al. (2010), além de correlacionar aos dados obtidos por Serafim (2018). Portanto, nota-se a presença de vibrações relativas à ligação C=N, que corresponde a faixa de 1690 - 1640  $\text{cm}^{-1}$ , revelando para as MALs estiramentos entre 1635  $\text{cm}^{-1}$  a 1640  $\text{cm}^{-1}$ . Os estiramentos correspondentes as ligações C-N podem ocorrer na região de 1350  $\text{cm}^{-1}$  e 1000  $\text{cm}^{-1}$ , as moléculas expressaram os seguintes valores: **MAL1**, 1346 - 1028  $\text{cm}^{-1}$ ; **MAL2**, 1342 - 1037  $\text{cm}^{-1}$  e **MAL3** apresentando os estiramentos 1345 – 1029  $\text{cm}^{-1}$ .

Para nitrilas, a faixa de deformações axiais referente a tripla ligação C≡N ocorrem na faixa de 2220 a 2260  $\text{cm}^{-1}$  sendo assim os estiramentos encontrados nos compostos MAL 1 foi de 2221, assim como 2017  $\text{cm}^{-1}$  e 2022  $\text{cm}^{-1}$  para as moléculas MAL 2 e MAL 3, respectivamente.

Os estiramentos -NH aromático encontra-se na faixa de 3500 a 3300  $\text{cm}^{-1}$  os compostos analisados apresentaram majoritariamente estiramentos na região de 3300  $\text{cm}^{-1}$ . As ligações dos grupamentos tíois (S-H) são descritos no intervalo de 2600 ou 2550  $\text{cm}^{-1}$ , com bandas fracas, largas e finas. Porém nenhuma das amostras demonstrou estiramentos nesta região.

As ligações de C=C na região do aromático foram associadas a estiramentos que apresentaram valores de 1600 - 1475  $\text{cm}^{-1}$ , desse modo os valores encontrados

(1591  $\text{cm}^{-1}$  a 1457  $\text{cm}^{-1}$ ) para as moléculas analisadas, portanto esse fato comprova a presença de anéis aromáticos na estrutura obtida. Em relação ao grupamento C-H (aromático) que geralmente apresentam estiramentos entre 3150 - 3050  $\text{cm}^{-1}$ , foram observados de 3117  $\text{cm}^{-1}$  a 3126  $\text{cm}^{-1}$ , portanto reforçam a presença de anéis aromáticos nas estruturas obtidas. Em adição, pode-se destacar as vibrações referentes a C-H (alcenos) alifáticos que estão dispostos na faixa de 3100-3000  $\text{cm}^{-1}$ , sendo possível identificar nas moléculas estudadas estiramentos que variam de 3087  $\text{cm}^{-1}$  a 3090  $\text{cm}^{-1}$ .

Corroborando com os resultados descritos, os estiramentos obtidos em relação a ligação de C-H de aromático com dobramentos fora do plano e intensidade baixa em formato de singletos, presente na estrutura das moléculas analisadas, aparecem no espectro a partir do intervalo de 900 - 690  $\text{cm}^{-1}$ , demonstrando presença de cadeia alquila.

Portanto, diante das considerações expostas, continuamos com a elucidação estrutural a partir da realização das análises de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  dos compostos sintetizados (MAL1-3).

Após as análises dos espectros foi observado a padronização de sinais relativos ao núcleo acrídinico com base nas literaturas publicadas por Serafim (2018) e Sharhana (2018), os sinais relativos ao ensaio de  $^1\text{H}$  das moléculas obtidas, encontram-se descritos na Tabela 4 e os respectivos espectros encontram-se no APÊNDICE G, H e I.

Tabela 4 - Dados do RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos sintetizados série MAL.

NOME DO COMPOSTO	DESLOCAMENTO
MAL1	$\delta = 13,53$ (1H, s, NH); 8,14 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, CH aromático); 7,84 (4H, s, CH aromático); 7,35 (2H, s, CH aromático); 2,77 (2H, m, cicloalquil); 2,63 (2H, m, cicloalquil); 1,84 (2H, s, cicloalquil); 1,65-1,62 (4H, m, cicloalquil).
MAL2	$\delta = 13,17$ (1H, s, NH); 8,14 (2H, d, $J = 8,45$ Hz, CH aromático); 7,81 - 7,79 (4H, m, CH aromático); 7,33 (2H, s, CH aromático); 2,64 (2H, s, CH cicloalquil); 1,80 - 1,73 (4H, m, cicloalquil).

MAL3	$\delta$ = 13,42 (1H, s, NH); 8.17 (2H, d, CH aromático); 7.83 (4H, s, CH aromático); 7.35 (2H, s, CH aromático); 2.91 - 2.88 (2H, m, CH cicloalquil); 2.76 - 2,74 (2H, m, CH cicloalquil); 2,380 (2H, m, CH, cicloalquil).
------	---

Fonte: REIS, 2021.

Com relação ao RMN  $^1\text{H}$  da série **MAL**, observamos os deslocamentos químicos dos hidrogênios cicloalquílicos, para todos os compostos, na faixa de  $\delta_H$  1,62 a 2.91 ppm. Já o acoplamento da função amina e o núcleo acrídinico conduziu a uma amina (N-Ar) onde observamos o deslocamento químico para o hidrogênio de todos os compostos na faixa de 13,53 – 13,17 ppm. Além dos sinais dos hidrogênios aromáticos acrídinicos entre 7,33 e 8.16 ppm.

De modo a observar o espectro da MAL 1 (2-(acridin-9-il-amino] - 5,6,7,8-tetrahydro-4H-Ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrilo) na região do aromático percebe-se que os sinais nas regiões 8.14 (2H, *d*,  $J= 8,0$  Hz, CH aromático); 7,84 (4H, s, CH aromático); 7,35 (2H, s, CH aromático) foram condizentes com o padrão de sinais do núcleo acrídinico citado por Sharhana et al. (2018) e Souza (2019).

A presença de sinais na região alifática citado por Serafim et al. (2018) relativo ao composto ACS3, foram identificados no espectro relativo a MAL-1, a partir das correlações 2,77 (m, 2H, cicloalquil); 2,63 (m, 2H, cicloalquil); 1,84 (s, 2H, cicloalquil); 1,65-1,62 (m, 4H, cicloalquil com seus respectivos dados de integrais juntamente com a massa molecular obtida 370,13 g/mol [M-H] obtidos pelo espectro de massa (APÊNDICE A) confirma a formação do produto.

O espectro de hidrogênio relativo ao composto MAL-2 possui os seguintes sinais de 8,14 (*d*, 2H,  $J=8,45$  Hz, CH aromático); 7,81-7,79 (m, 4H, CH aromático); 7,33 (s, 2H, CH aromático); 2,64 (s, 2H, CH aromático); 1.80-1.73 (m, 4H, cicloalquil) e o composto compatíveis com as referências Serafim (2018) e Sharhana (2018) e similar ao encontrado na molécula ACS2 em relação a região alifática. Porém, ainda existe a ausência de um sinal relativo a dois hidrogênios na possível região alifática, provavelmente estando em sobreposição ao pico do solvente.

Por fim, a molécula MAL-3 possui os seguintes sinais de hidrogênio na região aromática: 8.17 (*d*, 2H, CH aromático); 7.83 (s, 4H, m, CH aromático); 7.35 (s, 2H, CH

aromático), bem como os demais na região alifática, 2.91-2.88 (m, 2H, CH cicloalquil); 2.76 - 2,74 (m, 2H, CH cicloalquil); 2,38 (m, 2H, CH, cicloalquil).

Em relação aos espectros de  $^{13}\text{C}$  foi observado a presenças de sinais relativos ao núcleo acrídinico. Sendo assim, os sinais relativos aos compostos sintetizados obtidas, estão dispostos na Tabela 5 e os respectivos espectros encontram-se no APÊNDICE J, K e L.

Tabela 5 - Dados do RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos sintetizados série MAL

Nome do composto	Sinal ( $\delta$ )
MAL1	$^{13}\text{C}$ NMR (126 MHz, DMSO) $\delta$ 155.11, 139.91, 138.12, 134.16, 125.85, 122.95, 118.53, 115.82, 114.94, 31.34, 28.91, 28.75, 27.64, 26.94.
MAL2	$^{13}\text{C}$ NMR (126 MHz, DMSO) $\delta$ 155.08, 139.90, 133.93, 133.03, 126.10, 122.76, 118.35, 116.13, 114.80, 24.05, 22.75, 21.68.
MAL3	$^{13}\text{C}$ NMR (126 MHz, DMSO) $\delta$ 154.95, 142.52, 139.96, 134.10, 126.01, 122.93, 118.49, 115.90, 115.01, 29.66, 28.00, 26.80.

Fonte: REIS, 2021.

Os dados descritos na tabela 5 correspondem aos sinais encontrados nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  dos compostos da série **MAL**. A partir desta análise, pode-se comprovar e correlacionar aos carbonos pertinentes aos compostos sintetizados por Serafim (2018); Sharhana (2018) e Sousa (2019).

Os sinais relativos ao carbono aromáticos variam de 114.80 ppm a 142.52 ppm, provavelmente indicando os picos relacionados a molécula de acridina. Os desdobramentos alifáticos representam o intervalo entre 21.68 a 31.34 ppm relativos à região correspondente ao ciclopenta (5CN), ciclohexa (6CN) e ciclohepta (7CN). Nota-se sinais sobrepostos devido ao ambiente químico similar entre os carbonos.

Os sinais encontrados na região de 154.95 a 155.11 podem ser atribuídos ao carbono ligado a função amina da molécula, o deslocamento químico pode ter ocorrido devido a presença do átomo de enxofre em três ligações influenciando assim no

ambiente químico causando um deslocamento de pico, evento similar ocorreu nos compostos ACS1, ACS2 e ACS3 publicados por Serafim et al (2018).

Desta forma, de acordo com as correlações bem como reforçado pelos dados espectrais de massas e infravermelho (Tabela 2 e 3, respectivamente), foi identificado as moléculas: 2 - [(acridina - 9 - il) amino] -4H, 5H, 6H, 7H, 8H-ciclohepta [b] tiofeno-3-carbonitrila (MAL1); 2 -[(acridina - 9 - il) amino] -4,5,6,7- tetrahidro -1-benzotiofeno-3-carbonitrila (MAL2) e 2 - [(acridin-9-il) amino] -4H, 5H, 6H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila (MAL3), porém não foi encontrado referência sobre a mesma na literatura devido ao caráter inédito da série.

Diante do exposto, e a partir das técnicas de caracterização MS, FTIR, RMNH<sup>1</sup> e RMNC<sup>13</sup> pode-se inferir que as moléculas da série MAL encontram-se identificadas, elucidadas e apresentam-se como moléculas puras, desta forma, foram encaminhadas para a etapa de testes biológicos afim de avaliar o potencial antileishmania e ainda o estímulo relacionado a secreção de citocinas a partir dos tratamentos de macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

## 5.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA – DERIVADOS TIOFÊNICOS ACRÍDICOS

Os estudos relacionados a citotoxicidade dos compostos tiofênicos acrídnicos foram testados sobre macrófagos J774 e as análises relativas à atividade antileishmania foram realizadas em cepas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* pelo método de MTT. A partir da identificação do potencial da série ACS procedeu-se com a síntese e avaliação biológica da série **MAL**, levando em consideração a baixa citotoxicidade em macrófagos J774, realizou-se os estudos de citotoxicidade por Anexina-PI, além da avaliação da expressão de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, bem como as citocinas presentes nas respostas imunológicas Th1 e Th2, estes testes não foram realizados para a série ACS devido o contexto pandêmico.

### 5.2.1 Determinação do efeito citotóxico dos derivados acrídnicos em cultivos de macrófagos J774 – série ACS e MAL

Os macrófagos são responsáveis pela destruição dos parasitos do gênero *Leishmania* intracelularmente, mas podem fornecer um local seguro ao respectivo desenvolvimento, uma vez que, estes patógenos manipulam o seu metabolismo. Sendo assim, os macrófagos representam um fator determinante para a progressão da doença, de modo que, a potente função microbicida destas células impeça a sobrevivência das cepas de *Leishmania*, sendo este o alvo de intensas pesquisas (TOMIOTTO-PELLISSIER, et al., 2018; MAHANTA et al., 2018).

A determinação do efeito citotóxico da série ACS foi avaliada frente a células de macrófagos J774 pelo método de MTT podendo-se verificar o perfil citotóxico. Os resultados encontram-se dispostos na tabela 6.

Tabela 6 - Citotoxicidade dos derivados tiofênicos acrídnicos representados pela concentração citotóxica em 50% dos macrófagos J774 (CC<sub>50</sub>) - ACS.

NOME DO COMPOSTO	CC <sub>50</sub> (µM)
ACS1	15,76± 0,07
ACS2	31,24 ± 0,05
ACS3	26,37 ± 0,10
ANFOTERICINA B	3,09 ± 0,01

Fonte: REIS, 2021.

A partir dos resultados dispostos, pode-se inferir que nenhum dos compostos apresentou citotoxicidade frente a linhagem celular nas concentrações testadas. E que os tiofênicos acrídnicos da série ACS possuem resultados que variam entre 15,76 µM a 31,24 µM.

Os resultados de citotoxicidade são animadores uma vez que, corroboram com o estudo realizado por Serafim et al. (2018) que avaliou a citotoxicidade dos derivados tiofênicos acrídnicos ACS frente a eritrócitos humanos e observou que nenhum dos compostos exibiu perfil citotóxico, diferente da anfotericina B, que apresentou atividade hemolítica com HC<sub>50</sub> = 24,25 ± 2,52 µM. Portanto, pode-se visualizar uma análise mais ampla, uma vez que esses compostos não exibiram perfil citotóxico para eritrócitos nem macrófagos.

Outro dado que corrobora com a baixa citotoxicidade desses derivados tiofênicos acrídnicos foi observado na pesquisa realizada por Félix et al. (2016), onde se verificou que nenhum dos derivados híbridos tiofênicos indólicos testados apresentou citotoxicidade frente a eritrócitos humanos até a concentração de 400 µg/mL e comprovou que todos os compostos exibiram melhor resultado que os fármacos disponíveis no mercado, dentre eles: antimoniais pentavalentes, trivalentes e anfotericina B, fato que se repetiu no presente estudo.

Portanto, diante do exposto percebe-se uma boa tolerância dos compostos da série ACS testados em relação a citotoxicidade devido ao comparativo com o resultado representado pelo controle positivo Anfotericina B que todas as moléculas analisadas foram superiores aos resultados apresentados pelo fármaco de referência para tratamento da leishmaniose.

Deste modo, ao traçar a análise dos perfis citotóxicos da série MAL foram também avaliados frente a linhagem de macrófagos J774 e os resultados podem ser visualizados na tabela 7.

Tabela 7 - Citotoxicidade dos derivados tiofênicos acrídnicos representados pela concentração citotóxica em 50% dos macrófagos J774 (CC<sub>50</sub>) – MAL (MAL).

NOME DO COMPOSTO	CC <sub>50</sub> (µM)
MAL1	44,76 ± 0,03
MAL2	37,40 ± 0,02
MAL3	50,55 ± 0,02
ANFOTERICINA B	3,09 ± 0,01

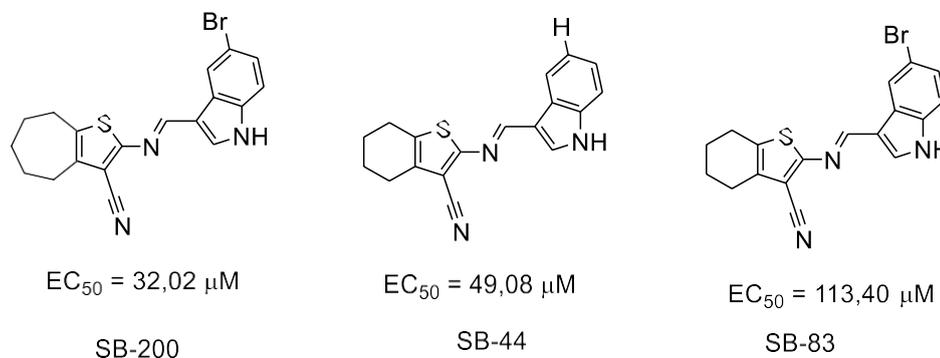
Fonte: REIS, 2021.

A partir da análise da tabela 7, nota-se que os compostos da série MAL variam os valores de CC<sub>50</sub> entre 37,40 a 50,55 µM e todos os compostos demonstraram menores perfis citotóxicos quando correlacionados ao fármaco de referência.

Os resultados obtidos na série MAL assemelham-se com os compostos analisados por Rodrigues et al. (2015), que avaliou moléculas da série de derivados 2-amino-tiofênicos que foram expostos a macrófagos peritoneais murinos obtendo citotoxicidade de 32,02 µM para o composto SB-200, 49,08 µM para o composto SB-44

e por fim, 113  $\mu\text{M}$  para o composto SB-83. As estruturas podem ser vistas na figura 21.

Figura 21 - Derivados 2-aminotiofênicos publicados por Rodrigues et al. (2015).

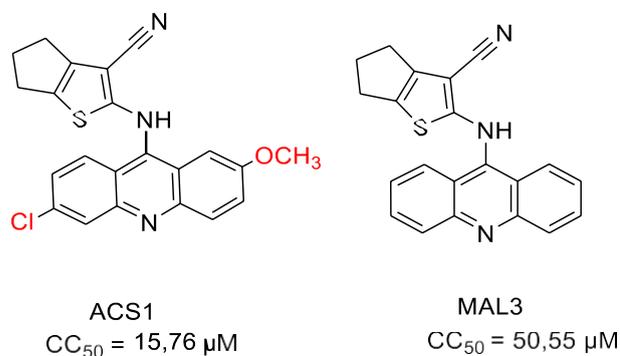


Fonte: Rodrigues et al. (2015).

Em adição, os estudos conduzidos por Almeida et al. (2021) avaliou compostos espiro-acrídinicos frente a eritrócitos humanos obtendo como resultado a inexistência de citotoxicidade nas concentrações testadas ( $HC_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$ ). Portanto, a partir do exposto, pode-se inferir que os compostos com núcleo tiofênico e núcleo acrídinico possuem baixa citotoxicidade em linhagens de macrófagos e em eritrócitos.

Sendo assim, ao analisar a correlação estrutural entre os compostos da série ACS e MAL infere-se uma diminuição do citotóxico como pode ser visto a partir da correlação entre as moléculas ACS1 e MAL3 que apresentam diferença significativa nos valores de  $CC_{50}$ , tal diferença pode-se estar vinculado a ausência de radicais ligados ao anel acrídinico, como pode ser visto na figura 22.

Figura 22 -Comparativo entre perfis citotóxicos ACS1 e MAL3



Legenda: REIS, 2021.

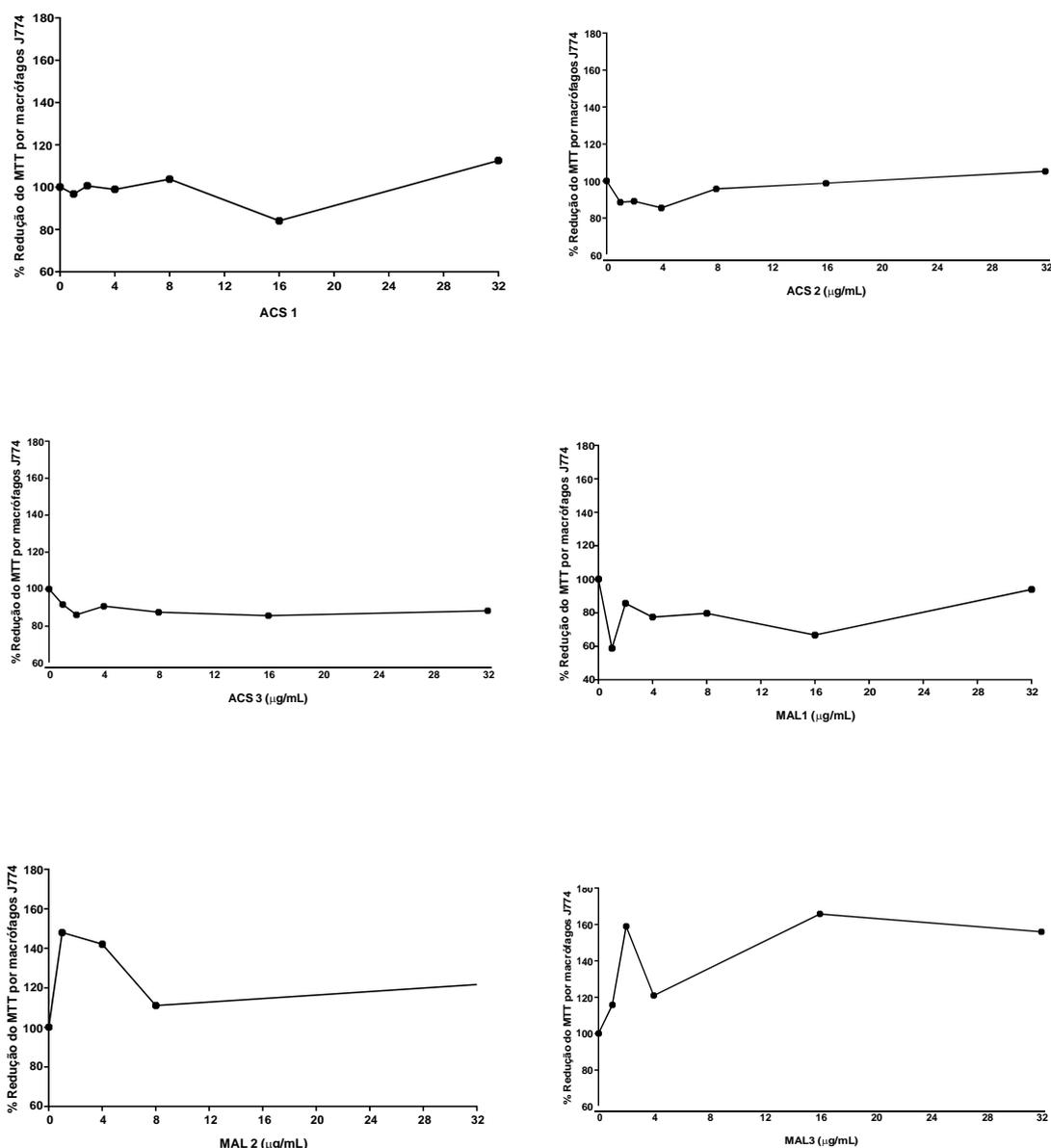
Em adição, a exemplo do fármaco Glucantine® utilizado para o tratamento de leishmaniose. Embora o mecanismo de ação não esteja estabelecido, acredita-se que após a conversão na forma trivalente ( $Sb^{3+}$ ) a ação leishmanicida ocorre por geração direta de EROS, depleção de tióis e modulação de vias bioenergéticas dos macrófagos, como: glicólise, oxidação beta dos ácidos graxos, inibição da fosforilação de ADP, bloqueio de grupos SH de amastigotas, proteínas e ainda a inibição da topoisomerase I (BRASIL, 2010).

Portanto, levando em consideração o possível mecanismo de ação deste fármaco acredita-se que compostos imunomoduladores poderiam ser potencialmente leishmanicidas em virtude da capacidade de ativar células fagocitárias (SAHA et al., 2011; MAHANTA et al., 2018).

A determinação do efeito citotóxico foi avaliada frente a células de macrófagos J774 pelo método de MTT, podendo-se verificar o perfil citotóxico dos macrófagos, bem como identificar alguns indícios de atividade imunomoduladora. Os gráficos estão dispostos no APÊNDICE M.

A Figura 23 refere-se aos derivados tiofênicos acrídnicos e, a partir dos resultados dispostos, pode-se inferir que as moléculas **MAL1**, **MAL2** e **MAL3** estimularam a produção dessas células.

Figura 23 - Avaliação da citotoxicidade dos derivados tiofênicos acrídnicos em linhagens de macrófagos J774



Fonte: REIS, 2021

Portanto, diante do exposto percebe-se uma boa tolerância dos compostos testados em relação a citotoxicidade devido ao comparativo com o resultado representado pelo controle positivo Anfotericina B que em todas as moléculas analisadas foram superiores aos resultados apresentados pelo fármaco de referência para tratamento da leishmaniose. Dentre os compostos testados, tanto a série ACS como a MAL, o que se destaca com menor citotoxicidade aparente em macrófagos

J774 foram a MAL3 e as moléculas da série MAL apresentam indícios de expressão de macrófagos sendo passível de investigação da expressão de citocinas que agem na imunomodulação.

### 5.2.2 Determinação do efeito inibitório dos derivados acrídnicos frente a cepas - promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*

Os ensaios de avaliação do efeito inibitório foram realizados frente a cepas de amastigota e promastigotas de *L. amazonensis* a partir do método de MTT, sendo este reagente essencial para os testes de investigação de atividade biológica de novas moléculas.

O mecanismo do MTT ocorre a partir da entrada desta molécula em mitocôndrias de células metabolicamente ativas ocorrendo posteriormente a clivagem a partir da enzima succinato desidrogenase, produzindo cristais de formazan, que gera coloração escura e assim detecta-se e quantifica-se os cristais formados por espectrofotometria. É considerado um método rápido e preciso (SCHERLIES, 2011; BRAGANÇA et al., 2012).

Porém, o MTT apresenta algumas desvantagens como, degradação quando exposto a luz, pois podem causar redução a cristais de formazan alterando o resultado das absorbâncias. Dessa maneira, portanto as leituras devem ser realizadas em ambiente escuro (SERAFIM et al., 2018; VILGES, 2018).

A determinação do efeito inibitório s foi realizada frente as cepas de amastigota e promastigota de *L. amazonensis* nas concentrações de 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL e 32 µg/mL. Os resultados da série ACS encontram-se dispostos na tabela 8.

Tabela 8 - Resultados de IC<sub>50</sub> para cepas promastigotas e amastigotas tratadas com derivados tiofênicos acrídnicos - ACS.

Nome do composto	CC <sub>50</sub> (µM)	Promastigota - IC <sub>50</sub> (µM)	Amastigota - IC <sub>50</sub> (µM)	IS <sub>AMASTIGOTA</sub>
ACS1	15,76	2,95	25,47	0,62

ACS2	31,24	6,02	13,79	2,26
ACS3	26,37	5,70	4,00	6,58
ANFOTERICINA B	3,09	1,53	1,0	2,85

Fonte: REIS, 2021.

No presente estudo, avaliou-se os derivados tiofênicos acrídnicos substituídos, série ACS, sob exposição a formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* obtiveram um IC<sub>50</sub> em relação à forma promastigota de 2,95 a 6,02 µM.

Em relação aos resultados do grupo ACS, o estudo publicado por Serafim et al. (2018) frente as cepas promastigotas de *L. amazonensis* demonstraram atividade significativa nas concentrações: ACS1 (IC<sub>50</sub> 9,6 µM), ACS2 (IC<sub>50</sub> = 10,95 µM), ACS03 (IC<sub>50</sub> = 32,26 µM), sendo a melhor molécula a ACS1. No entanto, os dados obtidos no presente estudo demonstram-se com eventos melhores, possuindo como resultados: ACS1 (IC<sub>50</sub> = 2,95 µM), ACS02 (IC<sub>50</sub> = 6,02 µM), ACS03 (IC<sub>50</sub> = 5,70 µM). Ao analisar de maneira comparativa entre os compostos percebe-se uma tendência de melhor perfil tripanocida para a molécula **ACS1**.

No que tange a análise relativa as formas amastigotas axênicas estudadas verifica-se o intervalo de IC<sub>50</sub> presente nos derivados tiofênicos acrídnicos de 4,0 µM a 25,47 µM.

E por fim, o índice de seletividade (IS) consiste na relação entre citotoxicidade do composto em macrófagos J774 e a atividade biológica frente as cepas amastigotas de *L. amazonensis*. Deste modo, calculou-se a razão entre a citotoxicidade para macrófagos J774 (CC<sub>50</sub>) e a atividade contra amastigotas (IC<sub>50</sub>). Diante dos dados é possível analisar as informações inéditas obtidas a partir dos testes descritos que a molécula ACS3 encontra-se em destaque com IC<sub>50</sub>= 4,0 µM em amastigotas e com IS= 6,58, sendo possível a eleição como um potencial lead da série ACS.

Ao analisarmos os dados da série ACS é inconfundível seu potencial leishmanicida. Nesse contexto, desenvolveu-se a série MAL para que fosse possível a avaliação deste potencial a partir de modificações estruturais. Como resultado, avaliou-se frente as cepas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* a fim de estabelecer este efeito comparativo. Os dados encontram-se na tabela 9.

Tabela 9 - Resultados de IC<sub>50</sub> para cepas promastigotas e amastigotas tratadas com derivados tiofênicos acrídnicos – MAL

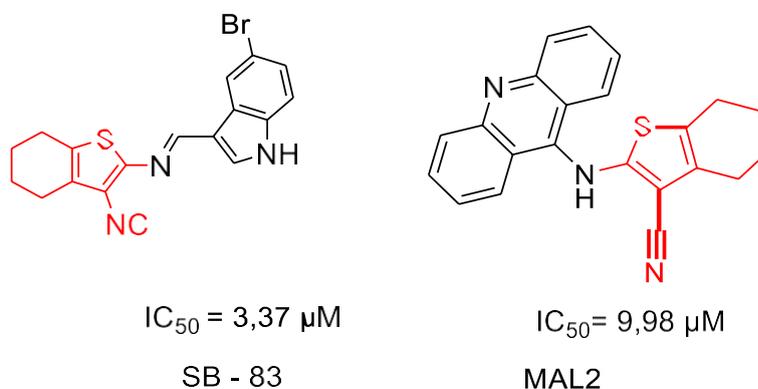
Nome do composto	CC <sub>50</sub> (μM)	Promastigota - IC <sub>50</sub> (μM)	Amastigota - IC <sub>50</sub> (μM)	IS <sub>AMASTIGOTA</sub>
MAL1	44,76	9,56	27,44	1,63
MAL2	37,40	9,98	35,93	1,05
MAL3	50,55	9,28	53,68	0,94
ANFOTERICINA B	3,09	1,53	1,0	2,85

Fonte: REIS, 2021.

Ao analisar os resultados obtidos verifica-se uma redução da atividade biológica entre as formas das cepas de *L. amazonensis* e este evento similar ocorreu com os estudos conduzidos por Rodrigues et. al (2015) cujos compostos foram expostos a cepas promastigotas de *L. amazonensis* exibindo IC<sub>50</sub> = 3,37 μM (SB-83) e 3,65 μM (SB-200) e em amastigotas axênicas obteve-se IC<sub>50</sub> = 18,50 μM (SB-83) a 20,09 μM (SB-63).

Ao observar as estruturas SB-83 e MAL2 (Figura 24) nota-se uma pequena semelhança em relação ao grupamento tiofênico e ainda se verifica uma diminuição no potencial antipromastigota a partir da inserção do grupamento acrídico.

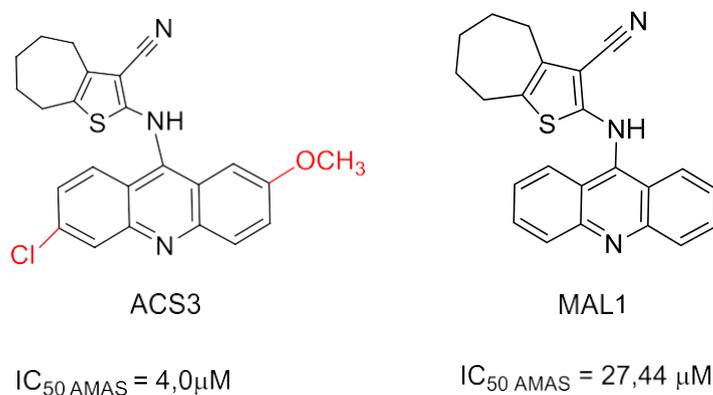
Figura 24 - Análise comparativa entre os compostos SB-83 (Rodrigues et al., 2015) e MAL2.



Fonte: RODRIGUES et al. (2015); REIS (2021).

Ao traçar um paralelo entre as séries ACS e MAL pode-se inferir que a série ACS dotada de anel acrídinico substituído possui melhores resultados quanto ao percentual de inibição das cepas de *L. amazonensis* na forma promastigota quando comparados aos compostos da série MAL. Ao verificar a relação entre os compostos ACS3 e MAL1, cuja similaridade estrutural pode ser visualizada na figura 25, infere-se que a substituição no anel acrídinico foi benéfica para a atividade amastigota com um aumento significativo a partir da presença dos substituintes metóxil e cloro.

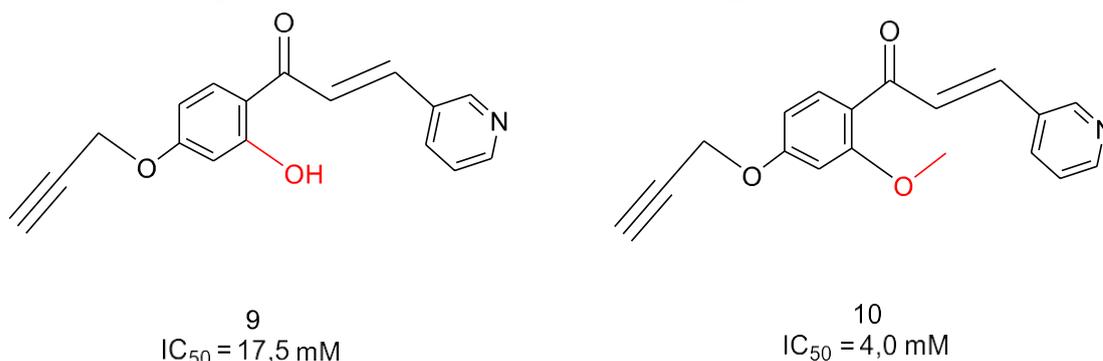
Figura 25 - Comparativo entre ACS1 e MAL3 – atividade amastigota



Fonte: REIS, 2021.

O fato das moléculas ACSs possuírem na estrutura química um anel acrídinico dissustituído com um grupamento metóxi e um cloro pode estar relacionado ao aumento da atividade antileishmania. Ortalli et al. (2018) sugeriu que os compostos derivados de chalconas testados por seu grupo inferiram que a inserção do grupamento metoxila frente a formas promastigotas de *L. donovani*, relação presente na figura 26.

Figura 26 - Chalconas e influência do grupo metoxila



Fonte: Ortalli et al. (2018)

Apesar dos perfis potenciais antileishmania da série ACS optou-se pelo seguimento dos estudos com a série MAL devido o ineditismo da série, ação frente as promastigotas com  $IC_{50} \leq 10 \mu M$ , potencial perfil imunomodulatório e melhor perfil citotóxico.

Em conclusão, elencou-se os compostos tiofênicos acrídnicos com melhores resultados de citotoxicidade, antipromastigota, antiamastigota e índice de seletividade além do caráter inédito. Sendo assim, a **série MAL** foi direcionada a testes que avaliam o efeito microbicida, citotoxicidade mediada por Anexina-PI sendo mais sensível que a análise em MTT e análise relativa à expressão de ERNS, EROS e citocinas relacionadas a resposta Th1 e Th2.

### 5.2.3 Determinação do efeito microbicida dos derivados acrídnicos em cultivos de macrófagos J774 infectados com *L. amazonensis*

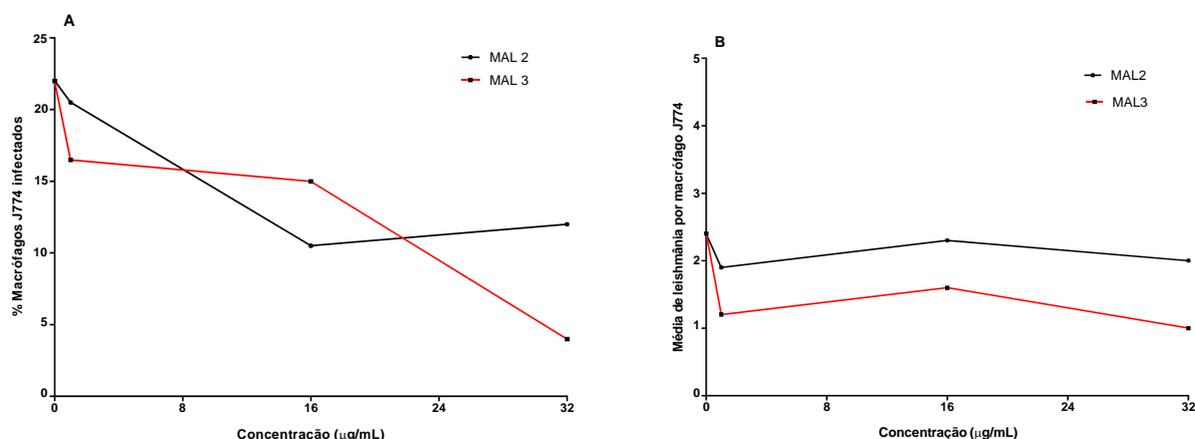
Os estudos dos perfis de citotoxicidade e os resultados obtidos a partir da avaliação dos derivados acrídnicos frente às cepas amastigotas de *L. amazonensis* forneceram informações importantes acerca da possível capacidade imunomoduladora desses compostos, uma vez que se aumenta a expressão dos macrófagos e as moléculas podem agir modulando o metabolismo.

Os ensaios experimentais que utilizam as formas promastigotas e amastigotas intracelulares demonstram a capacidade das moléculas agirem mediando o metabolismo de uma célula primária, como por exemplo, o macrófago. Deste modo, acredita-se que os compostos da série MAL são candidatos promissores para o tratamento da leishmaniose. Portanto, optou-se por avaliar os macrófagos infectados com *L. amazonensis* a fim de verificar o potencial antileishmania destas moléculas.

As moléculas selecionadas foram: MAL2, MAL3 devido ao aumento expressivo no quantitativo de macrófagos visualizado no ensaio citotóxico em MTT. Em relação as concentrações, optou-se por manter as análises em baixas concentrações para que fosse possível observar eventos relativos a imunomodulação.

Após a realização dos ensaios, avaliou-se três parâmetros importantes que foram, o percentual de macrófagos infectados, médias das leishmanias por macrófagos e por fim o índice de infecção sendo este fundamental para a avaliação da atividade antileishmania. Portanto, a figura 27 demonstra os resultados relativos à atividade microbicida dos derivados tiofênicos acrídnicos.

Figura 27 - Resultados relativos à atividade microbicida dos derivados tiofênicos acrídnicos.



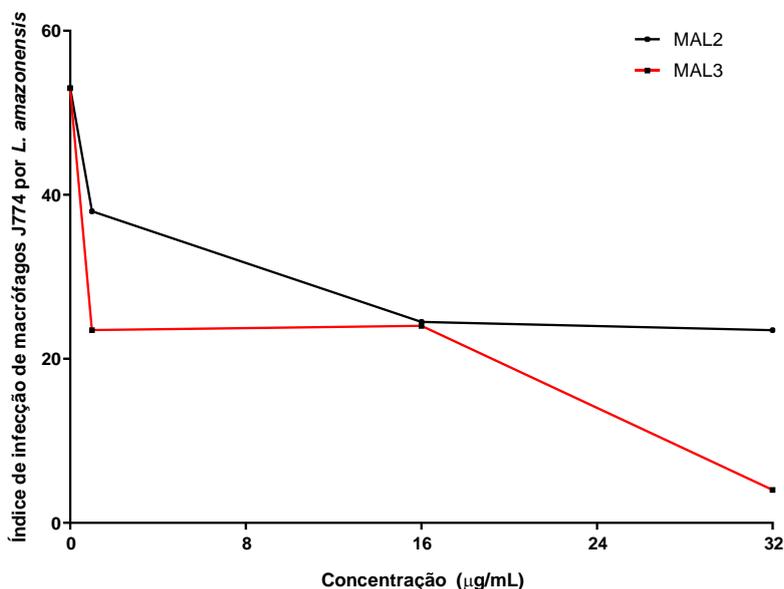
Legenda: A. Porcentagem de macrófago J774 infectado *versus* a concentração dos derivados tiofênicos acrídnicos. B. Média de Leishmania por macrófago. Fonte: REIS, 2021

Diante do exposto, pode-se identificar que a MAL3 apresenta uma redução expressiva nos macrófagos infectados (figura 27A). A partir dos dados descritos, pode-se observar que esta molécula na concentração 1 µg/mL promoveu uma redução massiva dos macrófagos infectados sendo possível observar apenas 16% de células infectadas. Outra consideração importante, para a mesma molécula, observa-se que na concentração de 32 µg/mL a taxa de infecção é de apenas 4%.

Ao analisarmos a média de leishmania por macrófago J774 (figura 27B), infere-se que ambas as moléculas apresentaram perfis similares, sendo que a MAL3 ( $C_{1\mu\text{g/mL}} = 1,2$ ;  $C_{16\mu\text{g/mL}} = 1,6$  e  $C_{32\mu\text{g/mL}} = 1,0$ ) exibiu resultados discretamente menores que a MAL2 ( $C_{1\mu\text{g/mL}} = 1,9$ ;  $C_{16\mu\text{g/mL}} = 2,3$  e  $C_{32\mu\text{g/mL}} = 2,0$ ). Ambas foram melhores em relação ao controle negativo ( $C_{0\mu\text{g/mL}} = 2,4$ ).

A análise do índice de infecção (figura 28) demonstra que todas as moléculas apresentaram menores índices de infecção em relação ao controle, cuja taxa de infecção foi de 53%. A molécula com melhor atividade frente aos macrófagos infectados com cepas amastigotas de *L. amazonensis* é a MAL3, pois na concentração de 32 µg/mL apresentou índice de infecção de 4%.

Figura 28 - Índice de infecção de macrófagos infectados com cepas amastigotas de *L. amazonensis* dos compostos tiofênicos acrídnicos – **MAL2 e 3**



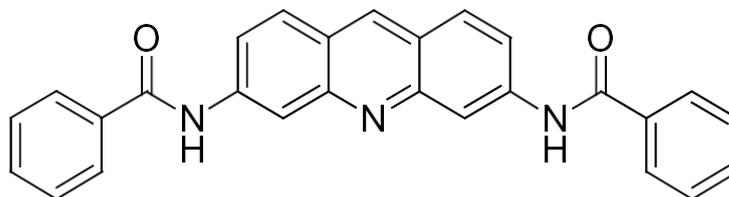
Fonte: REIS, 2021.

Portanto, a partir dos dados expostos percebe-se a determinação do potencial imunomodulatório da resposta frente aos macrófagos pois ao comparar com os resultados da atividade amastigota observa-se um ganho significativo na resposta farmacológica, podendo este ser um indicativo de modulação a partir da ativação dos macrófagos.

O trabalho conduzido por Rodrigues et al. (2015) corrobora os resultados supracitados da série MAL, o ensaio avalia o efeito imunomodulador dos derivados tiofênicos indólicos e identifica que os compostos SB-44, SB-83 e SB-200 possuem efeito microbicida partir da modulação de NO.

Da mesma forma, a pesquisa conduzida por Di Giorgio (2007) avaliou compostos acrídnicos mono e di-substituídos (figura 29) identificando como molécula promissora a *N*-[6-(benzoilamino)-3-acridina]-benzamida que demonstrou forte atividade tanto na forma promastigota como amastigota por meio de ação indireta, ou seja, imunomoduladora por interferir diretamente na resposta farmacológica quando comparado aos resultados das cepas isoladas.

Figura 29 - N-[6-(benzoilamino)-3-acridina]-benzamida

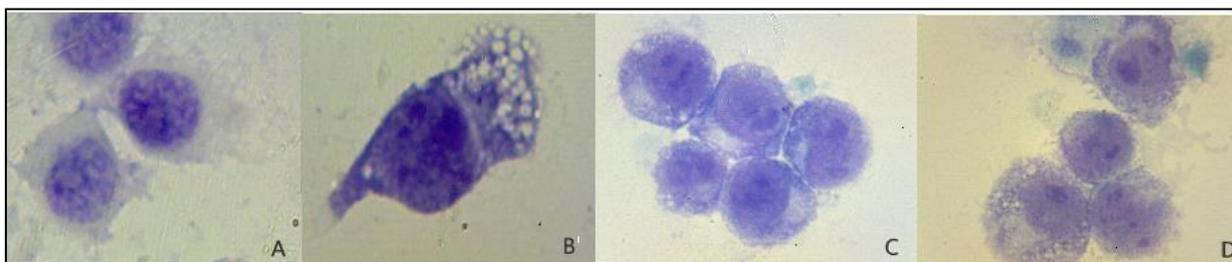


Fonte: Di Giorgio (2007)

Sendo assim, os resultados obtidos pelos compostos tiofênicos acrídnicos fortifica a hipótese de uma possível imunomodulação, uma vez que, os trabalhos de Rodrigues et al. (2015) e Giorgio et al. (2007) apresentam a capacidade imunomoduladora dos núcleos químicos que compõe estes compostos.

De modo a finalizar os ensaios, realizou-se a análise das fotomicrografias (Figura 30) obtidas a partir de análise em microscópio óptico com aumento de 100x a fim de analisar os resultados em macrófagos infectados corados com Giemsa a 10%.

Figura 30. Fotomicrografia dos derivados acrídnicos mais promissores classificados a partir de resultados do índice de infecção



Legenda: A. Controle (macrófago sem infecção); B. Macrófago (infectado sem tratamento); C. tratado com MAL3, C = 16 µg/mL e D. Macrófago tratado com MAL3, C = 32 µg/mL.

As fotomicrografias das amostras testes apresentam espécies celulares sem danos celulares e sem a presença de leishmanias na forma amastigota, nota-se também pouca expressão no processo de vacuolização de citoplasma o que pode estar correlacionado a capacidade de neutralização ou modulação do processo infectivo.

Os ensaios conduzidos por Oliveira (2019) realizam estudo similar, porém parte da exposição de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com espécies de Ocelatinas-PT, os resultados demonstraram que houve redução da infecção

intracelular de forma dose-dependente, resultados similares ao obtido pelos tiofênicos acridínicos (MAL3).

Portanto, procedeu-se com os estudos para investigação mais sensível da citotoxicidade, a fim de caracterizar de maneira mais robusta a viabilidade dos compostos da série MAL.

#### 5.2.4 Análise da expressão de Anexina-PI no cultivo macrófagos J774 sob exposição de derivados tiofênicos acridínicos

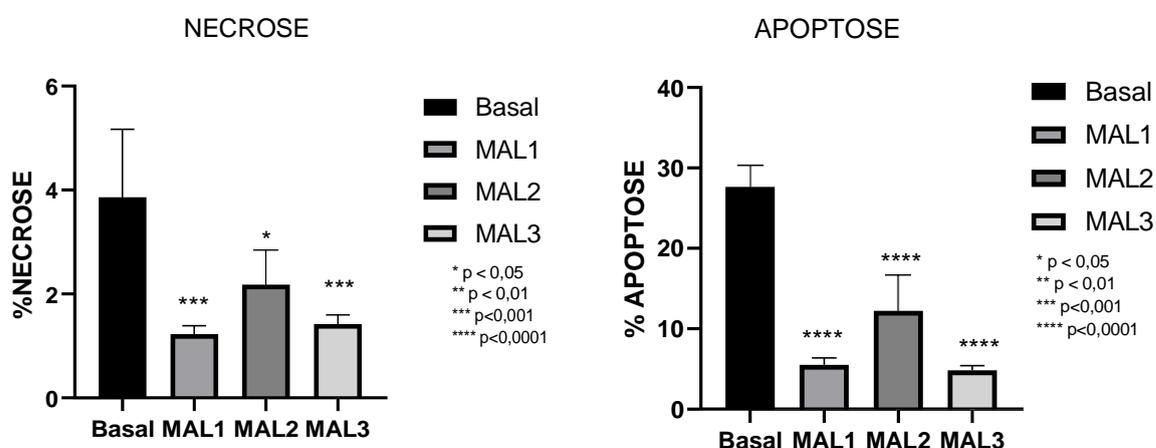
A anexina V é uma proteína que possui atividade para a fosfatidilserina que se encontra no interior da membrana plasmática. Quando a célula sofre dano celular e ocorre a apoptose, a fosfatidilserina é exposta na superfície da membrana, favorecendo a complexação com a anexina V (DA SILVA, 2013).

O PI (iodeto de propídio) é um marcador que se liga ao DNA celular quando a permeabilidade da membrana é alterada. Portanto, a marcação celular com anexina e PI permite tanto o estudo de eventos apoptóticos e necróticos quanto a identificação das células viáveis (VILGES, 2018).

Neste ensaio, foram avaliados os percentuais de células vivas, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose em macrófagos J774 tratados com as moléculas da série MAL devido ao caráter inédito da série. Os tratamentos ocorreram na concentração mais alta testada, 32 µg/mL.

Os resultados mostraram que nenhum dos compostos estudados causou apoptose ou necrose, sendo a taxa de células vivas para todos os ensaios maior que 98%. Os resultados de necrose e apoptose para a série MAL encontram-se dispostos na Figura 31.

Figura 31 - Avaliação da porcentagem de necrose e apoptose em macrófagos J774 a partir do tratamento com tiofênicos acrídnicos



Fonte: REIS, 2021

Os compostos analisados frente a macrófagos J774 demonstraram baixíssima taxa de apoptose em relação ao nível basal, o que fortalece a hipótese que esses compostos não são nocivos a tal espécie celular.

Os compostos MAL 1 e MAL 3 apresentaram resultados de citotoxicidade similares, com isso, percebe-se que o cicloaquil presente nas estruturas não alterou a toxicidade dos compostos. Na análise comparativa entre as MALs e a concentração basal, percebe-se que elas inibiram o processo necrótico na linhagem testada.

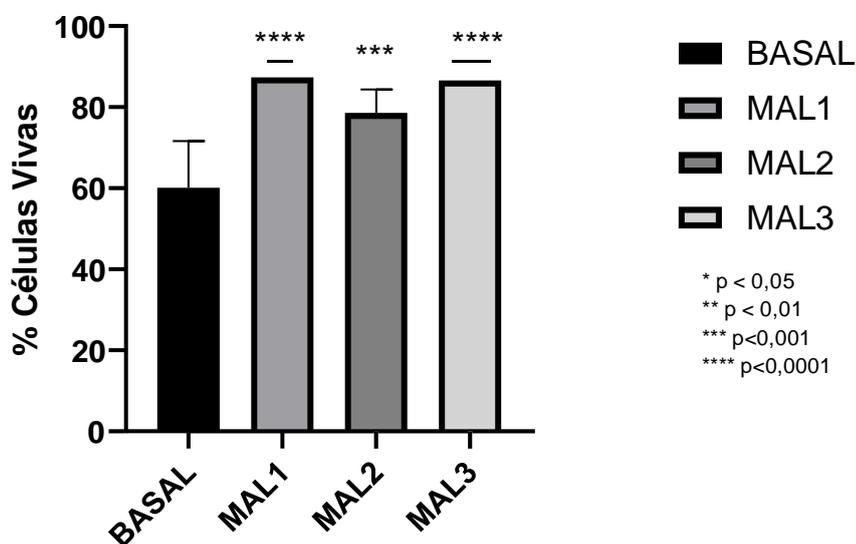
Este resultado corrobora os resultados de MTT previamente realizados e com dados encontrados por Rodrigues et al. (2015), que avaliaram a exposição de macrófagos peritoneais de camundongos murinos a série de derivados 2-amino-tiofênicos, e observaram que não ocorreram eventos necróticos e apoptóticos nas linhagens testadas. Assim, pode-se verificar que as variações estruturais não foram um fator determinante para o aumento da citotoxicidade em macrófagos J774, fornecendo assim uma maior segurança nos ensaios frente a macrófagos infectados com cepas amastigotas de *L. amazonensis*.

A análise do percentual de viabilidade celular nos fornece importante visão no que tange a avaliação da citotoxicidade e ainda evidencia aspectos relacionados ao potencial imunomodulador dos compostos, uma vez que os macrófagos são responsáveis pela destruição dos parasitos do gênero *Leishmania* intracelularmente, mas podem fornecer um local seguro ao desenvolvimento do parasito quando estes patógenos manipulam o seu metabolismo. Sendo assim, os macrófagos representam

um fator determinante para a progressão da doença, de modo que a potente função microbicida destas células impeça a sobrevivência das cepas de *Leishmania*, sendo este o alvo de intensas pesquisas (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018; MAHANTA et al., 2018).

Diante disso, os resultados oriundos da análise de viabilidade celular pelo método de Anexina-PI encontra-se na figura 32.

Figura 32 - Análise de viabilidade celular dos compostos tiofênicos acrídnicos –  
MALS



Fonte: REIS, 2021.

A figura 32 refere-se aos derivados tiofênicos acrídnicos e, a partir dos resultados dispostos, é possível inferir que nenhum dos compostos apresentou citotoxicidade frente às linhagens celulares testadas e todas as moléculas estimularam a proliferação dessas células, com destaque para os compostos MAL1 e 3, o que confirma nos testes de MTT realizados.

A hipótese de que tais moléculas são atóxicas nas concentrações testadas, corrobora a pesquisa realizada por Félix et al. (2016) que, em seus estudos, demonstraram que nenhum dos derivados híbridos tiofênicos indólicos testados apresentou citotoxicidade frente a eritrócitos humanos até a concentração de 400 µg/mL e comprovou que todos os compostos exibiram melhor resultado que os

fármacos disponíveis no mercado, dentre eles antimonais pentavalentes, trivalentes e anfotericina B.

Portanto, a partir dos dados expostos, torna-se relevante o direcionamento dos compostos tiofênicos acrídnicos para avaliação de aspectos moleculares envolvidos no processo imunomodulador em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

#### 5.2.5 Análise de espécies reativas e citocinas em macrófagos J774 infectados com cepas amastigotas de *L. amazonensis*

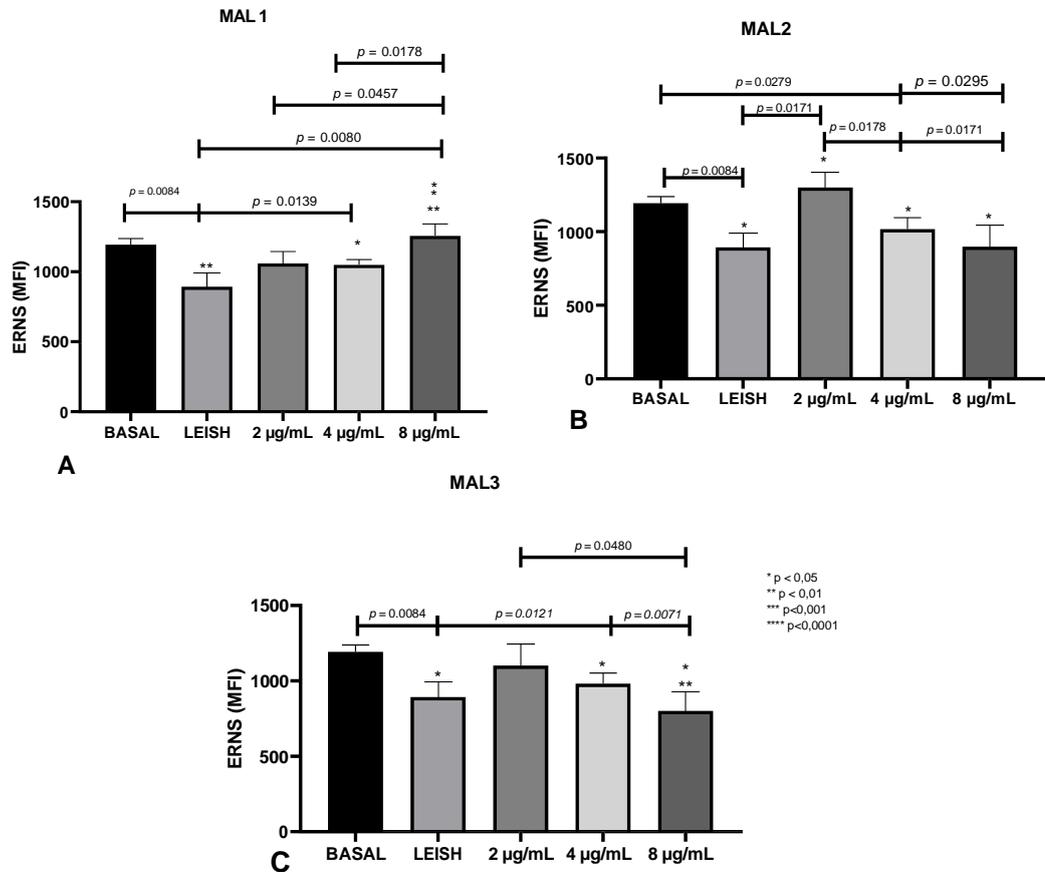
##### 5.2.5.1 Espécies reativas de nitrogênio (ERNs)

O óxido nítrico (NO) quando expresso intracelularmente representa um mecanismo capaz de modular as formas da *L. amazonensis* intracelulares, inativando a ação metabólica da Leishmania intracelularmente (CABRAL et al., 2021).

O NO induz processos apópticos por diferentes vias, que inativam as mitocôndrias e/ou proteínas quinases (ERK 1 e 2; MAPK, Janus quinase; p38), gerando o acúmulo de p53 e caspases intracelulares (De MARTINI et al., 2018). A inibição de NO pelo parasito resulta na inativação macrofágica, gerando ao hospedeiro susceptibilidade à infecção pela leishmania (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021).

A análise das espécies reativas de nitrogênio foi realizada a partir do doseamento da expressão de nitrito/nitrato em macrófagos J774 infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*. O grupo denominado BASAL representa macrófagos J774 sem infecção, já o grupo denominado LEISH representa os macrófagos infectados. No que tange às amostras-teste, todas foram expostas a macrófagos infectados. Deste modo, o doseamento das espécies reativas de nitrogênio sob exposição dos compostos tiofênicos acrídnicos encontram-se dispostos na figura 33.

Figura 33 - Espécies reativas de nitrogênio – Série MAL



Legenda: A = MAL1- MAL 1, B = MAL2 - MAL 2, C= MAL3 - MAL3. ERNS: Espécies reativas de nitrogênio Fonte: REIS, 2021.

A partir da figura A é possível inferir que ocorreu uma redução significativa de NO entre o grupo basal e os macrófagos infectados (LEISH) com  $p=0,084$ . Porém, ao analisar a correlação entre o grupo infectado sem tratamento e os grupos tratados com a MAL1, verifica-se que houve um aumento da expressão de NO na concentração de 8 µg/mL,  $p=0,080$ . Em relação a análise entre as concentrações deste grupo, pode-se observar que existe uma maior expressão de NO na concentração de 8 µg/mL em relação as concentrações de 2 µg/mL ( $p=0,057$ ) e 4 µg/mL ( $p=0,0178$ ). Deste modo, percebe-se uma ligeira modulação positiva do composto MAL1 devido ao aumento da expressão de NO em relação ao basal e o grupo LEISH.

A partir da figura B (MAL2), verifica-se que existe diferença significativa entre a amostra basal e a LEISH, similar ao ocorrido na MAL1. Bem como a amostra tratada com 2 µg/mL, sendo esta molécula com potencial pró oxidante, indicando indução da produção de NO na presença macrófagos infectados e tratados. Em relação às

concentrações 2 µg/mL e 4 µg/mL ( $p=0,0178$ ), ocorreu uma redução expressiva na concentração de NO, nesta última dose, seguida de uma nova queda significativa entre as concentrações 2 e 8 µg/mL ( $p=0,0171$ ).

Neste caso, existe uma possibilidade de aumento da expressão de NO nas menores concentrações testadas, evento similar ao que ocorreu na Figura C (MAL3), que apresentou inibição da síntese de NO diante das menores concentrações testadas, sendo elas 4 µg/mL ( $p = 0,0121$ ) e 8 µg/mL ( $p=0,0071$ ), e aumento da expressão de NO na concentração de 2 µg/mL.

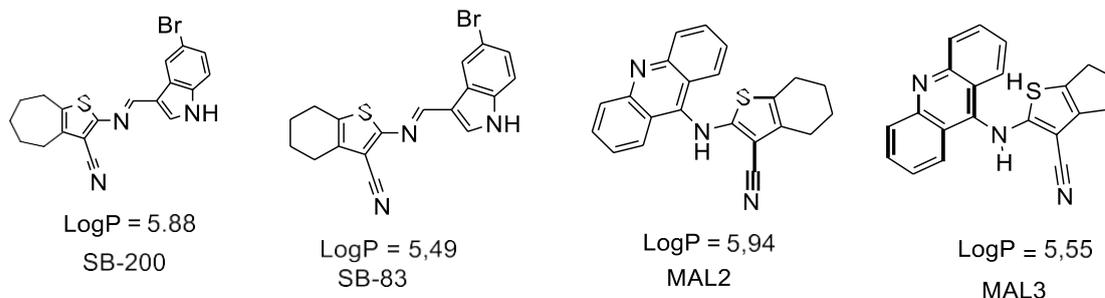
Portanto, observa-se que os dados obtidos entre as concentrações testadas, há uma maior expressão de NO na concentração de 8 µg/mL, para MAL1, porém, a MAL2 demonstra um possível efeito pró oxidante na menor concentração testada e o mesmo ocorre no composto MAL3. Deste modo, percebe-se uma ligeira modulação positiva dos compostos testados, com baixas concentrações, estando em destaque as moléculas MAL2 e MAL3.

Deste modo, adota-se o entendimento de que a diminuição da cadeia alquílica, por consequência, diminuição da lipofilia, justifica o perfil de expressão de NO para MAL 2 e 3, como descrito por Johnson, Gallego e Edwards (2018). A lipofilicidade impacta diretamente na afinidade entre fármaco-receptor, uma vez que os sítios de ligação se apresentam com ao menos uma porção lipofílica dispersa em um ambiente aquoso. Portanto, torna-se mais difícil de executar o efeito biológico devido à necessidade de molécula estar solvatada. Além disso, pode-se inferir que o equilíbrio hidrofílico/lipofílico que favorece a solubilidade e permeabilidade celular em macrófagos, de modo que os compostos necessitam atravessar as membranas celulares e as substâncias com menores valores de LogP podem ter melhor solubilidade aquosa, porém é necessário lipofilia adequada para o ajuste de permeação celular.

Os estudos conduzidos por Rodrigues et al. (2015) analisaram a modulação da resposta imune de macrófagos infectados pela expressão de espécies pró-inflamatórias, a exemplo de TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO. Os compostos tiofênicos (SB-200 e SB-83) estimularam a produção de NO, porém o composto SB-44 não possui significância para este ensaio e provavelmente possui ação direta ao patógeno, uma vez, o IC<sub>50</sub>amas apresentado foi de 15 µM. Então, ao correlacionar o tamanho da molécula e o LogP observa-se que as MAL 2 e 3 possui LogP similares aos compostos testados por Rodrigues et al (2015), então pode-se supor uma possível relação entre

a lipofilia e o tamanho da molécula com o aumento da expressões de NO, disposto na figura 34.

Figura 34 - Log P do composto SB-83 e SB-200 (Rodrigues et al., 2015) e MAL's 2 e 3.



Legenda: MAL1- MAL 1, MAL2 - MAL 2. Fonte: Reis, 2021.

Portanto, a partir do exposto, a molécula mais promissora em relação a expressão NO seria a MAL2 e MAL3 devido a expressão ocorrer em menores concentrações testadas, porém isto não exclui a expressão significativa da MAL1 na concentração de 8 µg/mL. É enfático dizer que os perfis exibidos por MAL2 e MAL3 são relevantes para a continuidade do estudo, pois além da diminuição da lipofilia em relação a MAL1, a diminuição da cadeia carbônica alifática pode ser fator limitante para a observação do efeito biológico.

Além disso, o doseamento de NO, isoladamente, não constitui parâmetro para controle da infecção de *L. amazonensis*, e ainda, a expressão de NO pode inclusive aumentar o dano tecidual em casos de leishmaniose cutânea, como demonstrado por Carneiro et al. (2016), sendo fundamental o doseamento de EROS e as demais citocinas inflamatórias de todos os compostos da série MAL.

#### 5.2.5.2 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio são secretadas pelos macrófagos com o intuito de inibir a progressão da infecção por patógeno externo. O aumento da atividade da via glicolítica ativa o sistema fagocítico mononuclear, que inibe a síntese de óxido nítrico e a produção de EROs (FERREIRA; ESTAQUIER; SILVESTRE, 2021; FURTADO et al., 2021).

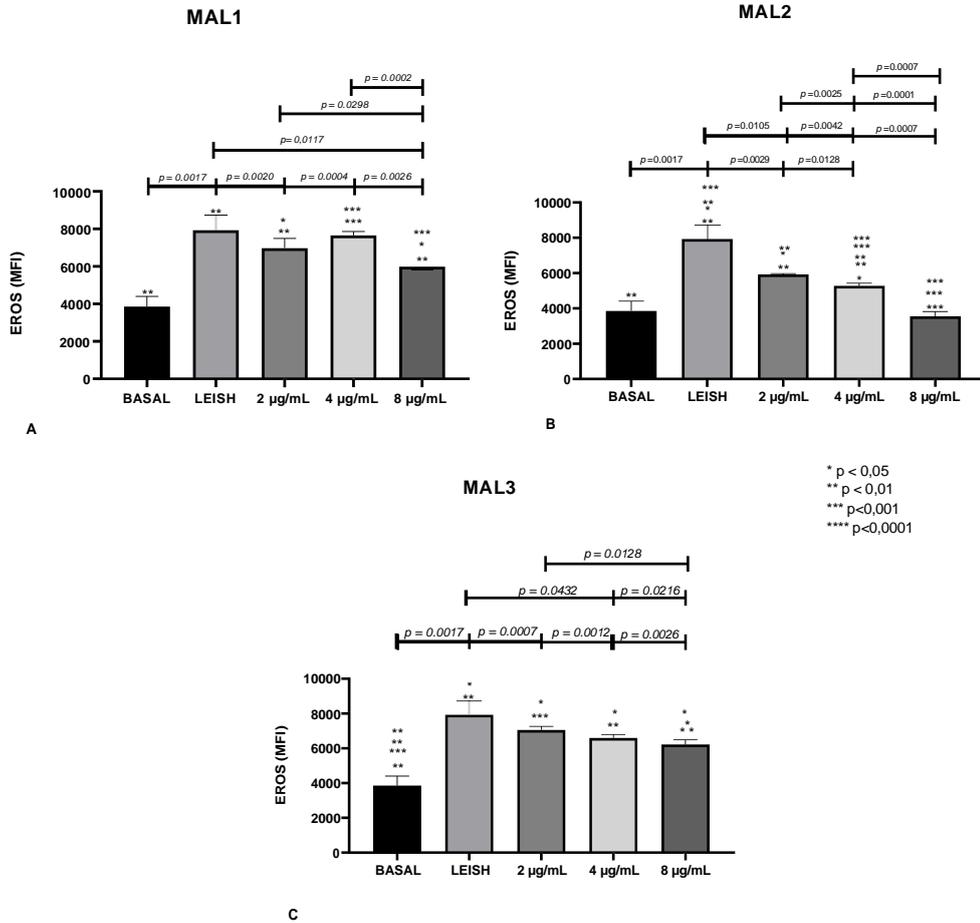
Após a infecção dos macrófagos com a *Leishmania*, há expressão da molécula de superóxido intracelular, que reage com a membrana fosfolipídica do parasito e aumenta sua permeabilidade, de modo a desnaturar as proteínas que constituem o material genético do parasito. O mecanismo de ação para alguns fármacos que agem sobre a leishmaniose pode estar relacionado aos eventos descritos anteriormente, como por exemplos os antimoniais pentavalentes (primeira escolha) e da anfotericina B (segunda escolha) (LIESE; SCHLEICHER; BOGDAN, 2008; SAHA; MUKHOPADHYAY; CHATTERJEE, 2011).

Diante da progressão do processo infeccioso, o processo de expressão de EROS é desativado, favorecendo a manutenção da vida intracelular do parasito da leishmania. Portanto, a análise da expressão de espécies reativas de oxigênio (forma de peróxido) gera indícios de um mecanismo redox dos compostos estudados (ELMAHALLAWY; ALKHALDI; SALEH, 2021).

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose ainda não possuem o mecanismo devidamente esclarecidos, porém o estudo conduzido por Siqueira (2014) tratou macrófagos infectados com *L. braziliensis* ( $p < 0,05$ ) com as concentrações de 1 e 10 mg/mL do Glucantime®, e observou que a molécula em questão foi capaz de aumentar significativamente a produção de EROs ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente) e esses resultados sugerem que este fármaco é capaz de ativar os macrófagos e o efeito redox pode contribuir para o mecanismo de ação.

Sendo assim, a partir da análise da figura 35, pode-se verificar o aumento significativo de espécies reativas de oxigênio entre o grupo BASAL (macrófago sem processo infectivo) e o grupo LEISH (macrófagos infectados), o que reforça a eficiência do processo infeccioso gerado.

Figura 35 - Espécies reativas de oxigênio – Série MAL



Legenda: A = MAL 1- MAL 1, B = MAL2 - MAL 2, C= MAL3 - MAL3. EROS: Espécies reativas de oxigênio Fonte: REIS, 2021.

Em relação ao composto MAL1 (figura 35A), percebe-se que a expressão de peróxido ocorreu de maneira significativa em todas as concentrações testadas. No entanto, ao comparar a amostra LEISH à maior concentração testada de MAL1, percebe-se que ocorreu uma diminuição na concentração de EROs, favorecendo a hipótese da ação destes compostos em concentrações mais baixas. Por fim, ao observar a significância entre as concentrações testadas, sugere-se um possível evento dose-dependente, uma vez que ocorreu redução nas concentrações de peróxido intracelular entre 2 e 8 µg/mL. Para o combate do agente lesivo, esta molécula possui viabilidade uma vez que apresenta expressão de EROS nas concentrações testadas de modo que possivelmente não ocorra dano celular ao macrófago durante o processo de combate do patógeno da Leishmania, esta

observação é possível a partir da análise do grupamento LEISH e as concentrações 2 e 4 que mantiveram um menor nível, porém maior que a concentração basal.

Com relação à figura 35B (MAL2), infere-se que há um aumento significativo na expressão de EROS nos grupos LEISH, 2 e 4 µg/mL, quando comparados ao BASAL, evento não observado em relação à maior concentração testada, levando-se em consideração a expressão de EROs verifica-se uma ligeira modulação positiva. Ao comparar os grupos tratados com a molécula MAL2 ao grupo LEISH, que representa macrófagos infectados e não tratados, percebe-se uma redução significativa nas concentrações peróxido em todas as concentrações analisadas, sugerindo um possível mecanismo de inibição da expressão desta espécie reativa em relação aos grupos tratados, com destaque ao grupo testado com a MAL2 = 8 µg/mL, possivelmente infere-se que a molécula não ativa a expressão de EROS em concentrações altas e provavelmente não age por este mecanismo, estando provavelmente vinculada a expressão de ERNS obtida no teste descrito anteriormente.

Por fim, diante dos resultados dispostos na Figura 35C (MAL3), nota-se um evento similar ao ocorrido nas demais moléculas da série MAL, verificando-se a presença de diferença significativa da expressão de EROS entre o grupo basal e o grupo LEISH e nas concentrações testadas da molécula MAL3. Ao analisar a quantificação de EROS entre o grupo LEISH e as concentrações testadas, verifica-se redução da quantidade de EROS a partir da concentração de 2 µg/mL. Em adição, ao traçar um paralelo entre os grupos testados, verifica-se redução significativa entre a concentração mais baixa (2 µg/mL;  $p = 0.0128$ ) e mais alta (8 µg/mL), o que pode ser positivo uma vez que existe a capacidade de aumentar EROS em menores concentrações podendo esta molécula ser um potencial agente antileishmania. Sendo assim, nota-se a presença de eventos redox, uma vez que, o EROS deve ser expresso de modo a não lesar a célula e a molécula exibe comportamento similar a MAL1 e ambas possuem modulação do EROs nas concentrações 2 µg/mL e 4 µg/mL favorecendo a diminuição do processo infectivo e provavelmente agindo por mecanismo redox.

Corroborando com os resultados previamente descritos, Sangenito et al. (2021) demonstram que o complexo bis (*N*-[4-(hidroxifenil)metil]-2-piridinemetamina) perclorato de zinco monohidratado 4 induziu a geração de EROS em todas as concentrações testadas, ou seja, age por mecanismo redox, porém, ao correlacionar

com o grupo infectado, apresentou queda na expressão de EROS, similar ao ocorrido na série MAL, provavelmente relacionado à inativação do parasito da leishmania por mecanismo intracelular de inibição da produção peróxido, que finda em induzir a diminuição da viabilidade celular.

Alguns resultados semelhantes também foram descritos por Sousa et al. (2019) que avaliou um derivado cloro-quinolínico (AM1009) frente a macrófagos infectados por cepas de *L. amazonensis* e identificou perfil citotóxico imunomodulatório, pela estimulação do estresse oxidativo nos parasitos e por promover alterações no ciclo celular da *Leishmania*. E ainda Bortoleti e colaboradores (2021), ao avaliarem a atividade antileishmania (*L. amazonensis*) e o possível efeito da molécula solidagenona (SOL) com potencial imunomodulador, identificou-se que os tratamentos com a molécula nas concentrações de 10 e 160  $\mu\text{M}$ , inibiram a proliferação promastigotas com  $\text{IC}_{50\text{PRO}} = 34,5 \mu\text{M}$  e após 24h de tratamento ocorreu a redução de TNF- $\alpha$  de modo a estimular o aumento de espécies reativas de oxigênio, além de induzir várias modificações celulares capazes de promover dano a membrana plasmática e por consequência morte do parasito.

Deste modo, estabelecendo um paralelo entre as MALs 1 e 3, verifica-se potencial destas moléculas a partir da expressão de mecanismo redox envolvendo EROs nas menores concentrações testadas, evento similar ao que ocorreu nos ERNs replicou-se para molécula MAL3. Então, verifica-se o potencial da série de imunomodular a expressão destas espécies reativas e deste modo busca-se entender a correlação entre as espécies reativas e a expressão das citocinas imunomoduladoras de resposta Th1 e Th2 para uma elucidação mais efetiva do provável mecanismo dos compostos estudados.

#### 5.2.5.3 Citocinas

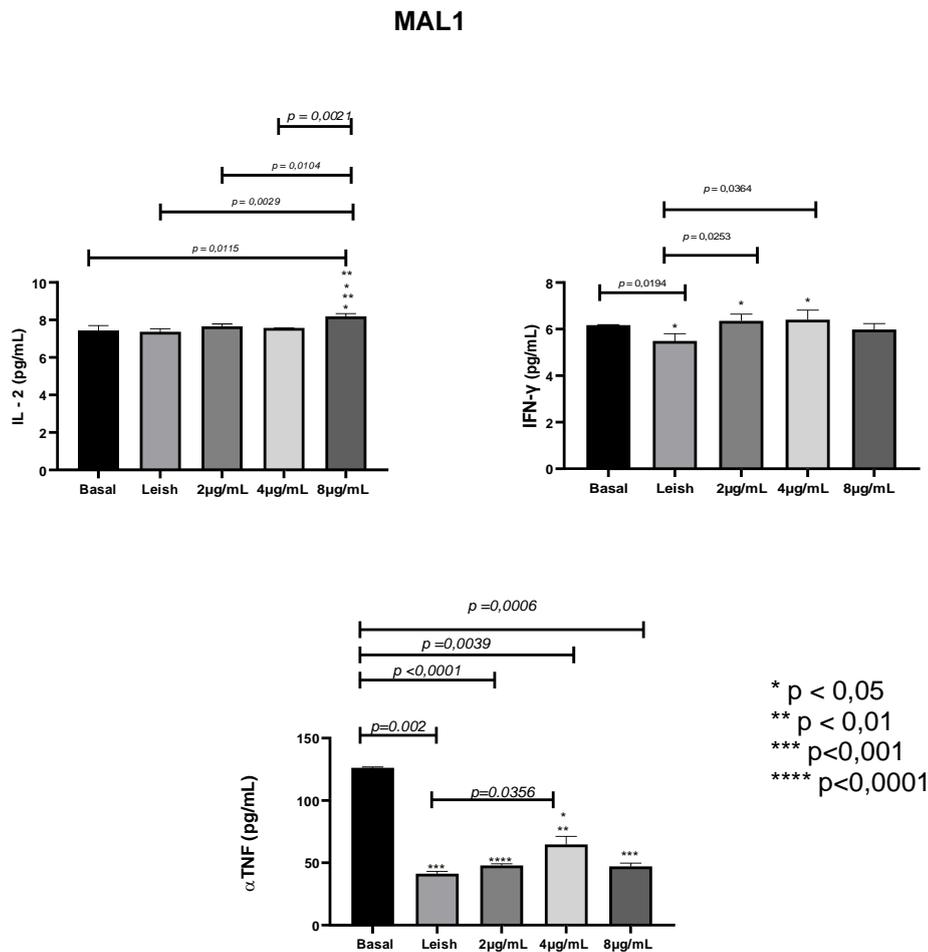
O desenvolvimento e progressão da leishmaniose surge a partir da resposta imunológica do hospedeiro em relação a presença do parasito. Então, a imunidade inata desempenha função importante sobre a diferenciação celular e por consequência caracteriza a modulação de citocinas que agem sob a progressão da infecção parasitária. Deste modo, o doseamento de citocinas é fundamental para o entendimento de como determinadas espécies químicas agem sobre os processos fisiológicos de combate ao agente infectante (SEYED; RAFATI, 2021).

Os perfis imunológicos do tipo Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e Th2 (IL-4 e IL-10) podem guiar os estudos para a compreensão de como determinadas espécies químicas modulam a resposta imunológica presente nos hospedeiros (ASSCHE, VAN et al., 2011).

Diante disso, os compostos da série MAL foram avaliados, nas concentrações 2, 4 e 8  $\mu\text{g/mL}$ , quanto a influência nas respostas imunológicas através da expressão de citocinas. O controle negativo utilizado foi o macrófago livre de infecção denominado BASAL e controle positivo foi o macrófago infectado denominado LEISH.

Os compostos foram avaliados a partir do tratamento de células infectadas com formas amastigotas de *L. amazonensis*. Os resultados obtidos para o perfil TH1 relativo à molécula MAL1 dispõe-se na figura 36.

Figura 36 - Avaliação da resposta imunológica Th1 através dos níveis de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  – composto MAL1.



Legenda: BASAL= macrófago não infectado, LEISH = macrófago infectado com *L. amazonensis*; 2, 4, 8µg/mL = concentração dos derivados acrínicos; MAL1 = MAL 1.

A resposta Th1 compõe um processo importante durante o desenvolvimento de aspectos relativos à resistência parasitária, uma vez que, a expressão positiva de citocinas aumentam a diferenciação macrofágica em células ativas Th1 (MIRZAEI et al., 2020; ELAMIN et al., 2021).

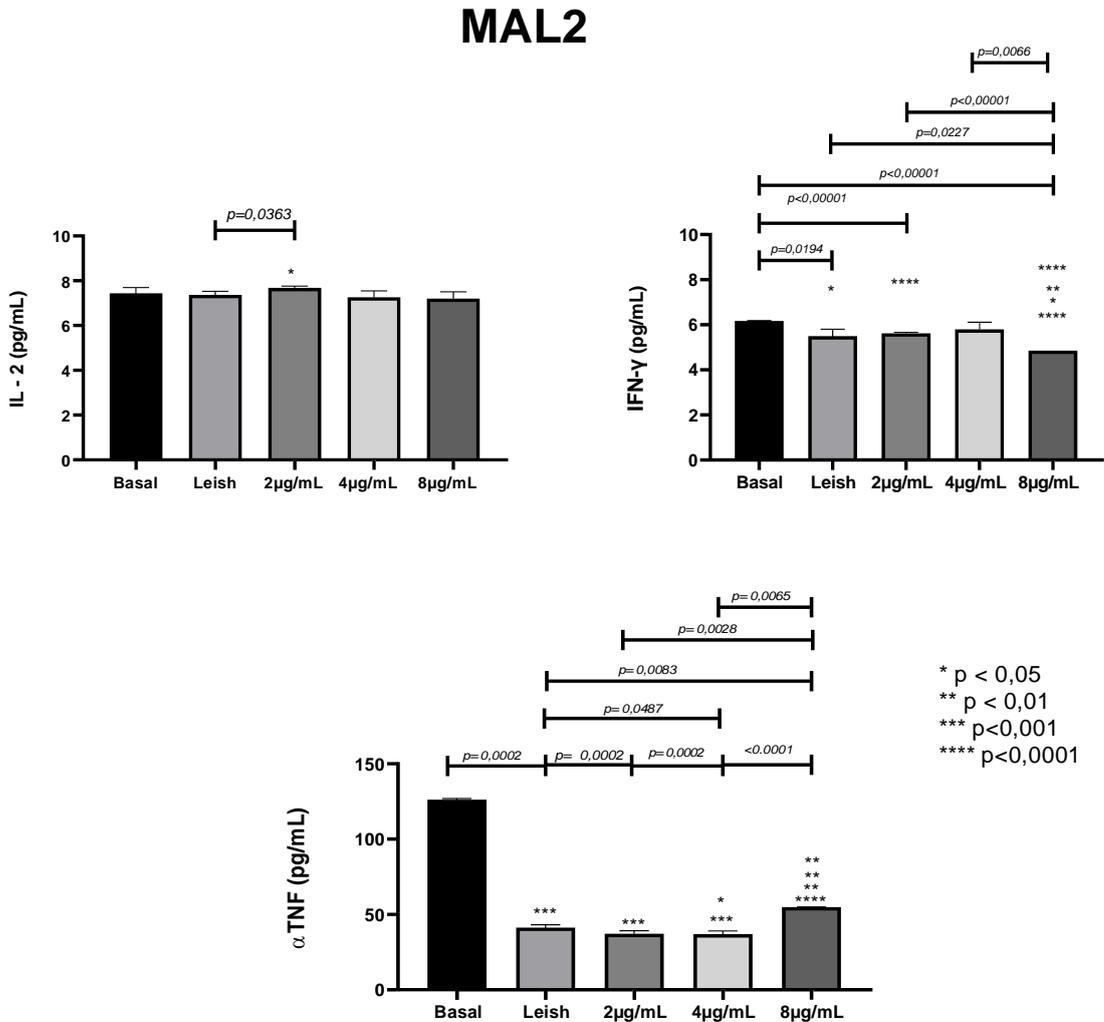
A partir da análise da figura acima, percebe que ocorreu a expressão positiva de IL-2 significativamente entre todos os grupos analisados (BASAL -  $p= 0.0115$ ; grupo LEISH -  $p=0,0029$ ; 2 µg/mL -  $p = 0,0104$  e 4 µg/mL -  $p=0,0021$ ) em relação a maior concentração testada - 8 µg/mL. O composto estudado parece modular positivamente a citocina IL-2, esta enzima é capaz de imunoregular ativação de linfócitos T durante o processo de infecção da leishmaniose. Acredita-se que uma repetição dos resultados, com maior número de replicatas e com mais concentrações poderia fornecer mais informações sobre a modulação desta citocina diante da molécula MAL 1.

Em relação ao perfil de liberação da citocina INF- $\gamma$ , nota-se uma diminuição significativa da concentração entre BASAL e LEISH, porém em relação aos macrófagos infectados e tratados obteve-se um aumento da expressão entre as concentrações de 2 µg/mL -  $p=0,00253$  e 4 µg/mL -  $p=0,0364$ . Este resultado é relevante pois o aumento da concentração desta citocina inicia-se os protocolos de liberação de espécies reativas de nitrogênio intracelulares para que seja possível a fagocitose do parasito, o que corrobora com o resultado previamente descrito obtido em ERNs (NÉRIS *et al.*, 2013; SEYED; RAFATI, 2021).

Por fim, em relação a concentração de TNF- $\alpha$  todos os grupos tiveram suas concentrações diminuídas em relação ao basal. Porém, ao correlacionar os grupos LEISH e concentração 4 µg/mL -  $p=0,0356$  é possível identificar aumento da concentração desta citocina. O TNF- $\alpha$  desempenha papel similar ao INF- $\gamma$  aumentam a atividade da NADPH oxidase e subsequentemente estimulado a produção de superóxido e oxigênio (ASSCHE et al., 2011). Então, nota-se que a molécula MAL1 apresenta uma modulação expressiva na 4 µg/mL -  $p=0,0356$  e similar ao ocorrido na expressão de INF- $\gamma$  e os resultados obtidos em EROS, sugere-se uma possível modulação das citocinas descritas gerando um controle na resposta parasitária intracelular.

Na figura 37, encontram-se os resultados obtidos a partir da excreção de citocinas imunomoduladoras presentes na resposta Th1 sob ação da molécula MAL2. No que tange a modulação de IL-2, não se obteve diferença da expressão desta interleucina em relação ao grupo BASAL, LEISH e nas concentrações testadas existindo um único evento representativo entre o grupo LEISH e a concentração testada de 2 µg/mL ( $p= 0,0363$ ) de modo a apresentar um discreto aumento na quantificação de IL-2. Provavelmente, a molécula não age sob a estimulação desta citocina.

Figura 37 - Avaliação da resposta imunológica Th1 através dos níveis de IL-2, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  – composto MAL2.



Legenda: 36 = BASAL= macrófago não infectado, LEISH = macrófago infectado com L. amazonenses, 2, 4, 8µg/mL concentração dos derivados acrínicos. MAL 2 - MAL 2

Em relação a citocina INF- $\gamma$ , verifica-se a diminuição da concentração obtida no grupo BASAL em relação ao grupo LEISH ( $p=0,0194$ ), seguido de diminuição entre o mesmo grupo e as 2  $\mu\text{g/mL}$  -  $p < 0,0001$  e 8  $\mu\text{g/mL}$  -  $p = 0,0066$ . Ao analisar os grupos LEISH e 8  $\mu\text{g/mL}$  -  $p = 0,0227$  obteve-se uma redução massiva da concentração desta citocina, bem como, evento similar ocorreu entre as concentrações testadas. E apesar de estimular ERNS, esta molécula não aparenta modulação específica e significativa desta citocina provavelmente por isso apresenta  $\text{IC}_{50}$  em amastigota de 35,93  $\mu\text{M}$ , com baixa seletividade e índice de infecção em torno de 21%.

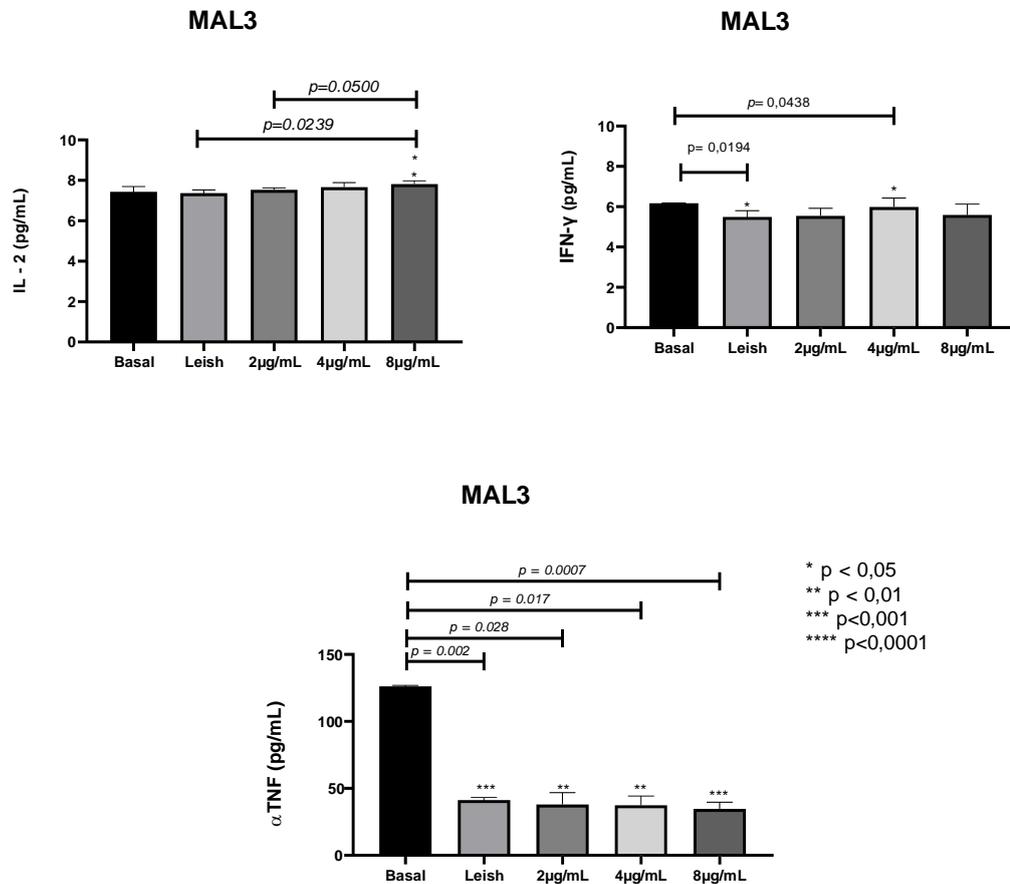
Ao traçar um paralelo entre a molécula de origem, ACS2 ( $\text{IC}_{50}= 13,79$ ), verifica-se que ocorreu uma diminuição significativa de atividade frente as cepas analisadas que pode estar relacionada a ausência da modulação nesta citocina. Em adição, a excreção de TNF- $\alpha$  foi reduzida significativamente a partir do processo infeccioso, quando comparado ao basal, em todos os grupos analisados. Porém, nota-se um aumento da expressão desta citocina ao correlacionar o grupo LEISH a concentração de 4  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,028$ ) e 8  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,0065$ ) sendo possível inferir que provavelmente ocorram eventos mais específicos em uma concentração maior que a testada.

Por fim, ao identificar os resultados relativos à expressão de citocinas imunomoduladoras Th1 referente a exposição dos tratamentos com MAL 3 (figura 38), verifica-se que a expressão de IL2 não foi significativa entre os grupos BASAL e LEISH e apresentou apenas dois eventos significativos, aumento discreto na concentração de IL-2 entre os grupos LEISH e 8  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,0239$ ) e entre as concentrações de 2  $\mu\text{g/mL}$  e 8  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,0500$ ).

A análise da expressão de INF- $\gamma$  apresenta-se com diminuição significativa entre BASAL e LEISH ( $p=0,0194$ ), seguida de aumento entre o grupo LEISH e 4  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,0438$ ). A expressão de TNF- $\alpha$  foi diminuída na presença todos os grupos testados e nenhum deles apresentou aumento significativo.

Apesar de modular positivamente as ERNS e EROs os resultados desta espécie química não foi conclusivo em relação ao aspecto de modulação de citocinas sendo necessário repetição do teste, com maior número de replicatas e com maiores concentrações a fim de avaliar tais efeitos, uma vez que, a molécula apresentou excelente efeito microbicida obtendo uma taxa de infecção na concentração de 32  $\mu\text{g/mL}$  de 4%

Figura 38 - Avaliação da resposta imunológica TH1 através dos níveis de IL-2, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  – composto MAL3.



Legenda: BASAL= macrófago não infectado, LEISH = macrófago infectado com *L. amazonensis*, 2, 4, 8 $\mu$ g/mL concentração dos derivados acrínicos. MAL 3 - MAL 3.

Os compostos tiofênicos acrínicos estudados demonstram uma modulação da resposta Th1, possuindo diferenças significativas para MAL1, 2 e 3 sob a IL-2, para o INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Com destaque para os compostos MAL1, MAL2 e MAL3 apresentaram aumento de concentração de INF $\gamma$ , com ação pró inflamatória, provavelmente facilitando a indução do processo de neutralização do parasito intracelular *L. amazonensis*.

Ao realizar a análise comparativa com a expressão de EROS e ERNS verifica-se um padrão de modulação para a MAL1 e MAL3, que além de agir sobre o aumento da concentração das espécies reativas ainda atua de maneira, mesmo que discreta, nas citocinas a IL-2 e INF- $\gamma$ . Este fato pode ser evidenciado pelos estudos publicados por Sousa (2019) que verificou que os perfis de liberação de citocinas quanto a

expressão INF $\gamma$ , como também possuiu correlação com a expressão de altas concentrações de nitrito a partir do tratamento com a molécula AM1009, comportamento similar ao que ocorreu com o composto MAL1.

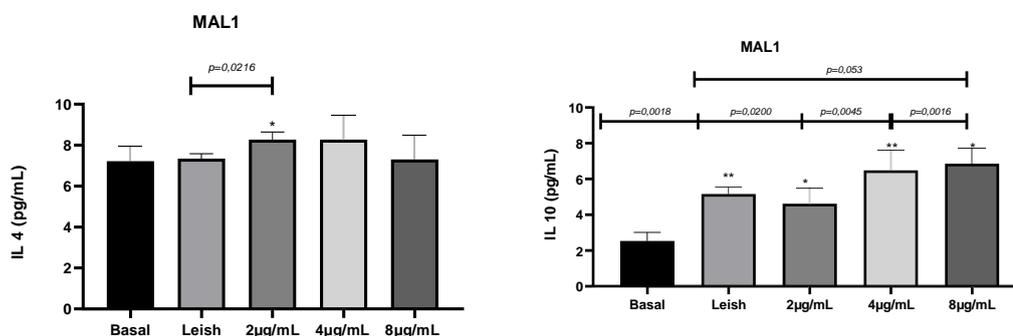
Ao identificar e analisar especificamente os perfis de liberação relativo a TNF- $\alpha$  identificou similaridade aos resultados encontrados para a série MAL e os ensaios imunomoduladores realizados por Dos Santos et al. (2017) que observou nos compostos derivados tiosemicarbazônicos obtiveram perfis de liberação de TNF- $\alpha$  uma redução expressiva entre o grupo basal e os grupos tratados. Notadamente, verifica-se sensibilidade no teste realizado e nos resultados obtidos.

Portanto, pode-se inferir que o composto que provavelmente apresenta modulação da resposta Th1 seria o composto MAL 1 e 3, uma vez que, além de expressar IL-2, INF- $\gamma$  e ainda modula discretamente a expressão de TNF- $\alpha$ . E em adição, verifica-se a correlação com a expressão de EROs e ERNs em macrófagos infectados com cepas de *L. amazonensis* desempenhando papel efetivo contra infecção diante das concentrações analisadas.

Como mencionado previamente, as citocinas IL-4 e IL-10 ao serem expressadas modulam a ativação dos macrófagos de modo a anular a ação de espécies como o IFN- $\gamma$  e caracteriza-se como resposta Th2 (WAKIL; WANG; LOCKSLEY, 1996). A IL-4 regula os mecanismos de sobrevivência, desenvolvimento, crescimento e diferenciação de linfócitos durante o processo infeccioso. Para a infecção ocasionada por *L. amazonensis* a interleucina 4 apresenta-se em grandes concentrações e atribui-se o surgimento da resposta clínica relativa a LC (VACAS *et al.*, 2020). Por fim, a IL-10 age de modo a suprimir a concentração de INF- $\gamma$  e apresenta-se como imunoativadora em infecções relativas a LV e quando suprimida pode facilitar a melhora do quadro clínico relativo a LC (OSERO *et al.*, 2020).

Então, a resposta Th2 foi avaliada a partir da quantificação das interleucinas 4 e 10, de modo a entender a relação com os compostos tiofênicos acrídnicos. Os resultados obtidos pela molécula MAL1 dispõe-se na figura 39.

Figura 39 - Avaliação da resposta imunológica Th2 através dos níveis de IL-4 e IL-10- MAL1.



Legenda: BASAL= macrófago não infectado, LEISH = macrófago infectado com *L. amazonensis*, 2, 4, 8µg/mL concentração dos derivados acrínicos. MAL 1 - MAL 1.

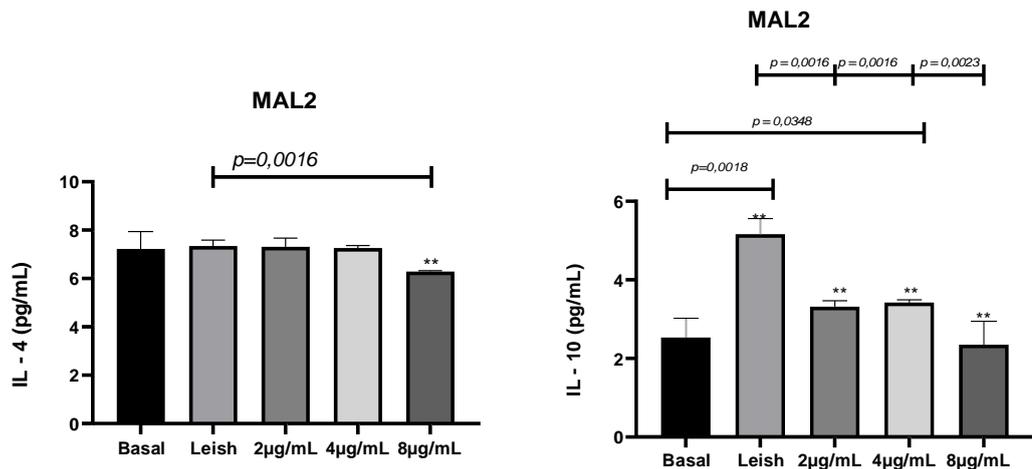
Diante dos resultados expostos na figura 39, nota-se que o composto não apresentou diferenças significativas entre os grupos testados, exceto ao correlacionar um aumento na excreção de IL-4 na concentração de 2 µg/mL. Em relação a excreção de IL-10, verifica-se um aumento significativo entre o basal e os demais grupos e apenas o grupo LEISH fortalecendo a hipótese de sucesso durante o processo infectivo e ainda a diminuição da IL-10 na concentração de 2 µg/mL e negativamente na concentração de 8 µg/mL com  $p= 0,063$ , de modo a aumentar a expressão de IL-, 10 portanto reafirma-se o fato deste composto possui ação potencial com baixas concentrações e corrobora com os resultados obtidos na modulação das respostas Th1 descritas anteriormente.

Em relação aos resultados de expressão de IL-4 e IL-10 para o composto MAL2, nota-se a partir da análise da figura 40, que para IL-4, não há diferença significativa entre os grupos BASAL, LEISH e nas concentrações 2 e 4 µg/mL, sendo significativo a redução apenas em 8 µg/mL com  $p= 0,0016$ .

Em relação a IL-10, o cenário foi completamente distinto, obteve-se uma alteração massiva na excreção de IL-10 entre macrófagos sem infecção (basal) e o grupamento infectado (LEISH,  $p=0,0018$ ). Em relação ao grupamento LEISH e as concentrações testadas, obteve-se redução da excreção de IL-10 em todas as amostras de modo a ser possível identificar uma modulação positiva do composto em auxiliar na redução da expressão desta citocina no processo infectivo favorecendo o combate ao parasito. Ao traçar um paralelo em relação a resposta Th1, apesar da modulação ter sido discreta infere-se um potencial imunomodulador desta espécie

química, sendo assim, necessário a repetição dos testes com maior n e maiores concentrações.

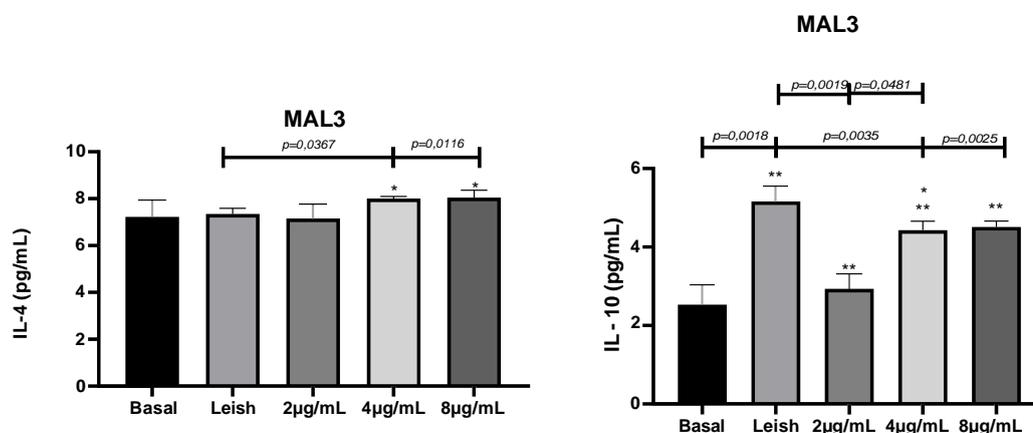
Figura 40 - Avaliação da resposta imunológica TH2 através dos níveis de IL-4 e IL-10 – MAL2.



**Legenda:** BASAL= macrófago não infectado, LEISH = macrófago infectado com *L. amazonenses*, 2, 4, 8µg/mL concentração dos derivados acrínicos. MAL 2 - MAL 2.

Por fim, a análise do composto MAL3 (figura 41) demonstrou um aumento na expressão de IL-4 ao analisar o grupo LEISH e as concentrações 4 µg/mL ( $p=0,00367$ ) e 8 µg/mL ( $p=0,0016$ ) o que seria desfavorável para a resposta inflamatória e progressão dos sinais clínicos gerados pela cepa de *L. amazonensis*. Porém em relação a IL-10, nota-se uma diminuição significativa entre o grupo BASAL e LEISH, evento similar ao que ocorreu nos demais compostos da série, com queda expressiva e significativa 2 µg/mL ( $p=0,019$ ) reafirmando os testes imunoativadores da resposta TH1, sendo esta molécula potencial em pequenas dosagens.

Figura 41 - Avaliação da resposta imunológica Th2 através dos níveis de IL-4 e IL-10 – MAL3.



Legenda: BASAL= macrófago não infectado, LEISH = macrófago infectado com *L. amazonenses*, 2, 4, 8µg/mL concentração dos derivados acrínicos. MAL 3 - MAL 3.

Os resultados obtidos foram similares ao obtido por Rodrigues et al. 2018 que expos o compostos SB-83 a um processo de infecção *in vivo* e avaliou a expressão de citocinas nos nódulos linfáticos do animal. A partir dos resultados evidenciou-se que o composto derivado da classe dos 2-aminotiofenos possui modulação por aumento da excreção de citocinas está correlacionada com a síntese de IFN- $\gamma$  para controle de lesões e carga parasitária e diminuição da resposta em citocinas reduzindo a IL-10 na maior concentração testada.

Diante do exposto, pode-se inferir que as moléculas MAL1, MAL2 e MAL3 atuam diminuindo a expressão de IL-10, porém pouco pode-se relacionar a expressão de IL-4 sendo sugerido a repetição destes ensaios.

Os resultados obtidos corroboram com os ensaios de EROS, ERNS e mediadores Th1, com enfoque no composto MAL3 que apresentou melhores perfis de imunomodulação, desde a redução da taxa de infecção a 4% a expressão imunoativadora de ERNS, EROS, IL-2, INF-y e discreta ação em  $\alpha$ TNF. E ainda, um importante resultado foi a diminuição de IL-10. E apesar de não demonstrar significância estatística pelo gráfico, a IL-4 parece diminuir a expressão potencial na concentração de 2 µg/mL, porém deve-se realizar repetição do teste para melhores resultados.



leishmania. Este projeto, aliado à descoberta dos mecanismos metabólicos envolvidos exclusivamente nestes microrganismos, estando ausentes no hospedeiro, direcionam o caminho para identificação de moléculas terapeuticamente viáveis e específicas (CONCHON-COSTA *et al.*, 2018; ORTALLI *et al.*, 2018). A ancoragem molecular surge como ferramenta preditiva ao simular a interação entre fármaco e receptor em uma determinada macromolécula. Utiliza como método indicativo de análise, a energia de ligação que avalia os fenômenos críticos envolvidos no processo de reconhecimento intermolecular. Considera-se o *docking* molecular uma ferramenta importantíssima para descoberta de compostos promissores para atividade antileishmania (FERREIRA, 2015; SHAHEEN *et al.*, 2020).

Diante do exposto, neste estudo buscou-se a análise de ancoragem molecular a partir de enzimas ligadas diretamente ao metabolismo, constituição e crescimento do parasita, a fim de testar o potencial dos derivados acrídnicos frente aos seguintes alvos biológicos elencados como fundamentais do gênero *Leishmania*, de modo a determinar a orientação e conformação (pose) do ligante (composto candidato a fármaco) junto ao sítio ativo de uma macromolécula alvo, permitindo verificar a afinidade entre eles, bem como observar os resíduos envolvidos e os seus tipos de interação na formação do complexo ligante-receptor (RIBEIRO, 2018).

#### 5.3.1.1 *Docking molecular em alvos de leishmania para classe dos derivados tiofênicos acrídnicos*

O processo de *docking* molecular foi realizado para identificar as possíveis interações entre os alvos biológicos (Tripanotiona redutase – TR e 14- $\alpha$ -Esterol-Desmetilase - 3L4D), os mapas estão dispostos no APÊNDICE N e O. Os resultados relativos a complexação com TR encontram-se descritos na Tabela 10 e o ligante co-cristalizado foi o conhecido como FAD (flavina adenina dinucleotideo). O RMSD REF.: 1.53 Å, demonstrando a confiabilidade na reprodução dos resultados.

Tabela 10 - Energia de ligação para o alvo biológico - 2JK6 – Tripanotiona redutase - *L. infantum*

MOLÉCULA	ENERGIA DE LIGAÇÃO	CONST. DE AFINIDADE (KI)
MAL1	-12.04 Kcal mol <sup>-1</sup>	1.5 nM
MAL2	-11.22 Kcal mol <sup>-1</sup>	5.99 nM
MAL3	-9.77 Kcal mol <sup>-1</sup>	69.43 nM
FAD	-2.35 Kcal mol <sup>-1</sup>	19.04 mM

Fonte: REIS, 2021.

A enzima tripanotiona redutase (TR) relaciona-se ao metabolismo redox dos tripanossomídeos sendo crucial na defesa contra o estresse oxidativo. Quando inibida, gera processos apoptóticos de maneira seletiva ao parasito, pois, nos mamíferos, a macromolécula que realiza o metabolismo oxidativo é a glutatona (FLOHÉ, 2012).

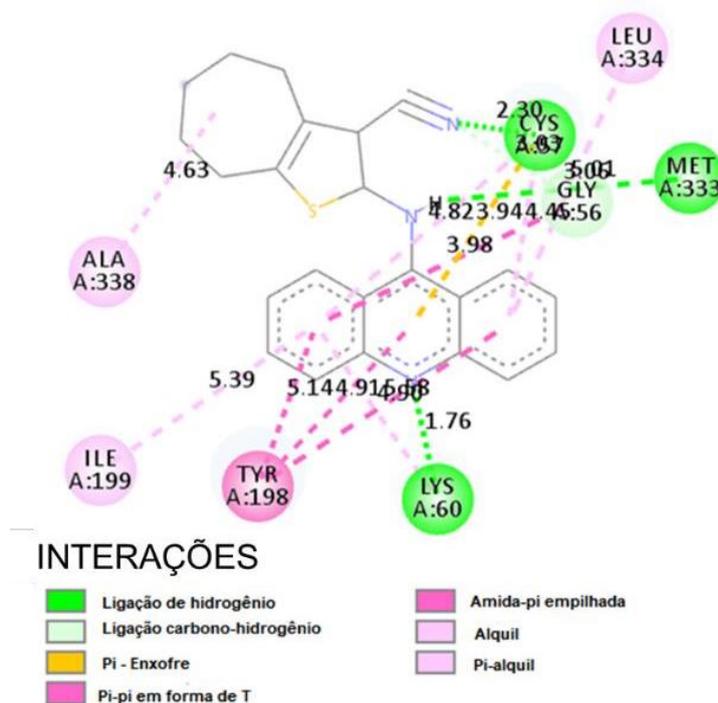
Deste modo, considera-se a TR a principal via de inibição, que está possivelmente relacionada ao mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio. Portanto, corresponde a um dos principais alvos moleculares para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (ORTALLI et al., 2018).

Diante da importância farmacológica desse alvo, foi realizado o *docking* molecular para a enzima tripanotiona redutase (TR) a partir da estrutura co-cristalizada obtida no banco de dados PDB (PDB id = 2JK6).

Como demonstra a tabela 10, todos os derivados acrídnicos que contém o núcleo tiofênico analisados frente a TR, apresentam energia de ligação (energia perdida pelas moléculas quando ocorre o acoplamento entre o ligante e a macromolécula) negativa, sendo um indicativo de afinidade e estabilidade da formação do complexo com TR. Todos os compostos analisados apresentaram perfis de interações superior ao ligante co-cristalizado e as energias de ligação para esses compostos variaram entre -9,77 e -12,04 kcal.mol<sup>-1</sup>. O composto com menor energia de ligação e, conseqüentemente, mais passível de formar um complexo mais estável com a TR, foi a MAL1, com energia de ligação igual a -12,04 kcal.mol<sup>-1</sup>. sendo possível verificar os mapas dos ligantes dos compostos na figura 43 com constante de

afinidade de 1.5 nM indicando melhor afinidade com o ligante que os demais compostos.

Figura 43 - Mapa de ligação 2D – MAL1 (PDB id = 2JK6).



Fonte: REIS, 2021.

Tal como indica o mapa do ligante 2D (figura 43) para a MAL1, a molécula que apresentou melhor resultado frente a complexação com a tripanotona redutase, nota-se que esse derivado acrídínico apresenta interações convencionais de hidrogênio com os aminoácidos: LysA60-1,76 Å; MetA333 – 4,82 Å; CYS63 – 2,30 Å, tais ligações complexam-se entre as moléculas de nitrogênio presente no composto e parece indicativas de estabilidade do complexo molécula-ligante.

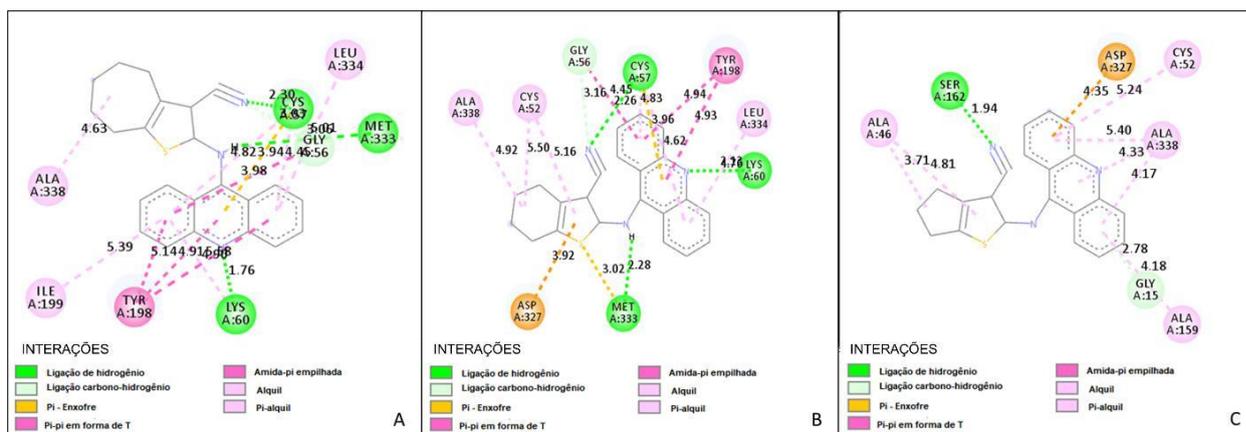
As demais ligações apresentadas são: Ligações pi-pi em forma de T, com os resíduos de aminoácidos TyrA198 – 5,44 Å; 4,91 Å; 4,90 Å com o núcleo acrídínico e a ligações alquílicas com os resíduos IleA199- 5,39 Å; AlaA338 - 4,63 Å, seguida das ligações de sulfeto com a CYS63 e a ligação amida pi- empilhada com LEUA334 – 5,01 Å.

Os estudos realizados por Nunes et al., 2021 avaliaram a molécula curzerene com o alvo Tyr (2JK6) com energia de ligação de  $-3.28 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . Os autores observaram que esta espécie química inativa a macromolécula na porção Tyr198 por

interações hidrofóbicas, este mesmo bloqueio foi identificado no composto MAL1, porém, a energia de ligação foi de  $-14,04 \text{ kcal.mol}^{-1}$  e a interação foi do tipo Ligações Pi-pi em forma de T, estando a MAL 1 provavelmente inibindo mais que a curzerene.

Em adição, a partir da análise estrutural e dos mapas dos ligantes (figura 44) dos compostos pertencentes a série MAL observa-se mesmo com algumas semelhanças estruturais entre os compostos, diferindo apenas os cicloalquil ligado ao anel tiofênico, as moléculas possuem apenas uma ligação alquil com aminoácido ALA-A338 -  $4,63 \text{ \AA}$  (MAL1);  $4,92 \text{ \AA}$  (MAL2) e  $4,33 \text{ \AA}$  (MAL3)  $\text{\AA}$ , e as demais ligações promovem mudanças significativas com resíduos de aminoácidos complexados a partir da interação com a macromolécula supracitada gerando diferenças significativas entre as energias de ligação e as constantes de afinidade. Porém, a molécula MAL1 assume posição conformacional diferente das demais, o que justificaria diferenças em relação a atividade biológica deste composto.

Figura 44 - Mapa de ligação 2D – MAL1, MAL2 e MAL3 (PDB id = 2JK6)



Legenda: A: MAL1; B: MAL2 e C: MAL3. Fonte: REIS, 2021.

A partir das análises dos aminoácidos relativos à macromolécula tripanotona redutase e as espécies químicas, verifica-se a ausência da complexação da MAL3 com o sítio de bloqueio Tyr198 favorecendo a hipótese de que esta molécula não atua diretamente no alvo biológico e sim na modulação do metabolismo celular do macrófago. Provavelmente a presença do grupamento tiol favoreceu a conformação estável com a macromolécula. Ao analisar os compostos MAL1 e MAL2 nota-se similares complexações com os seguintes aminoácidos TYR A198 – MAL 1 E 2 (pi-pi em forma de T, presente no anel acridínico – fundamental ao bloqueio do sítio de ação), GLYA56 ligação carbono-hidrogênio e por fim, ligação de hidrogênio com o

resíduo CYS57. As demais moléculas da MAL possuem similaridade de ligações aos resíduos de aminoácidos justificando o fato de possuírem energias de ligações próximas e uma provável sobreposição no alvo estudado.

Em concordância com os dados descritos, o ensaio conduzido por Rodrigues (2015) com derivados 2-amino-tiofênicos apresentou interações hidrofóbicas importantes com os resíduos Gly11, Gly13, Val36, Ala159, Thr160 e Asp327, que possuem a função de estabilização do complexo parasita-hospedeiro. Ao identificar as ligações entre molécula-ligante verificou-se uma similaridade a partir da ligação entre o grupamento tiofênico, presentes na MAL 2 e 3, com o resíduo de aminoácido ASP327 com ligação do tipo pi-enxofre cuja distância foi de 3,92 Å e 4,35 Å, respectivamente.

O desenvolvimento de novas moléculas ativas baseia-se na busca pela obtenção de fármacos *multitarget*, portanto, a análise em outra macromolécula envolvida em aspectos metabólicos do parasita torna-se imprescindível. Então, analisou-se as espécies químicas na macromolécula 14-alfa-desmetilase de esterol que está relacionada com a biossíntese do ergosterol, atua de modo a induzir a catálise enzimática de lanosterol sintase realizando a remoção do grupamento metila no carbono 14 do lanosterol, e dando seguimento a via de síntese do ergosterol que está intimamente ligado ao crescimento e viabilidade celular dos parasitas do gênero *leishmania* (MELO et al., 2016).

Portanto, a **CYP51** possui importância para a sobrevivência, proliferação e capacidade infectante dos patógenos envolvidos na leishmaniose e por consequência a inibição desta enzima promove mecanismos de morte e perda de função no parasita (EMAMI; TAVANGAR; KEIGHOBADI, 2017).

Sendo assim, o presente estudo viabilizou a interação **entre CYP51** e os derivados tiofênicos acrídnicos. Os resultados estão descritos na tabela 11. Pode-se observar que as energias de ligação variaram entre -10,88 e -9,61 Kcal.mol<sup>-1</sup>, as constantes de afinidade apresentaram-se entre 4.47 nM e 23.59 nM. O ligante fluconazol possuiu energia de ligação de -7.2 Kcal mol<sup>-1</sup> e constante de afinidade de 5.28 µM. O *redocking* foi realizado e apresentou-se com RMSD REF.: 1.10 Å, demonstrando a confiabilidade na reprodução dos resultados.

Tabela 11 - Energia de ligação para o alvo biológico - 3L4D – 14- $\alpha$ -desmetilase de esterol - *L. infantum*

MOLÉCULA	ENERGIA DE LIGAÇÃO	CONST. DE AFINIDADE (KI)
MAL1	-11.39 Kcal mol <sup>-1</sup>	4.47 nM
MAL2	-11.04 Kcal mol <sup>-1</sup>	8.14 nM
MAL3	-10.41 Kcal mol <sup>-1</sup>	23.59 nM
FLUCONAZOL	-7.2 Kcal mol <sup>-1</sup>	5.28 $\mu$ M

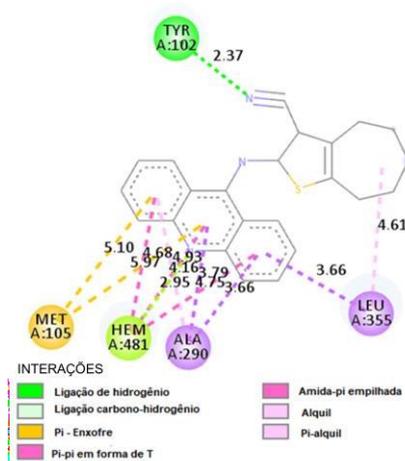
Fonte: REIS, 2021.

A molécula mais estável no sítio de ligação é a MAL1 com energia de ligação de -11,39 Kcal.mol<sup>-1</sup>, seguido da MAL2 que possui energia de ligação de -11,04 Kcal.mol<sup>-1</sup>, com constante de afinidade de 4.47 nM e 8.14 nM, respectivamente. Todas as moléculas estudadas apresentaram-se com melhor perfil de interação em relação ao ligante fluconazol.

Em relação ao mapa 2D e 3D (Figura 45) correspondente ao composto MAL1, nota-se a presença de interações estéricas com os resíduos de MET A:105, com ligação pi-enxofre a uma distância de 5.10 Å e 5.197 Å; ligação de hidrogênio com grupo HEM A:481, com distância de ligação de 2.95; ALA A:290 e LEU A:355 (3.66 Å e 4.61 Å – anel acrídinico), que caracteriza-se por ligação Pi-pi em forma de T (3.66 Å – anel acrídinico e 4.61 Å – cicloheptano). E, por fim a TYR A:102 a uma distância de 2,37 Å.

Emami et al. (2017) descreve o sítio de ação da CYP51 contendo um grupamento heme central, sendo este ligado a fração tiol da cisteína (Cys422) e menciona cinco resíduos de aminoácidos que suportam os propionatos presentes no anel da porfirina de modo a desempenharem relevância na função desta enzima, são eles: Tyr-102, Tyr-115, Arg123, Arg-360 e His-420. Ao analisar o mapa 2D da MAL 1, pode-se identificar um do resíduo citado (Tyr-102) que realiza interações estéricas com o sítio, portanto interagindo de forma efetiva com o ligante complexado.

Figura 45 - Mapas do ligante 2D– MAL1 no sítio de ligação **CYP51**



Legenda: A: Mapa 2D MAL 1: MAL 1. Fonte: REIS (2021)

Corroborando os resultados descritos acima, Rodríguez-Hernandez et al. (2017) conduziram estudos com os  $\beta$ -compostos derivados 1,2,3-triazólicos. O estudo complexou as moléculas obtidas com o sítio de ligação **CYP51** e identificaram os resíduos de ligação próximo ao sítio ativo (cofator heme), atribuindo-os a capacidade de alterar a conformação do sítio e, por consequência, a inibição das enzimas. Um evento similar ocorre com a molécula MAL1, de modo que existe uma similaridade entre os resíduos citados, sendo eles: MET A:105 e HEM A:481 sendo possível supor um poder de interação desta molécula.

Portanto, pode-se inferir que as moléculas MALs 1 apresentaram-se com interações estáveis com os alvos TR e CYP51, classificando-a com um perfil *multi-target*. Porém, esta molécula não apresenta ação imunomoduladora e provavelmente o mecanismo está vinculado a ação do parasita de maneira direta podendo assim ser justificado pelo perfil antiprostatigota 9,56  $\mu$ M. E, IC<sub>50</sub> em amastigota de 27,44  $\mu$ M com índice de seletividade de 1,63.

Em relação aos resultados nos alvos analisados a respeito da molécula MAL3, faz total sentido a ausência de ativação, uma vez que, tal molécula possui ação imunomoduladora sob o macrófago e não ação direta sob a cepa.

Sendo assim, as moléculas analisadas apresentaram-se com potenciais efeitos antileishmania, seja por ação direta ao patógeno ou por mecanismos imunomodulatórios.

### 5.3.2 Farmacocinética *in silico*

Durante o delineamento de uma molécula promissora o fármaco ideal deve ser potente, capaz de ultrapassar barreiras biológicas em concentração adequada para exercer o efeito farmacológico durante tempo suficiente para o cessamento de eventos patológicos, de modo a não ocorrer toxicidade (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Tais eventos compreendem as etapas da farmacocinética, que são: Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção. Posteriormente deve-se analisar a capacidade da molécula promissora de gerar toxicidade frente ao organismo biológico tratado (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

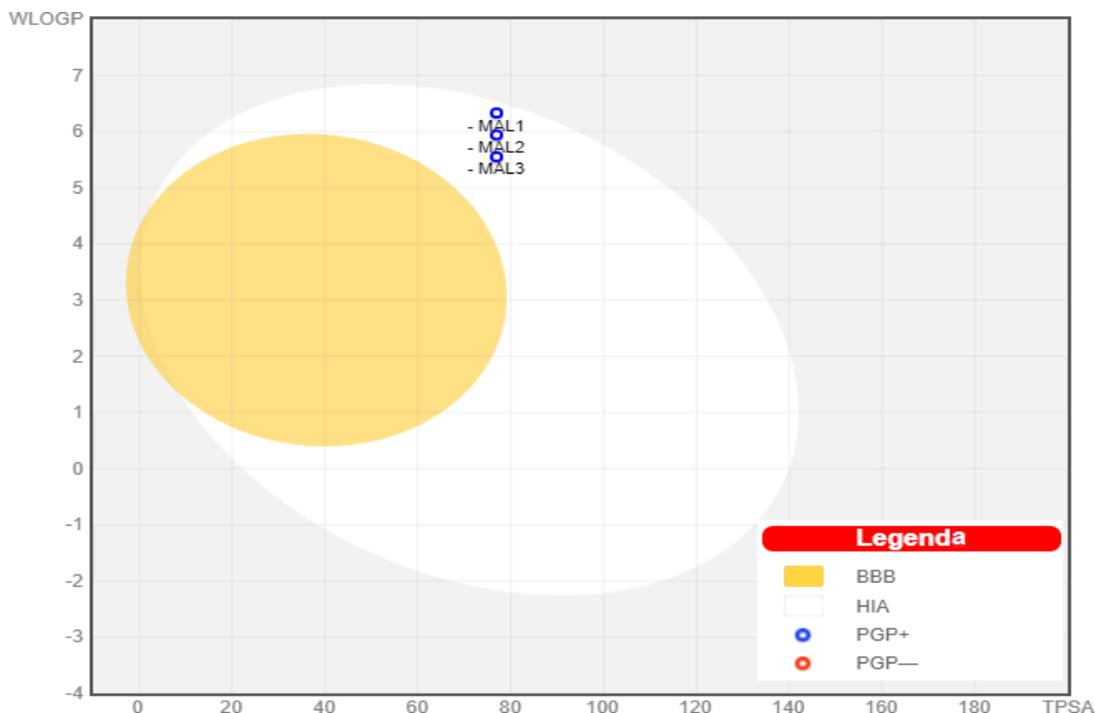
O alto custo proveniente de ensaios farmacocinéticos *in vitro* e *in vivo*, além da facilidade da execução de ferramentas computacionais preditivas fazem com que ganhe espaço na busca de moléculas promissoras o uso de programas que traçam os perfis farmacocinéticos *in silico*, como por exemplo, *swiss.adme* e *pkCSM*, ambos gratuitos e de livre acesso ao público (JIA *et al.*, 2020; WATERBEEMD, VAN DE; GIFFORD, 2003).

Diante disso, analisou-se os compostos tiofênicos acrídnicos da série MAL com as ferramentas preditivas supracitadas. O presente estudo procedeu com as análises *in silico* relativas aos fatores presentes em todas as etapas da farmacocinética e ainda alguns parâmetros relativos ao estudo preditivo da toxicidade.

O primeiro parâmetro analisado foi o diagrama *boiled egg*, que corresponde a um método de estimativa que avalia a permeação passiva intestinal e o acesso à região cerebral. A área amarela corresponde à barreira hematoencefálica (BHE), a área branca representa a capacidade de absorção no trato gastrointestinal (TGI) e área cinza representa a ausência de afinidade pelas barreiras BHE E TGI.

Além disso, é possível prever as moléculas que serão substratos da glicoproteína P, representadas em azul (Pgp+) e aquelas que não conseguem a complexação para formação de substrato encontram representadas como Pgp-, representadas em vermelho (DAINA; ZOETE, 2016).

A partir da análise do diagrama disposto na **Figura 43**, verifica-se que os compostos MAL1, MAL2, MAL3 apresentam uma alta taxa de absorção no trato gastrointestinal (TGI), representado graficamente na área branca. Com representação numérica superior a 93,38%.

Figura 46 - *Boiled egg* – série MAL

Fonte: adaptado de SwissADME (2021). Legenda: BHE = barreira hematoencefálica; TGI = trato gastrointestinal; P-gP (+) = substrato da glicoproteína P; P-gP (-) = não substrato da glicoproteína P.

A PGp classifica-se como uma glicoproteína de permeabilidade transmembranar, cuja função é a de participar em processos de efluxo celular. O estudo desta proteína busca driblar esses processos inibindo-a, favorecendo o combate à resistência intracelular de fármacos (FINCH; PILLANS, 2014; RAGHAVA; LAKSHMI, 2012). No organismo da *Leishmania* está presente na subfamília ABCB e genes similares aos expressos em mamíferos. A função desta está vinculada ao fornecimento de energia para a remoção de moléculas citotóxicas presentes no parasita. Desta forma, moléculas capazes de inibir a PGp do parasita, favorecem a diminuição da infecção intracelular presente na leishmaniose (CORTÉS-SELVA *et al.*, 2005).

Os resultados das análises dos compostos da série MAL serem visualizados na Figura 44. Sendo assim, pode-se verificar que os tiofênicos acrídnicos, representados por pontos em azul, apresentam-se como substrato da glicoproteína P (PGp) com isso pode sofrer uma forte influência farmacocinética diminuindo a concentração no interior da célula ou do parasita. Em complemento, os resultados obtidos a partir da análise preditiva computacional pkCSM<sub>2</sub> disponíveis na tabela 10,

comportam-se como substratos e inibidores, o que favorece a tese de moléculas promissoras para ensaios biológicos.

Na Tabela 12, observa-se os resultados relativos a parâmetros vinculados aos processos de absorção e distribuição, verificando-se que a taxa de absorção no TGI de todos os compostos é superior a 93%, além disso, nenhuma molécula da classe dos tiofênicos acrídnicos viola as regras de *Lipinski* e *Veber*, fortalecendo a teoria de que estes compostos possuem viabilidade para administração por via oral.

Tabela 12 - Parâmetros preditivos relacionados ao processo de absorção e distribuição dos compostos tiofênicos acrídnicos.

ABSORÇÃO E DISTRIBUIÇÃO									
MOLÉCULA	%TGI	BHE	Veber	<i>Lipinski</i>	Substrato P-gP	Inibidor P-gP I	Inibidor P-gP II	Perm. Caco-2	PC (logKp)
MAL1	94.04	NÃO	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	0,98	-2,725
MAL2	93.50	NÃO	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	0,952	-2,735
MAL3	93.38	NÃO	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	0.951	-2.734

Legenda: BHE: Barreira Hematoencefálica; PC: Permeabilidade Cutânea (logKp); Subs. GlicoP: Substrato glicoproteína P; Permeação Caco-2 (LogPapp) – **Fonte:** REIS, 2021.

As células Caco-2 (células de adenocarcinoma colorretal humano) são utilizadas em modelos *in vitro* e *in silico* para o estudo de permeação celular, pois simulam os enterócitos humanos devido à similaridade morfofisiológicas, podendo ser estabelecido uma correlação com a absorção intestinal humana (PHAM-THE *et al.*, 2016).

O estudo *in silico* de células Caco-2 norteia a possibilidade de otimizar os candidatos promissores, levando em consideração aspectos quanto a permeabilidade celular, biodisponibilidade e classificação dos candidatos a fármaco em sistemas de classificação biofarmacêuticos (PHAM-THE *et al.*, 2018). Para análise de parâmetros referente a permeação da Caco-2, infere-se os seguintes limites descritos na tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros para predição de permeabilidade em células CACO-2.

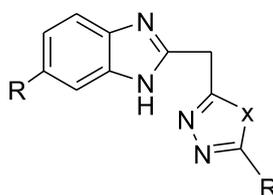
PERMEABILIDADE	PARÂMETRO
BAIXO	$P_{app} < 0,7 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$
MODERADO	$P_{app} = 0,7 - 16 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$
ALTO	$P_{app} \geq 16 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$

Fonte: PHAM-THE et al., 2018.

A partir dos resultados presentes na tabela 13, nota-se que os derivados tiofênicos-acrídnicos possuem perfis de permeação em células Caco-2, variando de 0,95 a 0,98, classificando-se como **ordem moderada**, nota-se à similaridade entre os membros da classe, parcialmente atribuída similaridade química. Portanto, podemos correlacionar também a alta taxa de absorção intestinal dos compostos fortalecendo a hipótese que possuem bom perfil de absorção oral.

O estudo conduzido por Phadke, Somani e Pathak (2020) que avaliou novos derivados benzimidazólicos (figura 44), observou que os compostos nitrogenados estudados apresentaram permeabilidade moderada e ainda aspectos de adequada absorção gastrointestinal, com taxa de 89% a 98%, nenhum deles sendo capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE). Desta forma, podemos supor que compostos dotados de heterocíclicos de nitrogênio, como os derivados tiofênicos acrídnicos sejam viáveis para administração oral a partir dos resultados *in silico* descritos.

Figura 47 - Derivados benzimidazólicos – compostos nitrogenados



R = H, NO<sub>2</sub>, Cl; R<sub>1</sub> = -SH, SCH<sub>2</sub>COOH; NH<sub>2</sub>; X = O, N.

Fonte: PHADKE; SOMANI; PATHAK, (2020)

A permeabilidade cutânea caracteriza-se como a quantidade de fármaco que penetra o estrato córneo capaz de ser absorvida. Nos ensaios *in silico* os dados

obtidos traduzem critérios farmacocinéticos relacionados a absorção e distribuição à via de administração transdérmica (CHEN, C. P. *et al.*, 2018).

Os autores Edwards & Langer (1994), mencionam que quanto mais negativo é o  $\text{Log } K_p$  menor é a capacidade de permeação. Este método consiste em correlacionar o peso molecular ao  $\text{Log } P$  do composto.

A partir da análise da tabela 10, nota-se que os compostos possuem baixa capacidade de permeação, com taxas de  $\text{Log } K_p = -2,725$  a  $-2.735$ . Porém, tomando como bases a paramomicina, fármaco incluso para de leishmaniose cutânea que possui  $\text{Log } K_p = -2.735$ , infere-se que a taxa de  $\text{Log } K_p$  é similar a todos os compostos derivados tiofênicos acrídnicos descritos e, dessa forma, a capacidade de permeação de tais compostos enfatiza o caráter promissor para a classe previamente descrita e ainda pode-se modular aspectos de permeação a partir da incorporação em formas farmacêuticas com alto índice de liberação *in loco*, como por exemplo, nanoemulsões.

Em adição aos estudos farmacocinéticos preditivos, a tabela 14 apresenta os resultados relativos à interação entre as isoformas do CYP450 que configura a etapa farmacocinética referente ao metabolismo.

Tabela 14 - Interação entre os derivados tiofênicos acrídnicos e as isoformas da CYP450.

METABOLISMO							
MOLÉCULA	CYP3A4		CYP2C9	CYP2C19	CYP1A2	CYP2D6	
	substrato	inibidor	inibidor	inibidor	inibidor	substrato	inibidor
MAL1	sim	sim	sim	sim	sim	não	não
MAL2	sim	sim	sim	sim	sim	não	não
MAL3	sim	sim	sim	sim	sim	não	sim

Fonte: REIS, 2021.

O complexo citocromo P450 representa um conjunto de enzimas envolvidos nos processos metabólicos do organismo humano com reações de fase I, podendo ser previsto questões relacionadas ao metabolismo do fármaco. No complexo, encontram-se isoenzimas capazes de auxiliar nos processos de oxidação, redução e hidrólise de xenobióticos, como por exemplo, CYP2D6, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2 (TIAN *et al.*, 2018).

De acordo com os resultados dispostos na tabela 14, nota-se que as moléculas analisadas apresentam probabilidade de inibir ou agir como substrato nas isoenzimas analisadas.

Dependendo da forma de ativação dos compostos endógenos, tal resposta pode ser negativa, uma vez que, ao serem inibidas as isoformas, existe maior probabilidade de ocorrer toxicidade, de possíveis interações medicamentosas, o risco de ocorrer efeitos colaterais e, por fim, diminuir a eficácia de medicamentos (NOVOTARSKYI *et al.*, 2011; PANG *et al.*, 2018; TIAN *et al.*, 2018).

Destaca-se a possível interação com CYP2D6, uma isoenzima capaz de metabolizar várias classes de fármacos, como por exemplo, antidepressivos, antipsicóticos, antagonistas adrenérgicos, analgésicos e antineoplásicos, a partir de reações metabólicas de primeira fase do tipo hidroxilação e provavelmente O-desmetilação e N-desalquilação (NOFZIGER *et al.*, 2020).

Em adição ao observado na tabela 14, nenhum dos compostos analisados foram substrato para a enzima CYP2D6, e apenas o composto MAL3 apresentou-se como inibidor, sendo, desta forma, uma molécula que provavelmente impediria reações de inativação de várias moléculas ativas, gerando possíveis eventos tóxicos, tais eventos poderiam ser testados e comprovados a partir de testes *in vitro*.

Em relação aos resultados dispostos na tabela 15, dispõe-se sobre a análise da toxicidade *in silico* obtido a partir da plataforma PROTOX-II. O LD<sub>50</sub> consiste na (máxima dose tolerada) e classifica-se como um parâmetro para análises relativas à administração por via oral, quanto maior esta grandeza, melhor será a absorção oral. Percebe-se que os compostos da série MAL possuem um conforto de dose em relação à esta via de administração seguido da correlação com a máxima dose tolerada.

Tabela 15 - Estudo preditivo *in silico* de toxicidade dos compostos tiofênicos acrídnicos.

TOXICIDADE					
Molécula	LD <sub>50</sub>	Máx. Dose tolerada	Hepatotoxicidade	Imunotoxicidade	Sensibilização cutânea
MAL1	980	0,361	sim	não	não
MAL2	980	0,471	sim	não	não
MAL3	980	0.464	sim	não	não

Legenda: LD<sub>50</sub>: Dose letal 50 - mg/kg; Máx. dose tolerada; Máxima dose tolerada- log mg/kg/dia; Tox. AMES: Ensaio de Mutagenicidade Salmonella/microssoma. Fonte: REIS, 2021.

Para a análise de toxicidade por classe, estabelece-se a relação entre as doses LD<sub>50</sub>, parâmetros fornecidos pela ferramenta PROTOX-II:

- Classe I: fatal por ingestão ( $LD_{50} \leq 5$ )
- Classe II: fatal por ingestão ( $5 < LD_{50} \leq 50$ )
- Classe III: tóxico por ingestão ( $50 < LD_{50} \leq 300$ )
- Classe IV: prejudicial se ingerido ( $300 < LD_{50} \leq 2000$ )
- Classe V: pode ser prejudicial se ingerido ( $2000 < LD_{50} \leq 5000$ )
- Classe VI: não tóxico ( $LD_{50} > 5000$ )

A partir disso percebe-se que os compostos MAL são classificados como série IV, para administração oral, podendo ser prejudiciais ao organismo, em consonância ao verificar-se os testes relativos à dose de ingestão máxima, o composto mais tóxico seria a MAL3.

Em relação a hepatotoxicidade, todos os compostos derivados tiofênicos acrínicos apresentaram-se como positivos. O teste *in silico* de imunotoxicidade, que se apresentou com resultado negativo para todos os compostos. Isto favorece o prosseguimento dos estudos relativos à ação promissora dos compostos analisados, uma vez que, a leishmaniose, foco do presente estudo, comporta-se com ação direta sobre o sistema imunológico do indivíduo afetado.

Os estudos relativos à função preditiva de excreção, encontram-se na tabela 16.

Tabela 16 - Resultado relativos à análise *in silico* dos compostos tiofênicos acrínicos no quesito farmacocinético de excreção.

EXCREÇÃO		
MOLÉCULA	Clearance Total (log ml/min/kg)	Subs. Renal - OCT2
MAL1	0,184	Não
MAL2	0,166	Não
MAL3	0.215	Não

Legenda: Subs. Renal- OCT2: Substrato Renal - OCT2. Fonte: REIS, 2021.

Os parâmetros analisados foram o *Clearance* total e a capacidade de transporte de cátions orgânicos renais 2 (OCT2), fatores importantes no que tange a capacidade de excreção de fármacos.

O *clearance* total (CT) é obtido a partir da relação entre a depuração hepática e a depuração renal e possui como concentração padrão aceitável, valores menores que 1,28 log ml/min/kg. Além disso, pode-se estabelecer uma relação inversamente proporcional entre CT e a meia-vida de fármacos, portanto, quanto maior a depuração, menor é a meia-vida do fármaco. O OCT2 transporta moléculas carregadas positivamente do sangue para o interior das células renais, deste modo, os compostos que são substratos deste sistema de transporte podem ser excretados mais rápido (CHANDRASEKARAN et al., 2018; DAOUI et al., 2021; WADANAMBI; MANNAPPERUMA, 2021).

Os resultados presentes na tabela 14 demonstram que todos os compostos se apresentam com valores de *clearance* total, inferiores a 1,28 log ml/min/kg e nenhum é substrato da OCT2. Deste modo, pode-se supor que as amostras são excretadas adequadamente do organismo, sem promover danos, e destaca-se que provavelmente, entre os compostos, a molécula MAL3 por possui maior tempo de meia-vida que os demais.

Dentre as análises é imprescindível a correlação entre as regras para avaliação da biodisponibilidade oral, deste modo, a identificação dos compostos da série MAL encontra-se dispostos na tabela 17.

Tabela 17 - Perfil *druglikeness* – MALs

PERFIL DRUGLIKE NESS			
REGRAS	MAL1	MAL2	MAL3
<i>Lipinski</i>	sim	sim	sim
Ghose	Não; Wlog> 5,6	Não; Wlog> 5,6	sim
Veber	sim	sim	sim
Egan	Não; Wlog>5.88	Não; Wlog>5.88	sim

Fonte: *Swiss.adme*, REIS, 2021.

Entre os compostos analisados em relação ao perfil farmacocinético *in silico*, pouco difere entre os membros da classe, provavelmente devido a pouca diferença

estrutural. Porém, ao analisar o perfil *druglikeness*, nota-se que a MAL 3 não viola nenhuma regra para a administração por via oral.

## 6 CONCLUSÃO

Os compostos sintetizados foram viabilizados de acordo com a estratégia de simplificação molecular. Deste modo, a partir da identificação da série ACS, surgiu-se a hipótese de avaliação dos compostos tiofênicos acrídnicos não substituídos, denominado compostos da série MAL

A busca por um composto lead na série ACS foi realizada a partir da exposição destas moléculas a análise em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, a última em caráter inédito, com  $IC_{50} < 10 \mu M$ . Então verificou-se que o melhor composto com perfil direto no patógeno foi o ACS3. Então procedeu-se com a síntese orgânica por uma via sintética paralela, convergente e com o mínimo de resíduos possível, além disso, priorizou-se a aplicação de metodologias fáceis e de baixo custo, a fim de avaliar o potencial antileishmania desses compostos. Os três compostos tiofênicos acrídnicos expostos a técnicas de elucidação estrutural para identificação de pureza e confirmação estrutural, fato este que foi atingido e pode-se verificar nos espectros de FTIR, MS e RMN  $C^{13}$  e  $H^1$  tais achados.

A partir da análise dos compostos da série MAL identificou-se que possuíam menor atividade antileishmania que a série ACS e apesar disto, ao analisar a citotoxicidade em macrófago J774, os compostos MAL foram menos tóxicos que os ACS e ainda q expressão em macrófagos forneceu um provável perfil imunomodulador. Após as análises preliminares e considerando o cenário pandêmico atual devido ao Sars-Cov-2, a atividade imunomoduladora para avaliação da expressão de espécies reativas e citocinas foi prosseguida apenas com os compostos da série MAL, pois apresentou-se um bom perfil no efeito microbicida reduzindo a infecção dos macrófagos J774 infectados com *L. amazonensis*, para 4% sob a ação da MAL3.

A fim de confirmar os resultados obtidos no ensaio de MTT, procedeu-se com a análise em citometria de fluxo, um ensaio mais robusto, para identificação da viabilidade celular. Como possíveis mecanismos antileishmania foram avaliadas as respostas Th1 e Th2, a partir da expressão de citocinas e EROS e ERNS. Os compostos apresentaram um padrão de modulação relativas à resposta Th1 e

diminuição na concentração de citocinas Th2. O composto MAL 3, apresentou-se com destaque para os testes imunomodulatório, tanto por aumentar a concentração de ERNS, EROS, interleucinas IL-2 E INF- $\gamma$ , além de reduzir as concentrações de IL-10. Portanto, traçando um paralelo com resultados obtidos no efeito microbicida, onde este composto reduziu a infecção a 4%, acredita-se que apesar de não possuir ação direta no patógeno existe a probabilidade modulação metabólica do macrófago para que a infecção seja reduzida intracelularmente.

De modo a ampliar os resultados *in vitro*, realizou-se as análises preditivas *in silico* para atividade farmacocinética com o composto MAL3 apresentando melhor projeção para um processo de absorção oral, devido a biodisponibilidade ser maior que 93% TGI, classificado como classe biofarmacêutica IV, e, apesar de apresentar toxicidade, este composto não sensibiliza a camada cutânea e não possui imunogenotoxicidade, fortalecendo a hipótese de que pode ser classificado como *druglikeness*. Diante destes dados, realizamos testes de ancoragem molecular para que fosse possível justificar o efeito antileishmania dos compostos tiofênicos acrínicos. Dentre os alvos estudados, a molécula MAL1 apresentou perfil *multitarget*, sendo potente frente a tripanotiona redutase, proteína específica do parasita da leishmania e atua no metabolismo removendo espécies peróxido e mantendo os níveis de tiol intracelular, fortalecendo a hipótese de ação direta sob o patógeno. Em relação aos resultados nos alvos analisados a respeito da molécula MAL3, faz total sentido a ausência de ativação ou bloqueio do sítio de ação, uma vez que, tal molécula possui ação imunomoduladora sob o macrófago e não ação direta sob a cepa.

Assim, diante dos dados apresentados, a MAL3 destacou-se como o composto com melhor perfil antileishmania com aspectos imunomodulatórios, devendo ser realizados testes mais amplos sobre os possíveis mecanismos de ação desse composto e posteriormente, iniciar desenvolvimento tecnológico de possíveis formulações para veiculação em vias de administração oral ou cutâneo e ainda realizar a testagem quanto ao protótipo ACS que gerou a simplificação molecular da MAL3

## 7 PERSPECTIVAS

- Ampliar o estudo de mecanismos imunomodulatório para a série ACS;
- Realizar efeito microbicida para a série ACS
- Ampliar estudos de *docking* molecular, avaliando novos alvos antileishmania como potenciais mecanismos de ação desses compostos.
- Realizar microscopias afim de identificar danos ao parasita a partir da exposição dos compostos tiofênicos acrídnicos;
- Desenvolver um sistema de liberação para o *scaffolds* - MAL3;
- Caracterizar as formulações obtidas, em relação aos aspectos estruturais e físico-químicos;
- Realizar o estudo de liberação *in vitro*;
- Reavaliar a atividade leishmanicida dos derivados produzidos, incorporados nos sistemas de liberação.

## REFERÊNCIAS

- AERTS, C.; VINK, M.; PASHTOON, S. J.; NAHZAT, S.; PICADO, A.; CRUZ, I.; SICURI, E. Cost Effectiveness of New Diagnostic Tools for Cutaneous Leishmaniasis in Afghanistan. **Applied Health Economics and Health Policy**, [s. l.], n. 0123456789, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40258-018-0449-8>>
- ALY, A. A.; BRÄSE, S.; WEIS, P. Tridentate and bidentate copper complexes of [2.2]paracyclophanyl-substituted thiosemicarbazones, thiocarbazones, hydrazones and thioureas. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1178, p. 311–326, 2019.
- ASSCHE, T. VAN et al. Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology. Free Radical Biology and Medicine, 2011. v. 51, n. 2, p. 337–351. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.011>>.**
- AZIZ, H. et al. Synthesis, single crystal analysis, biological and docking evaluation of tetrazole derivatives. Heliyon, 2018. v. 4, n. 9.**
- BARÉA, P.; BARBOSA, V. A.; BIDÓIA, D. L.; DE PAULA, J. C.; STEFANELLO, T. F.; DA COSTA, W. F.; NAKAMURA, C. V.; SARRAGIOTTO, M. H. Synthesis, antileishmanial activity and mechanism of action studies of novel  $\beta$ -carboline-1,3,5-triazine hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 150, p. 579–590, 2018.
- BARIONI, M. B.; DE PAULA PINTO, C.; GUIMARÃES, T. H. S.; DA GAMA BITENCOURT, J. J.; SANTOS, M. A. Dos; ITO, A. S.; PAZIN, W. M.; SANTOS, M. R. M. Dos; VALDUGA, C. J. Miltefosine-loaded lipid nanoparticles: Improving miltefosine stability and reducing its hemolytic potential toward erythrocytes and its cytotoxic effect on macrophages. **Biophysical Chemistry**, [s. l.], v. 217, p. 20–31, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2016.07.005>>
- BASTOS, M. M. E.; HOELZ, L. V. B.; BOECHAT, N.; DE OLIVEIRA, A. P. Antileishmanial chemotherapy: A literature review. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 2072–2104, 2016.
- BORGES, A. P.; CARNEIRO, Z. A.; PRADO, F. S.; SOUZA, J. R.; FURLAN E SILVA, L. H.; OLIVEIRA, C. G.; DEFLON, V. M.; DE ALBUQUERQUE, S.; LEITE, N. B.; MACHADO, A. E. H.; PATROCINIO, A. O. T.; MAIA, P. I. S. Cu(I) complexes with thiosemicarbazides derived from p-toluenesulfohydrazide: Structural, luminescence and biological studies. **Polyhedron**, [s. l.], v. 155, n. 1, p. 170–179, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.poly.2018.08.013>>

BRIKCI-NIGASSA, N. M.; BENTABED-ABABSA, G.; ERB, W.; CHEVALLIER, F.; PICOT, L.; VITEK, L.; FLEURY, A.; THIÉRY, V.; SOUAB, M.; ROBERT, T.; RUCHAUD, S.; BACH, S.; ROISNEL, T.; MONGIN, F. 2-Aminophenones, a common precursor to N-aryl isatins and acridines endowed with bioactivities. *Tetrahedron*, [s. l.], v. 74, n. 15, p. 1785–1801, 2018.

**CAROLE, D. G. et al. *Synthesis and antileishmanial activities of 4,5-di-substituted acridines as compared to their 4-mono-substituted homologues.* *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2005. v. 13, n. 19, p. 5560–5568.**

**CHANDRASEKARAN, B. et al. *Computer-Aided Prediction of Pharmacokinetic (ADMET) Properties.* [S.l.]: Elsevier Inc., 2018. V. 2.**

**CHEN, C. P. et al. *Evaluating molecular properties involved in transport of sMALI molecules in stratum corneum: A quantitative structure-activity relationship for skin permeability.* *Molecules*, 2018. v. 23, n. 4, p. 1–17.**

CHOWDHURY, S. R.; MAJUMDER, H. K. DNA Topoisomerases in Unicellular Pathogens: Structure, Function, and Druggability. *Trends in Biochemical Sciences*, [s. l.], v. xx, p. 1–18, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.12.001>>

**COLMENAREJO, G. *In Silico ADME Prediction: Data Sets and Models.* *Current Computer Aided-Drug Design*, 2005. v. 1, n. 4, p. 365–376.**

**CONCHON-COSTA, I. et al. *Transcriptome profiling identifies genes/pathways associated with experimental resistance to paromomycin in Leishmania donovani.* *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018. v. 114, n. 1, p. 1–9. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.10.016>>.**

**CORTÉS-SELVA, F. et al. *Functional expression of a multidrug P-glycoprotein transporter of Leishmania.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005. v. 329, n. 2, p. 502–507.**

DA SILVA, B. J. M.; PEREIRA, S. W. G.; RODRIGUES, A. P. D.; DO NASCIMENTO, J. L. M.; SILVA, E. O. In vitro antileishmanial effects of *Physalis angulata* root extract on *Leishmania infantum*. *Journal of integrative medicine*, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 404–410, 2018. a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.08.004>>

**D'ANTONIO, E. L. et al. *Crystal structure of arginase from Leishmania mexicana and implications for the inhibition of polyamine biosynthesis in parasitic infections.* *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2013. v. 535, n. 2, p. 163–176. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2013.03.015>>.**

DA SILVA, C. C.; BRITTA, E.; LA PORTA, F. A.; VANDRESEN, F.; FALZIROLLI, H.; CATHARINO, R. R.; ALMEIDA BATISTA, S. A.; DE OLIVEIRA, D. N.; RAMALHO, T. C.; GONÇALVES, M. A.; NAKAMURA, C. V. Synthesis and comparison of

antileishmanial and cytotoxic activities of S(-)-limonene benzaldehyde thiosemicarbazones with their R-(+)-analogues. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1179, p. 252–262, 2018. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.11.017>>

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**, [s. l.], v. 357, n. 4, p. 1202–1210, 2006.

DE ALMEIDA, S. M. V.; LAFAYETTE, E. A.; DA SILVA, L. P. B. G.; DA CRUZ AMORIM, C. A.; DE OLIVEIRA, T. B.; GOIS RUIZ, A. L. T.; DE CARVALHO, J. E.; DE MOURA, R. O.; CARNEIRO BELTRÃO, E. I.; DE ALVES LIMA, M. D. C.; DE CARVALHO, L. B. Synthesis, DNA binding, and antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 13023–13042, 2015.

**DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of sMALI molecules. Scientific Reports, 2017. v. 7, n. January, p. 1–13.**

**DAOUI, O. et al. Heliyon QSAR , molecular docking and ADMET properties in silico studies of novel as potent anti-tumor agents through inhibition of C-Met receptor tyrosine kinase. Heliyon, 2021. v. 7, n. June, p. e07463. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07463>>.**

EMAMI, S.; TAVANGAR, P.; KEIGHOBADI, M. An overview of azoles targeting sterol 14 $\alpha$ -demethylase for antileishmanial therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 135, p. 241–259, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.044>>

EMPLOYEDTHE, A.; OF, T.; STATE, T. H. E.; THE, O. F.; ANTIMONY, A. R. T. ANTIMONIAIS EMPREGADOS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE: ESTADO DA ARTE Susanne Rath\*, Luciano Augusto Trivelin, Talitha Rebecca Imbrunito, Daniela Maria Tomazela, Marcelo Nunes de Jesús e Percy Calvo Marzal. [s. l.], v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

**EDWARDS, D. A.; LANGER, R. A linear theory of transderMAL transport phenomena. Journal of Pharmaceutical Sciences.**

**FELIZARDO, T. C. et al. Lack of signaling by IL-4 or by IL-4/IL-13 has more attenuating effects on *Leishmania amazonensis* dorsal skin - than on footpad-infected mice. Experimental Parasitology, 2012. v. 130, n. 1, p. 48–57. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.09.015>>.**

FEITOSA, I. B.; AGUIDA, W. R. De; TELES, C. B. G. Immunomodulating effects of Phlebotomine saliva in Leishmania infection: Review. **EntomoBrasilis**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 156, 2018.

FERREIRA, L. G.; DOS SANTOS, R. N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. **Molecular docking and structure-based drug design strategies**. [s.l: s.n.], v. 20

FLOHÉ, L. The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 302, n. 4–5, p. 216–220, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.07.008>>

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 1343–1358, 2010.

**FINCH, A.; PILLANS, P. P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions. Australian Prescriber, 2014. v. 37, n. 4, p. 137–139.**

**FURTADO, R. R. et al. Constitutive nitric oxide synthase-like enzyme in two species involved in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Parasitology International, 2021. v. 83, n. January 2020, p. 102347. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102347>>.**

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-790X2004000300011&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000300011&lng=pt&tlng=pt)>

GOUVEIA, R. G.; RIBEIRO, A. G.; SEGUNDO, M. Â. S. P.; DE OLIVEIRA, J. F.; DE LIMA, M. do C. A.; DE LIMA SOUZA, T. R. C.; DE ALMEIDA, S. M. V.; DE MOURA, R. O. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 26, n. 22, p. 5911–5921, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.10.038>>

**GÜLLER, P. The In Vitro and In Silico Inhibition Mechanism of Glutathione Reductase by Resorcinol Derivatives: A Molecular Docking Study. Journal of Molecular Structure, 2021. v. 1228, p. 129790. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129790>>.**

**HAN, Y. et al. In silico ADME and toxicity prediction of ceftazidime and its impurities. Frontiers in Pharmacology, 2019. v. 10, n. APR, p. 1–12.**

**HOLLING, C. S. RAISING THE BAR Rethinking the role of business in the Sustainable Development Goals. Annual Review of Ecology and Systematics,**

1973. v. 4, n. 1973, p. 1–23. Disponível em:

<[https://www.zoology.ubc.ca/bdg/pdfs\\_bdg/2013/Holling1973.pdf](https://www.zoology.ubc.ca/bdg/pdfs_bdg/2013/Holling1973.pdf)>  
<<http://www.jstor.org/stable/2096802>>  
<<http://www.jstor.org/stable/2096802>>

**HOTEZ, P. J. et al. a06V2470. Drug Discovery Today, 2017. v. 16, n. 6, p. 59–67. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.019>>.**

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 601–606, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2014.07.006>>

**IBGE, C. De P. E I. S. Síntese de indicadores sociais: Uma análise das condições de vida da população brasileira 2018 [Synthesis of social index: An analysis of the living standards of the Brazilian population 2018]. [S.l.]: [s.n.], 2018.**

ISLAMUDDIN, M.; CHOUHAN, G.; FAROOQUE, A.; DWARAKANATH, B. S.; SAHAL, D.; AFRIN, F. TH1-Biased Immunomodulation and Therapeutic Potential of *Artemisia annua* in Murine Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2015.

ITO, M. M.; CATANHÊDE, L. M.; KATSURAGAWA, T. H.; DA SILVA JUNIOR, C. F.; CAMARGO, L. M. A.; MATTOS, R. de G.; VILALLOBOS-SALCEDO, J. M. Correlation between presence of *Leishmania RNA virus 1* and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniasis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, [s. l.], v. 81, n. 5, p. 533–540, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.07.014>>

**JIA, C. Y. et al. A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery. Drug Discovery Today, 2020. v. 25, n. 1, p. 248–258. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.10.014>>.**

KAPIL, S.; SINGH, P. K.; SILAKARI, O. An update on sMALI molecule strategies targeting leishmaniasis. [s.l.] : Elsevier Masson SAS, 2018. v. 157 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.012>>

LIMA, L. M. *Biologia Molecular Década De 80*.Pdf. [s. l.], v. 30, n. 6, p. 1456–1468, 2007.

**LIMA SERAFIM, V. DE et al. New thiophene–acridine compounds: Synthesis, antileishmanial activity, DNA binding, chemometric, and molecular docking studies. [S.l.]: [s.n.], 2018. V. 91.**

**LÓPEZ, S. E. In silico molecular docking studies of new potential 4-phthalazinyI-hydrazones on selected *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* enzyme targets. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2017. v. 76, p. 313–329. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.07.013>>.**

LUO, J.; WEI, W.; WALDISPÜHL, J.; MOITESSIER, N. Challenges and current status of computational methods for docking sMALI molecules to nucleic acids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.046>>

MABKHOT, Y. N.; KAAL, N. A.; ALTERARY, S.; AL-SHOWIMAN, S. S.; FARGHALY, T. A.; MUBARAK, M. S. Antimicrobial activity of thiophene derivatives derived from ethyl (E)-5-(3-(dimethylamino)acryloyl)-4-methyl-2-(phenylamino)thiophene-3-carboxylate. **Chemistry Central Journal**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–11, 2017.

MAMIDALA, R.; MAJUMDAR, P.; JHA, K. K.; BATHULA, C.; AGARWAL, R.; CHARY, M. T.; MAZUMDAR, 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**, [s. l.], v. 6, n. February, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep26603>>

MANZANO, J. I.; COCHET, F.; BOUCHERLE, B.; GÓMEZ-PÉREZ, V.; BOUMENDJEL, A.; GAMARRO, F.; PEUCHMAUR, M. Arylthiosemicarbazones as antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 123, p. 161–170, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.014>>

MARKIKOU-OUNI, W.; DRINI, S.; BAHJ-JABER, N.; CHENIK, M.; MEDDEB-GARNAOUI, A. Immunomodulatory effects of four Leishmania infantum potentially excreted/secreted proteins on human dendritic cells differentiation and maturation. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1–17, 2015.

MELO, T. S.; GATTASS, C. R.; SOARES, D. C.; CUNHA, M. R.; FERREIRA, C.;

**MORGAN, H. P. et al. The trypanocidal drug suramin and other trypan blue mimetics are inhibitors of pyruvate kinases and bind to the adenosine site. Journal of Biological Chemistry, 2011. v. 286, n. 36, p. 31232–31240. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.212613>>.**

**NÉRIS, P. L. N. et al. Neolignan Licarin A presents effect against Leishmania (Leishmania) major associated with immunomodulation in vitro. Experimental Parasitology, 2013. v. 135, n. 2, p. 307–313.**

**NOFZIGER, C. et al. PharmVar GeneFocus: CYP2D6. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2020. v. 107, n. 1, p. 154–170.**

**NOVOTARSKYI, S. et al. A comparison of different QSAR approaches to modeling CYP450 1A2 inhibition. Journal of Chemical Information and Modeling, 2011. v. 51, n. 6, p. 1271–1280.**

**NUNES, T. A. De L. et al. Curzerene antileishmania activity: Effects on Leishmania amazonensis and possible action mechanisms. International**

*Immunopharmacology*, 2021. v. 100, n. July, p. 1–10.

**OLEKHNOVITCH, R.; BOUSSO, P.** *Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from Leishmania Infection.* *Trends in Parasitology*, 2015. v. 31, n. 12, p. 653–664. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.08.001>>.

OLIVEIRA, F.; ROWTON, E.; ASLAN, H.; GOMES, R.; CASTROVINCI, P. A.; ALVARENGA, P. H.; ABDELADHIM, M.; TEIXEIRA, C.; MENESES, C.; KLEEMAN, L. T.; GUIMARÃES-COSTA, A. B.; ROWLAND, T. E.; GILMORE, D.; DOUMBIA, S.; REED, S. G.; LAWYER, P. G.; ANDERSEN, J. F.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. A sand fly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in nonhuman primates. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 290, 2015.

**OLIVEIRA CARDOSO, J. M. DE et al.** *IL-10 receptor blockade controls the in vitro infectivity of Leishmania infantum and promotes a TH1 activation in PBMC of dogs with visceral leishmaniasis.* *Molecular Immunology*, 2021. v. 137, n. May, p. 20–27.

**ORTALLI, M. et al.** *Identification of chalcone-based antileishmanial agents targeting trypanothione reductase.* *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018. v. 152, p. 527–541. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.057>>.

**OSERO, B. O. Ondo et al.** *Unravelling the unsolved paradoxes of cytokine families in host resistance and susceptibility to Leishmania infection.* *Cytokine: X*, 2020. v. 2, n. 4, p. 100043. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.cytox.2020.100043>>.

**PAES DE BARROS, R.; FOGUEL, M. N.; ULYSSEA, G.** *Desigualdade de renda no Brasil: uma análise da queda recente - Vol 2. [S.l.]: [s.n.], 2004.*

**PANG, X. et al.** *Screening of cytochrome P450 3A4 inhibitors via in silico and in vitro approaches.* *RSC Advances*, 2018. v. 8, n. 61, p. 34783–34792.

**PHADKE, S.; SOMANI, R.; PATHAK, D.** *New benzimidazole derivatives as inhibitors of Pteridine reductase 1: Design, molecular docking study and ADMET prediction.* *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2020. v. 10, n. 9, p. 30–39.

PEARSON, R. D.; WELLER, P. F.; GUERRANT, R. L. **Chemotherapy of Parasitic Diseases.** Thrid Edit ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2011. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7020-3935-5.00012-4>>

PETIT, K.; SUWALSKY, M.; COLINA, J. R.; AGUILAR, L. F.; JEMIOLA-RZEMINSKA, M.; STRZALKA, K. In vitro effects of the antitumor drug miltefosine on human

erythrocytes and molecular models of its membrane. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [s. l.], v. 1861, n. 1, p. 17–25, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.10.009>>

PINHEIRO, R. O. PINHEIRO 2004 - Leishmaniose tegumentar americana mecanismos imunológicos tratamento e profilaxia.pdf. [s. l.], p. 79–82, 2003.

**PHAM-THE, H. et al. Exploring different strategies for imbalanced ADME data problem: case study on Caco-2 permeability modeling. *Molecular Diversity*, 2016. v. 20, n. 1, p. 93–109.**

PALACIOS, F.; ALONSO, C.; RUBIALES, G.; TEJERÍA, A.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; BALAÑA-FOUCE, R.; GONZÁLEZ, M.; REGUERA, R. M.; FUERTES, M. Antileishmanial effect of new indeno-1,5-naphthyridines, selective inhibitors of *Leishmania infantum* type IB DNA topoisomerase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 124, p. 740–749, 2016.

\_\_\_\_\_ et al. ***In Silico Assessment of ADME Properties: Advances in Caco-2 Cell Monolayer Permeability Modeling. Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2018. v. 18, n. 26, p. 2209–2229.**

**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*, 2015. v. 58, n. 9, p. 4066–4072.**

RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y. P. P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 958–968, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2015.04.006>>

**RAGHAVA, K. M.; LAKSHMI, P. K. Overview of P-glycoprotein inhibitors: A rational outlook. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012. v. 48, n. 3, p. 353–367.**

**RAMER-TAIT, A. E.; PETERSEN, C. A.; JONES, D. E. IL-2 limits IL-12 enhanced lymphocyte proliferation during *Leishmania amazonensis* infection. *Cellular Immunology*, 2011. v. 270, n. 1, p. 32–39. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.03.016>>.**

**REIS, L. D. C. et al. Mecanismos Imunológicos Na Resposta Celular E Humoral Na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista de Patologia Tropical*, 2007. v. 35, n. 2, p. 103–115.**

ROCHA, C. A.; SANCHES, P. R. S.; MARCHETTO, R.; ZOTTIS, A. The octahydroindene carboxyl substructure from dihydrobetulinic acid is essential to inhibit topoisomerase IB from *Leishmania donovani*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 591–598, 2016.

RODRIGUES, K. A. da F.; SILVA, D. K. F.; SERAFIM, V. de L.; ANDRADE, P. N.; ALVES, A. F.; TAFURI, W. L.; BATISTA, T. M.; MANGUEIRA, V. M.; SOBRAL, M. V.; MOURA, R. O. De; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; OLIVEIRA, M. R. De. SB-83, a 2-Amino-thiophene derivative orally bioavailable candidate for the leishmaniasis treatment. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 108, n. July, p. 1670–1678, 2018.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, D.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; NAIN-PEREZ, A.; FERREIRA, S. R.; FUJIWARA, R. T.; DE ALMEIDA, R. M.; HELLER, L.; CSUK, R. Leishmanicidal and cytotoxic activity of hederagenin-bistriazolyl derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 140, p. 624–635, 2017.

ROMÃO, P. R. T.; DIAS, R. D. O.; CRUZ, K. K.; BIOLÓGICAS, C.; SOUZA, F. C. De; MONTEIRO, M. C.; IMUNOLOGIA, L. De. Leishmaniose: Resposta Imune E Mecanismos. **Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde**, [s. l.], v. 2, p. 1–10, 2007.

RÔMULO, J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 139–149, 2004. Disponível em: <<http://www.periodicos.usp.br/rbcf/article/view/43946/47567>>

SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1668–1679, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2011.08.002>>.

**ROMERO, A. H. et al. Design, synthesis, structure-activity relationship and mechanism of action studies of a series of 4-chloro-1-phthalazinyl hydrazones as a potent agent against Leishmania braziliensis. European Journal of Medicinal Chemistry, 2017. v. 127, p. 606–620. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.01.022>>.**

**SANTOS, T. A. R. DOS et al. Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against L. amazonensis. Experimental Parasitology, 2017. v. 177, p. 57–65. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.003>>.**

**SHAHEEN, N. et al. In vitro anti-leishmanial activity of Prunus armeniaca fractions on Leishmania tropica and molecular docking studies. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2020. v. 213, p. 112077. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112077>>.**

**SEYED, N.; RAFATI, S. TH1 concomitant immune response mediated by IFN- $\gamma$  protects against sand fly delivered Leishmania infection: Implications for**

*vaccine design*. *Cytokine*, 2021. v. 147, n. 69, p. 155247. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155247>>.

**SHAHEEN, N. et al.** *In vitro anti-leishmanial activity of Prunus armeniaca fractions on Leishmania tropica and molecular docking studies*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2020. v. 213, p. 112077. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112077>>.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.

SHAH, R.; VERMA, P. K. Therapeutic importance of synthetic thiophene. **Chemistry Central Journal**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–22, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13065-018-0511-5>>

SILVA, P. I. C. Da; FREITAS, J. J. da S.; DOMINGUES, R. J. de S. **Manual Básico de Oncologia Experimental: Tumor de Ehrlich**. [s.l: s.n.].

ŚLEDŹ, P.; CAFLISCH, A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. **Current Opinion in Structural Biology**, [s. l.], v. 48, p. 93–102, 2018.

**SUAREZ, E. T. et al.** *Antileishmanial activity of synthetic analogs of the naturally occurring quinolone alkaloid N -methyl-8-methoxyflindersin*. *PLoS ONE*, 2020. v. 15, n. 12 December, p. 1–19.

SYKES, J. E.; BANETH, G.; PETERSEN, C. A. **Leishmaniosis**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781437707953000740>>

TAVARES, M. T.; SARAIVA, E.; PARISE-FILHO, R.; BRADEN, H.; DELORENZI, J. C. Oleanolic acid (OA) as an antileishmanial agent: Biological evaluation and in silico mechanistic insights. **Parasitology International**, [s. l.], v. 65, n. 3, p. 227–237, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.01.001>>

**TIAN, S. et al.** *CypReact: A Software Tool for in Silico Reactant Prediction for Human Cytochrome P450 Enzymes*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2018. v. 58, n. 6, p. 1282–1291.

TIWARI, K.; DUBEY, V. K. Leishmania donovani asparaginase variants exhibit cytosolic localization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 114, n. 2017, p. 35–39, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.071>>

**VACAS, A. et al.** *LmjF.22.0810 from leishmania major modulates the TH2-type immune response and is involved in leishmaniasis outcome. Biomedicines.*

VÉRAS OF AGUIAR, A. C.; OF MOURA, R. O.; BEZERRA MENDONÇA, J. F.; DE OLIVEIRA ROCHA, H. A.; GOMES CÂMARA, R. B.; DOS SANTOS CARVALHO SCHIAVON, M. Evaluation of the antiproliferative activity of 2-amino thiophene derivatives against human cancer cells lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 84, p. 403–414, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.026>>

**WADANAMBI, P. M.; MANNAPPERUMA, U.** *Computational study to discover potent phytochemical inhibitors against drug target, squalene synthase from Leishmania donovani. Heliyon, 2021. v. 7, n. 6, p. e07178. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07178>>.*

**WAKIL, A. E.; WANG, Z. E. N.; LOCKSLEY, R. M.** *Leishmania major: Targeting IL-4 in successful immunomodulation of murine infection. Experimental Parasitology, 1996. v. 84, n. 2, p. 214–222.*

**WATERBEEMD, H. VAN DE; GIFFORD, E.** *ADMET in silico modelling: Towards prediction paradise? Nature Reviews Drug Discovery, 2003. v. 2, n. 3, p. 192–204.*

ZHENG, M.; LIU, X.; XU, Y.; LI, H.; LUO, C.; JIANG, H. Computational methods for drug design and discovery: Focus on China. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 34, n. 10, p. 549–559, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2013.08.004>

**ZOETE, V.** *A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of SMALI Molecules. ChemMedChem, 2016. p. 1117–1121.*

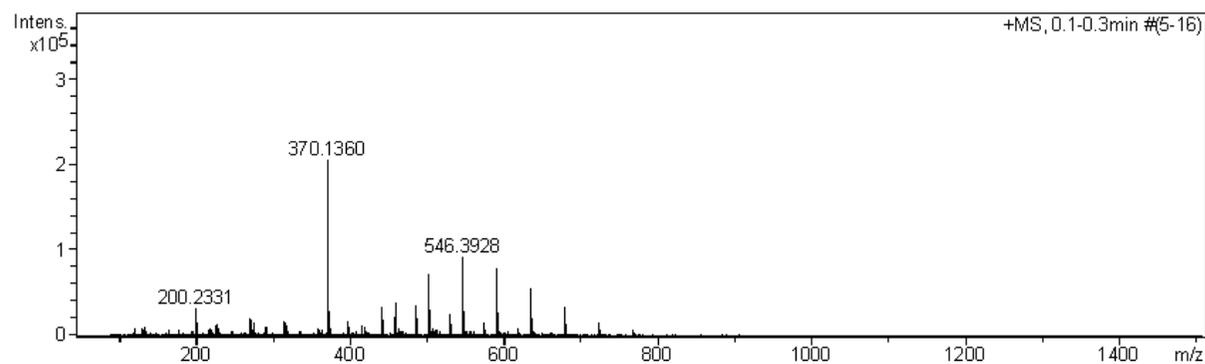
## APÊNDICE A - Espectro de Massas – MAL1

### Mass Spectrum SmartFormula Report

Acquisition Date 16/10/2019 18:49:48  
 Operator BDAL@DE  
 Instrument / Ser# micrOTOF 10338

#### Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	49.3 psi
Focus	Not active			Set Dry Heater	300 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
370.1360	1	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> S	100.00	370.1372	1.2	3.3	19.8	15.5	even	ok
	2	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S	23.51	370.1332	-2.8	-7.6	29.7	11.5	even	ok

Fonte: REIS, 2021.

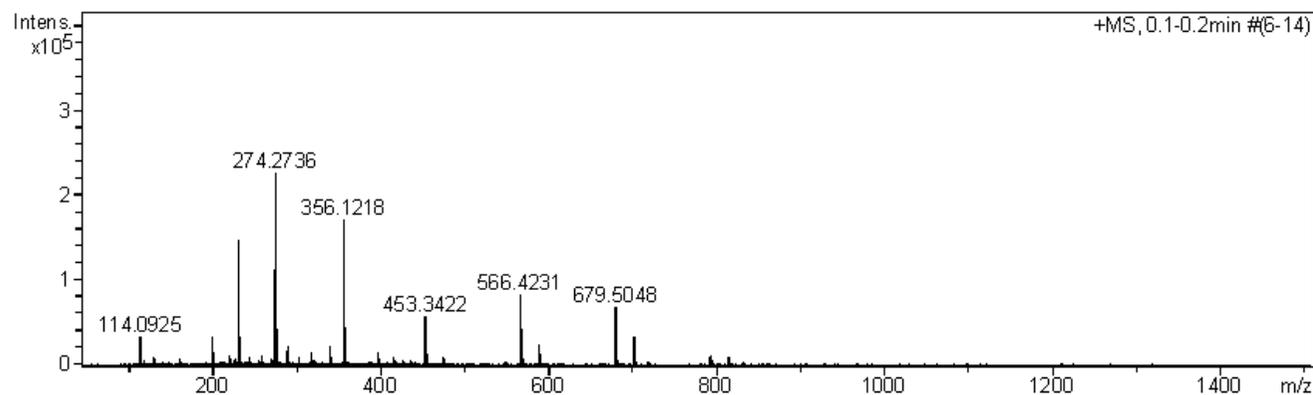
## APÊNDICE B - Espectro de Massas – MAL2

### Mass Spectrum SmartFormula Report

Acquisition Date 18/10/2019 18:38:44  
 Operator BDAL@DE  
 Instrument / Ser# micrOTOF 10338

#### Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	49.3 psi
Focus	Not active			Set Dry Heater	300 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
356.1218	1	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> S	100.00	356.1216	-0.2	-0.5	6.0	15.5	even	ok
	2	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	8.01	356.1250	3.2	9.0	25.5	10.5	even	ok

Fonte: REIS, 2021

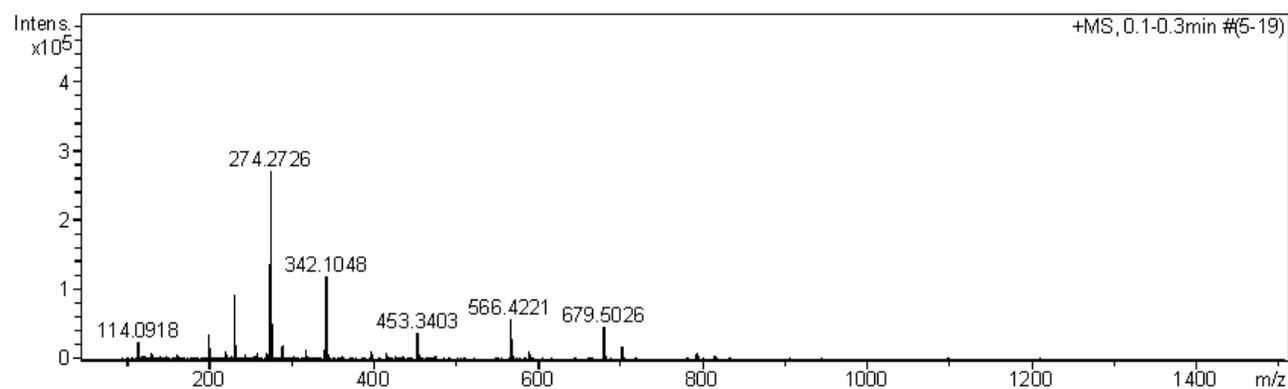
## APÊNDICE C - Espectro de Massas – MAL3

### Mass Spectrum SmartFormula Report

Acquisition Date 16/10/2019 18:31:01  
 Operator BDAL@DE  
 Instrument / Ser# micrOTOF 10338

#### Acquisition Parameter

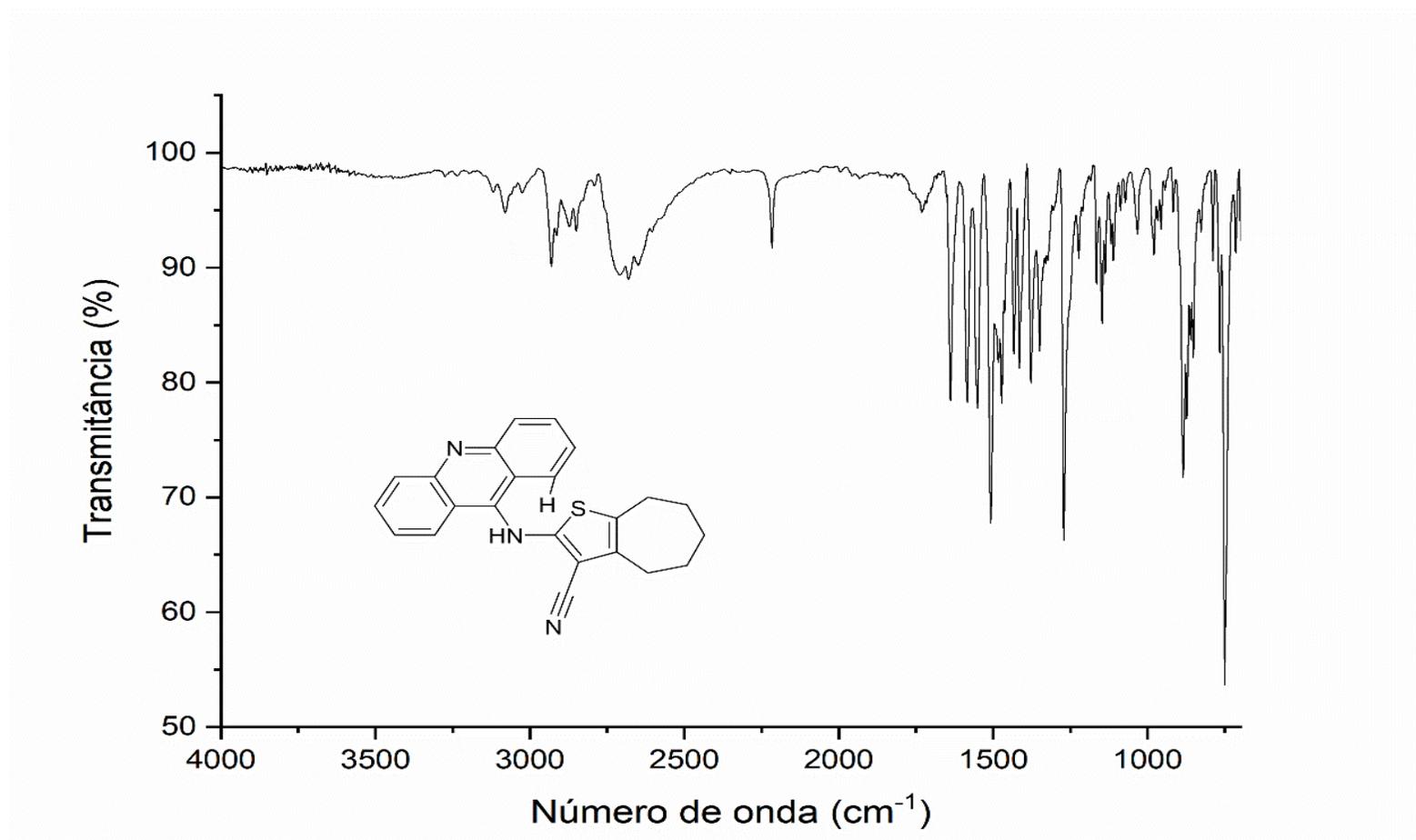
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	49.3 psi
Focus	Not active			Set Dry Heater	300 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
342.1048	1	C 21 H 16 N 3 S	100.00	342.1059	1.1	3.2	1.7	15.5	even	ok
	2	C 16 H 16 N 5 O 2 S	15.72	342.1019	-2.9	-8.6	24.5	11.5	even	ok

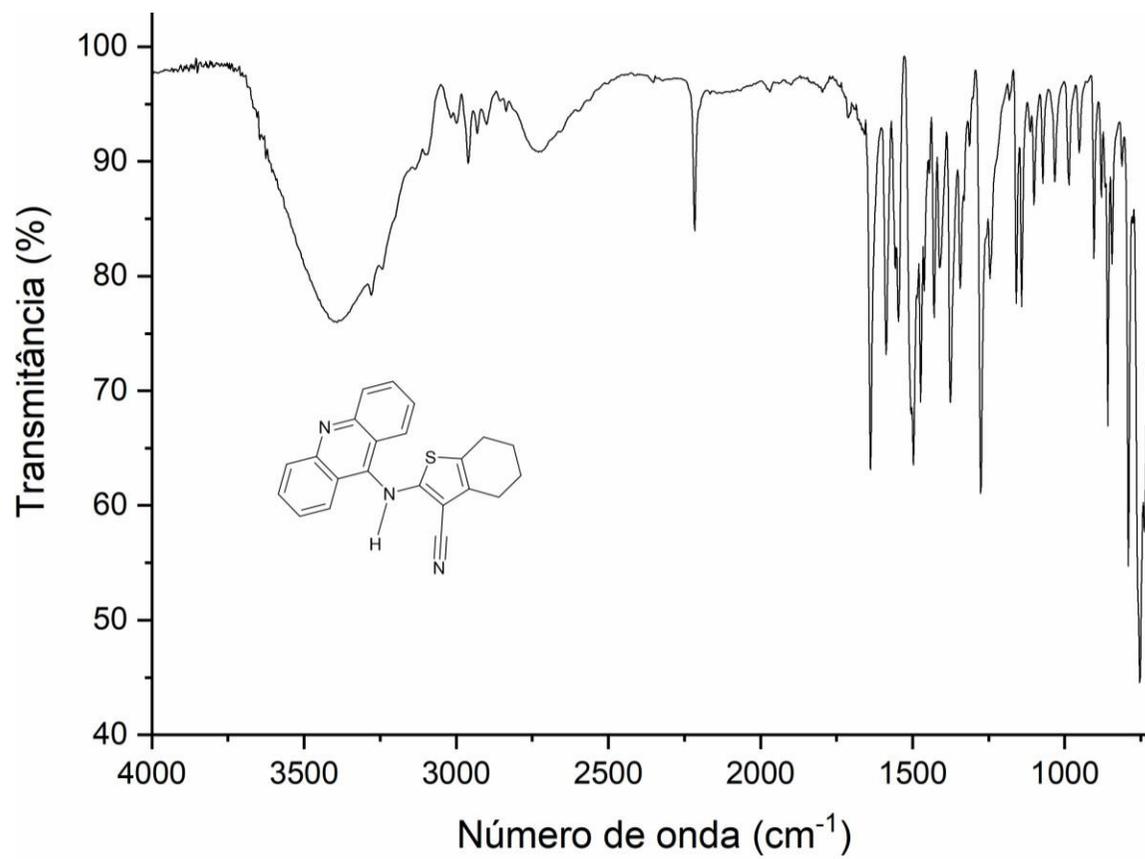
Fonte: REIS, 202

## APÊNDICE D - Espectro de Infravermelho - MAL1

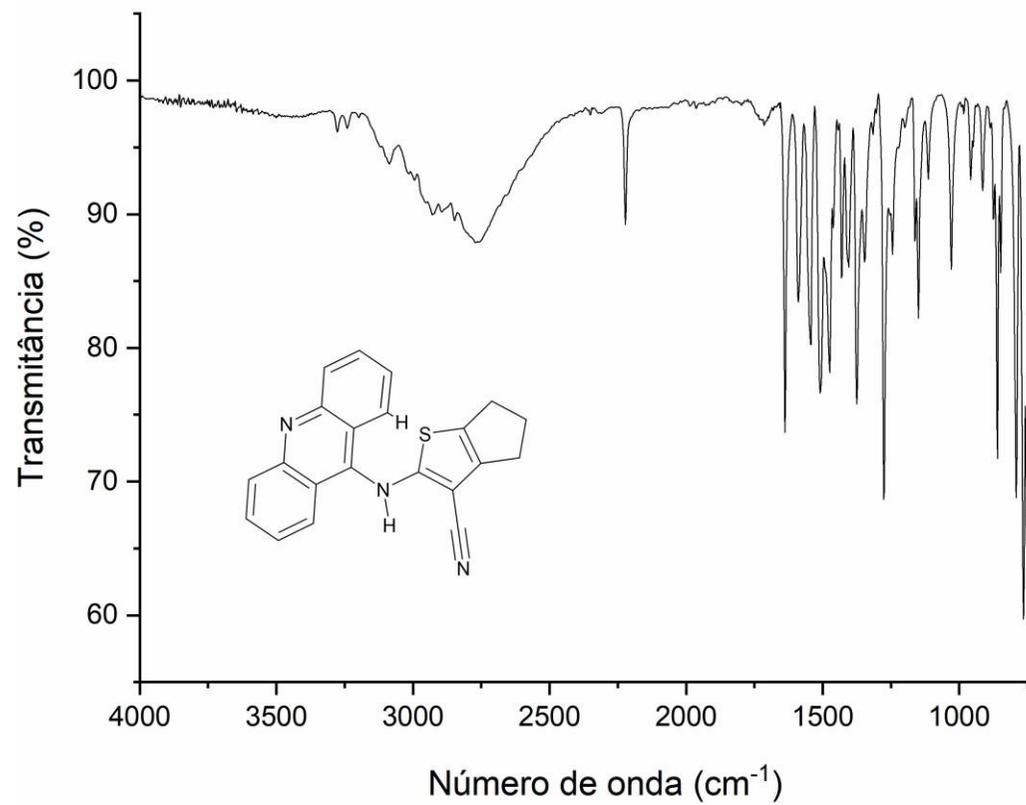


Fonte: REIS, 2021

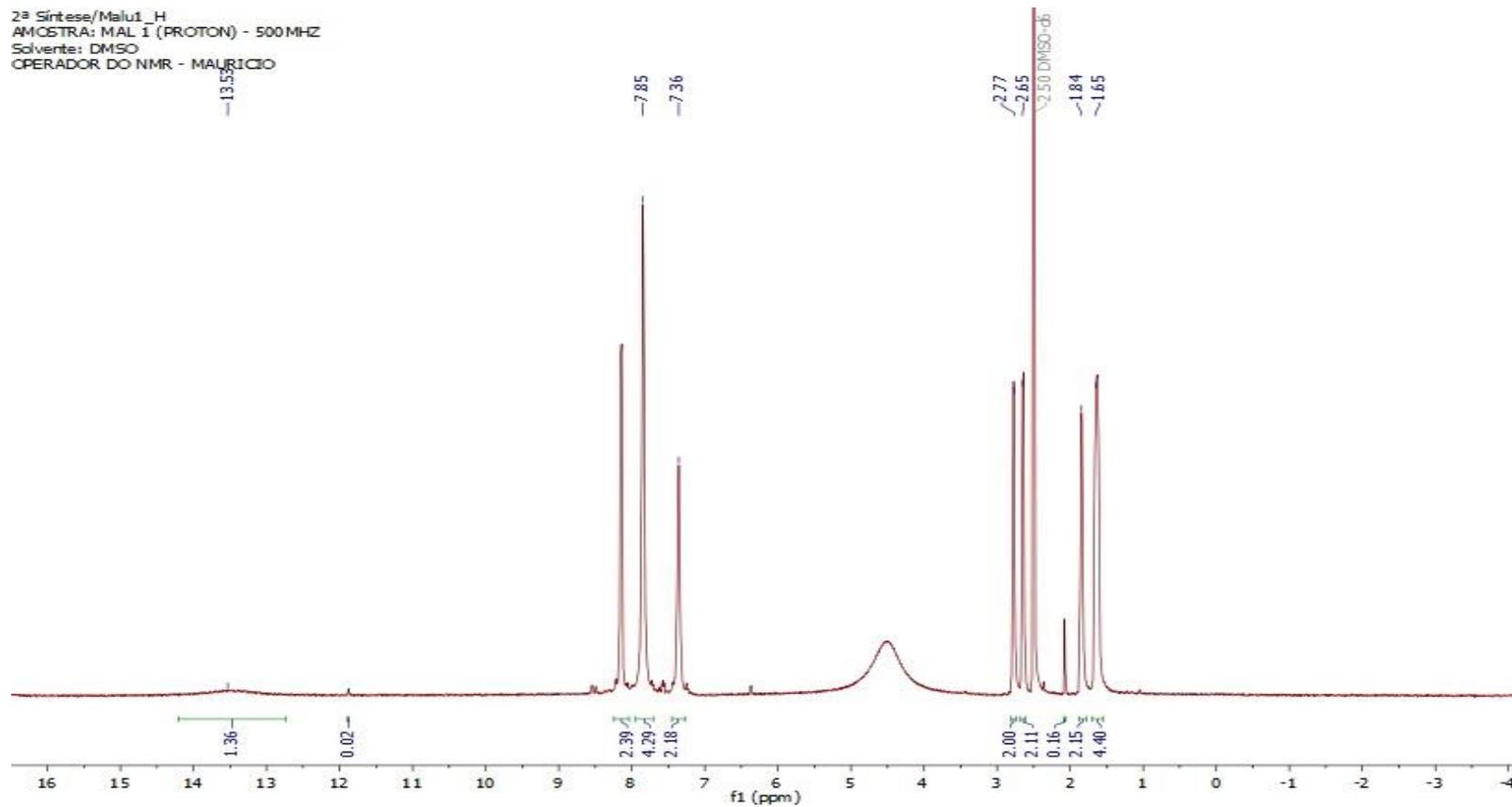
## APÊNDICE E - Espectro de Infravermelho – MAL2



. Fonte: REIS, 2021

**APÊNDICE F - Espectro de Infravermelho – MAL3**

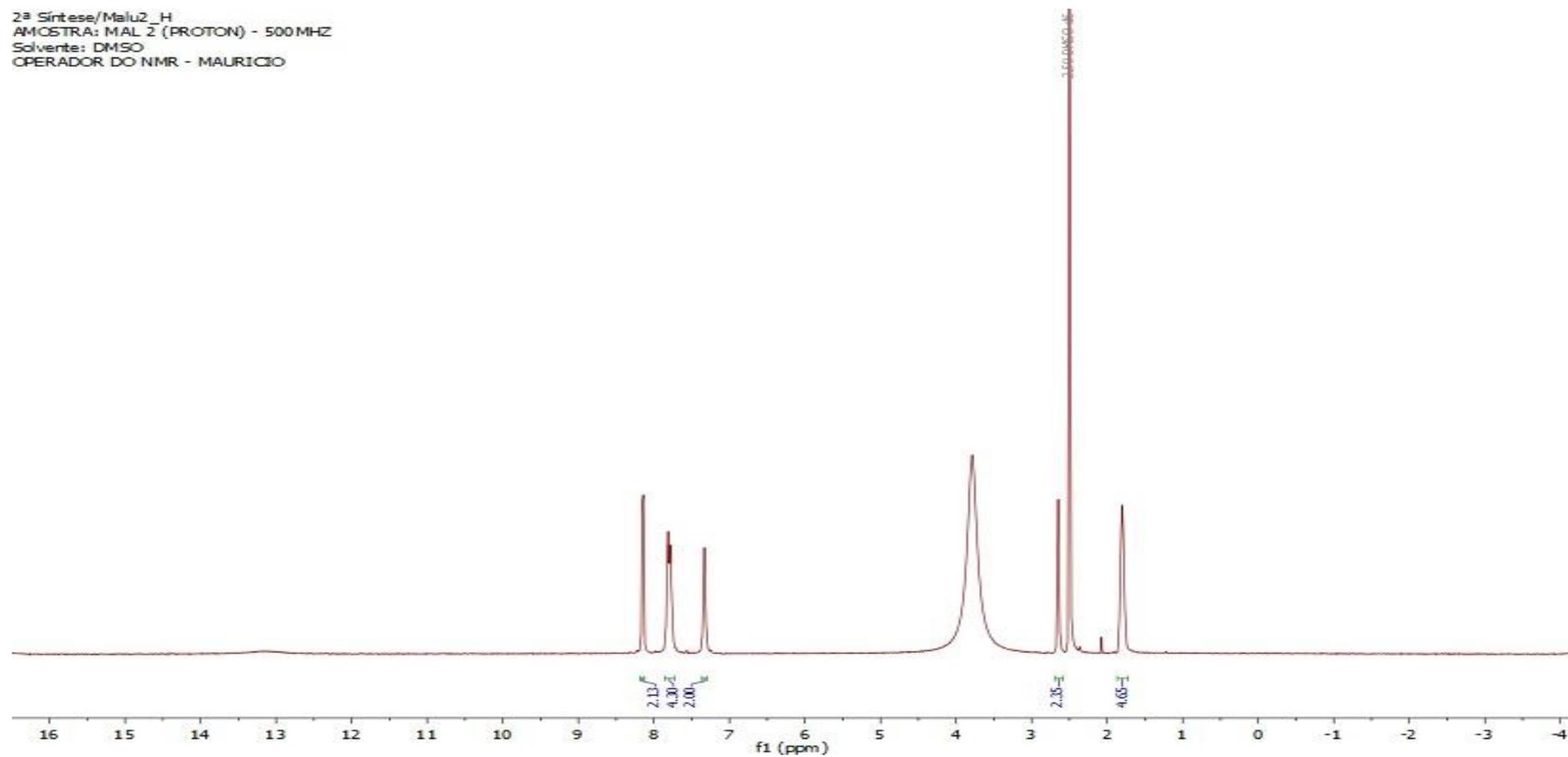
. Fonte: REIS, 2021

APÊNDICE G - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos sintetizados série MAL1

Fonte: REIS, 2021.

## APÊNDICE H - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos compostos sintetizados série MAL2

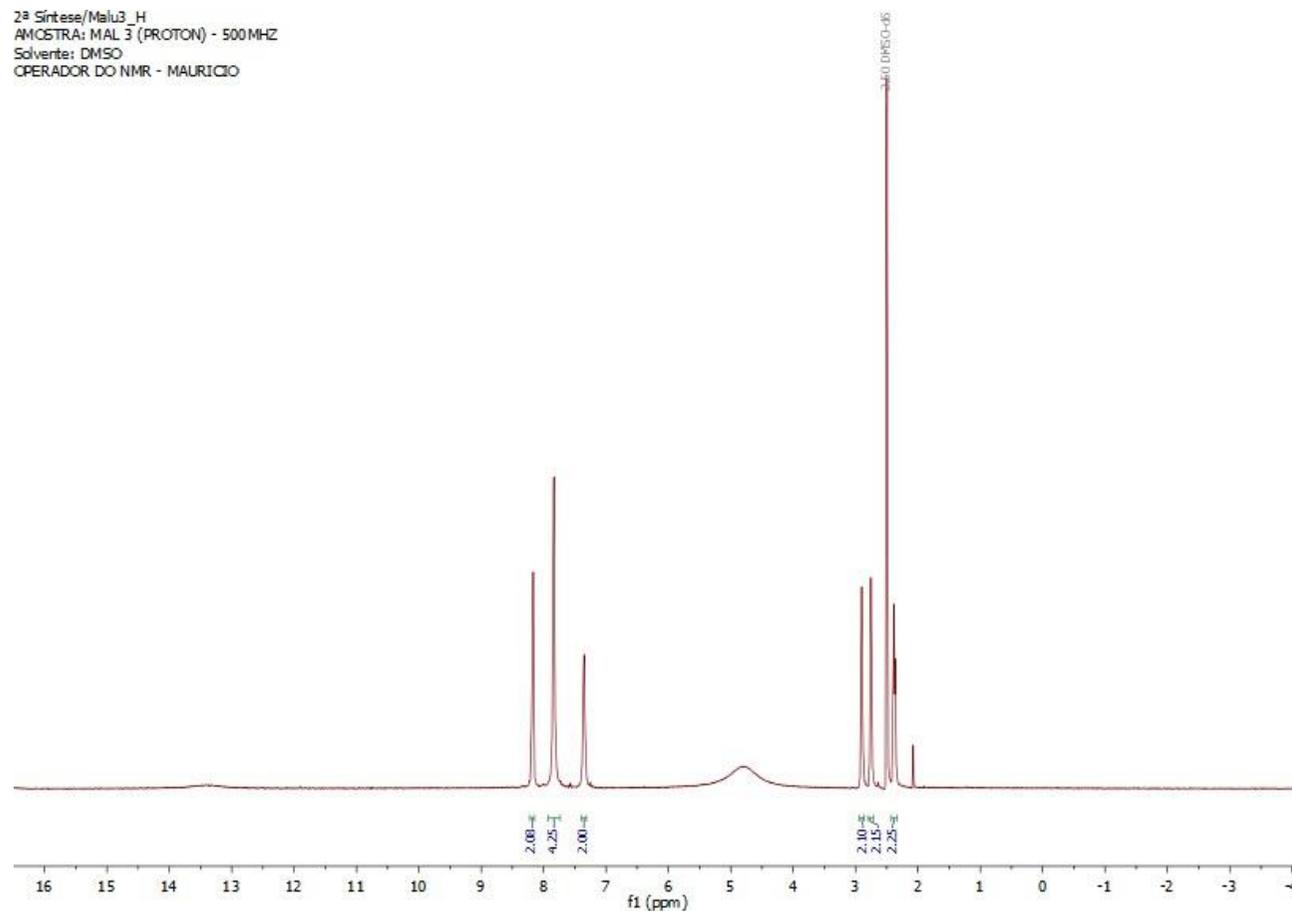
2ª Síntese/Malu2\_H  
AMOSTRA: MAL 2 (PROTON) - 500 MHz  
Solvente: DMSO  
OPERADOR DO NMR - MAURICIO



Fonte: REIS, 2021.

## APÊNDICE I - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos compostos sintetizados série MAL3

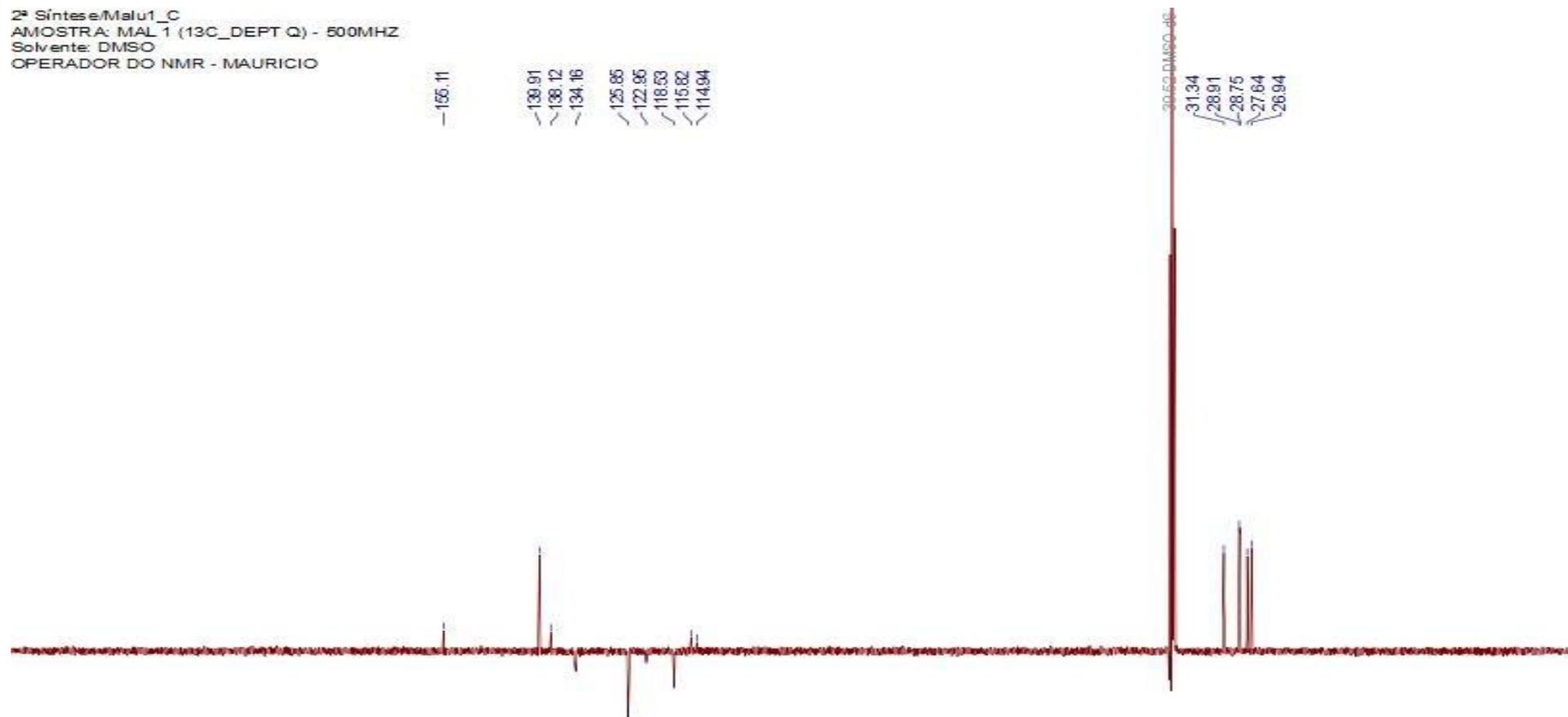
2ª Síntese/Malu3\_H  
AMOSTRA: MAL 3 (PROTON) - 500 MHz  
Solvente: DMSO  
OPERADOR DO NMR - MAURICIO



Fonte: REIS, 2021.

APÊNDICE J - Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos sintetizados série MAL1

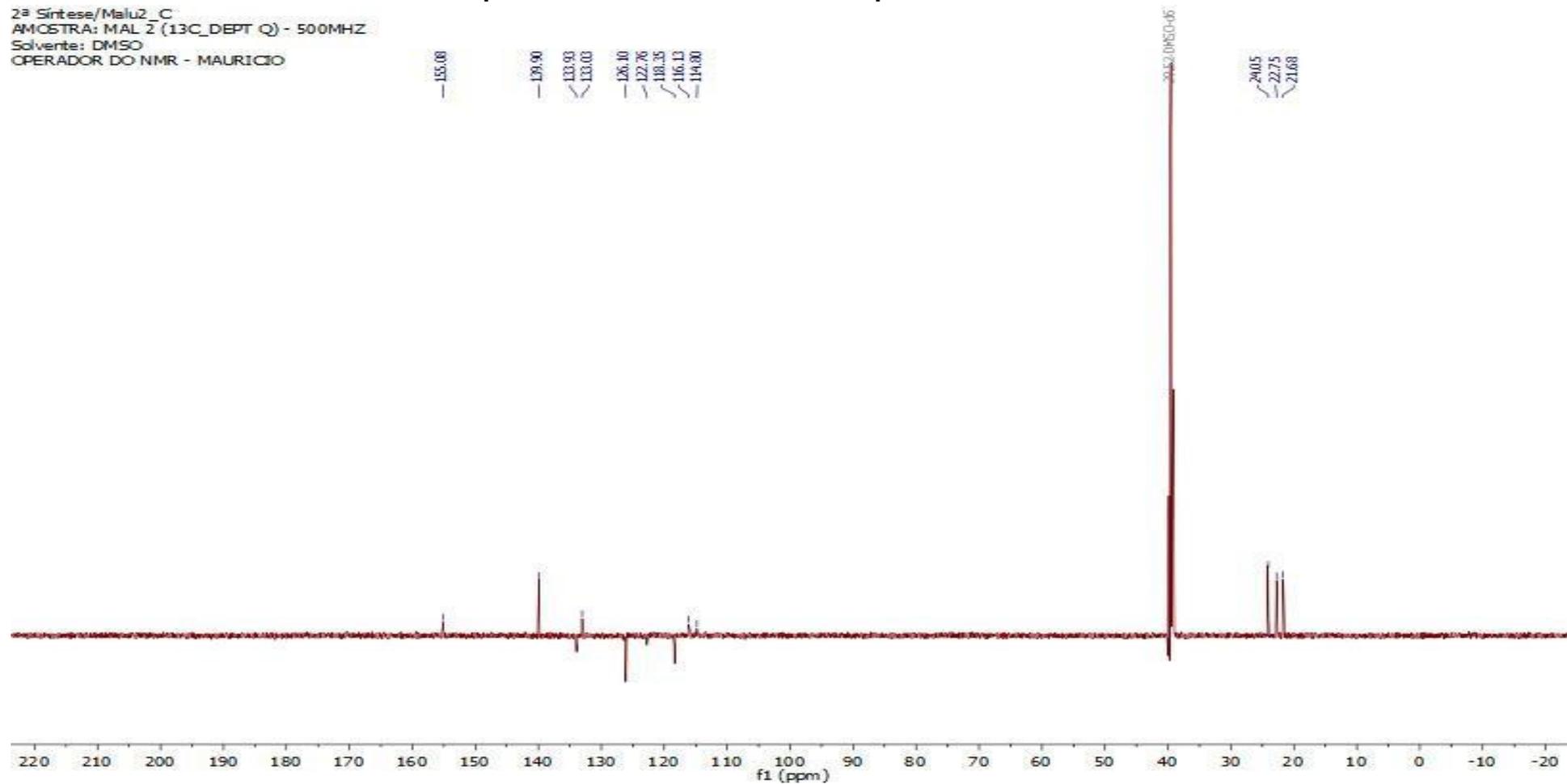
2ª Síntese/Malu1\_C  
AMOSTRA: MAL 1 (13C\_DEPT Q) - 500MHZ  
Solvente: DMSO  
OPERADOR DO NMR - MAURICIO



Fonte: REIS, 2021.

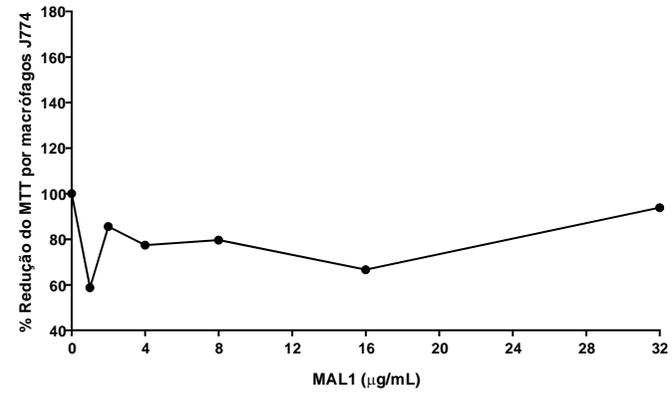
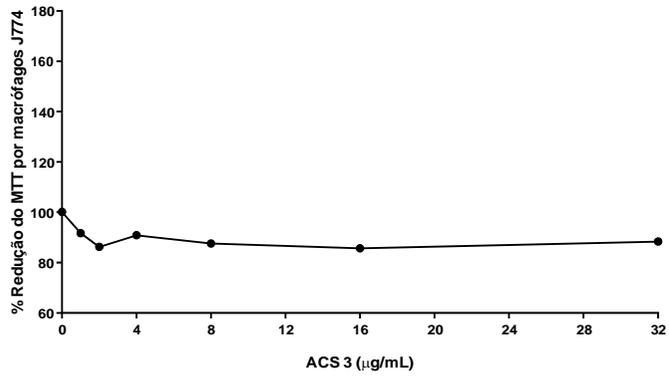
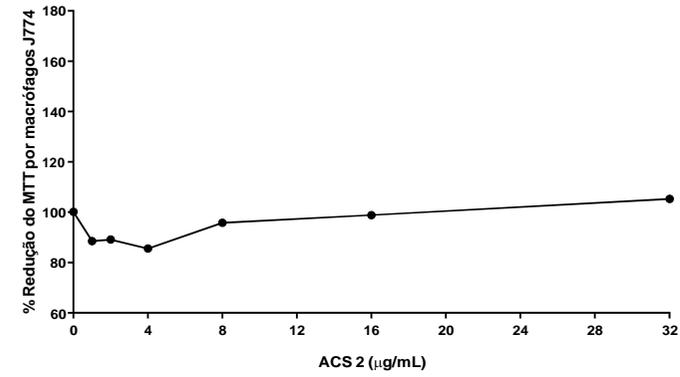
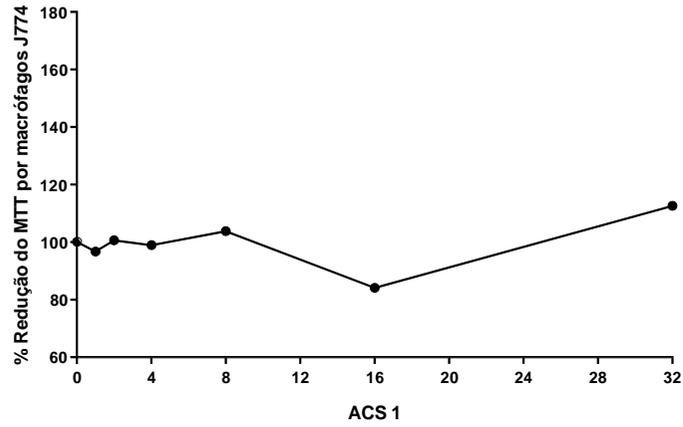
APÊNDICE K - Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos sintetizados série MAL2

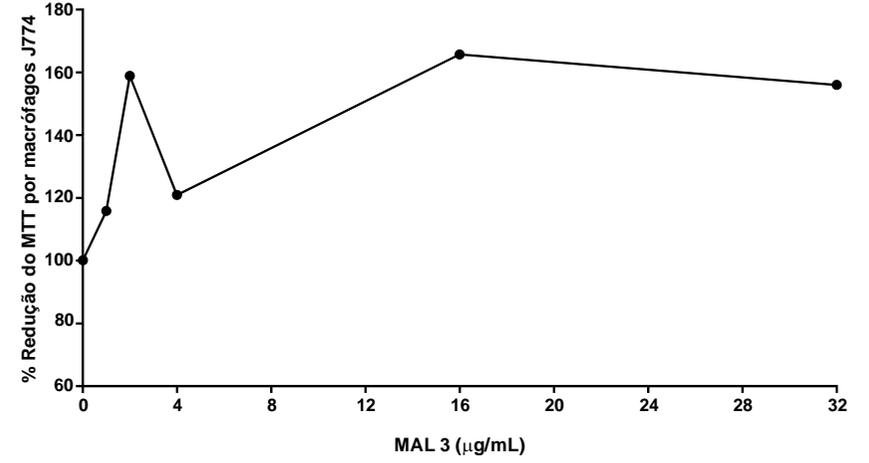
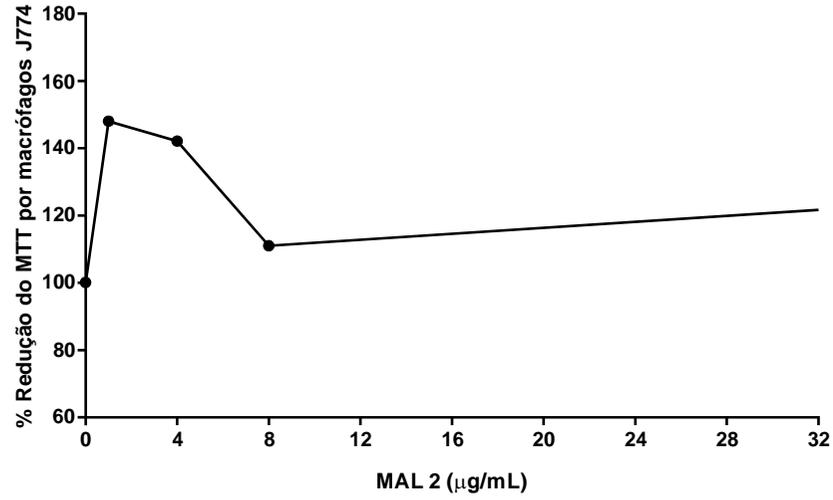
2ª Síntese/Malu2\_C  
AMOSTRA: MAL 2 (13C\_DEPT Q) - 500MHZ  
Solvente: DMSO  
OPERADOR DO NMR - MAURICIO



Fonte: REIS, 2021.



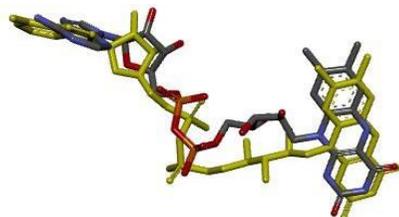
**APÊNDICE M - Avaliação da citotoxicidade dos derivados tiofênicos acrídnicos em linhagens de macrófagos J774**



Fonte: REIS, 2021

## APÊNDICE N - Mapas – Ancoragem molecular - Alvo 2JK6

-REDOCKING: RMSD REF.: 1.53 - ALVO 2JK6



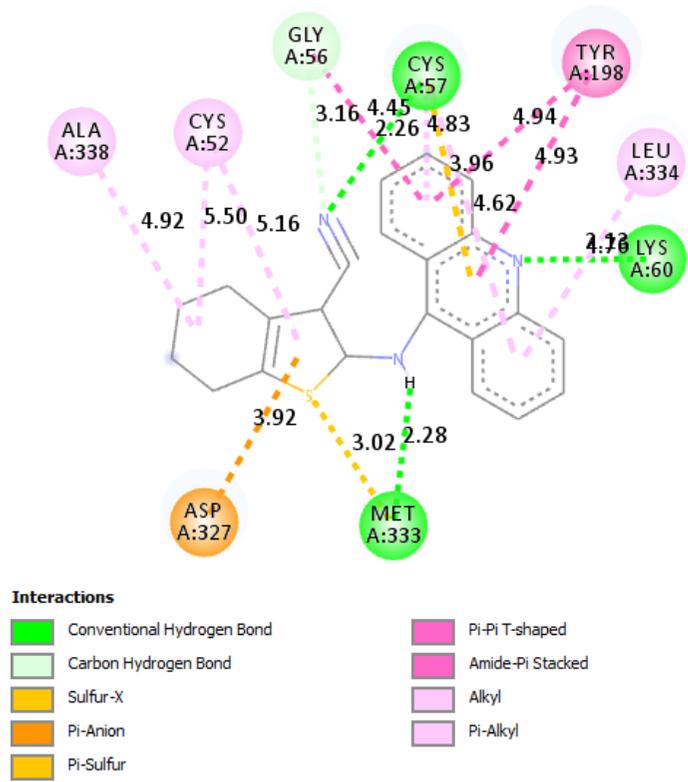
*Imagem: ligante co-cristalizado no alvo (amarelo) e o ligante redocado (cinza)*

Even Number of User-specified Grid Points = 40 x-points/ 46 y-points/ 40 z-points.

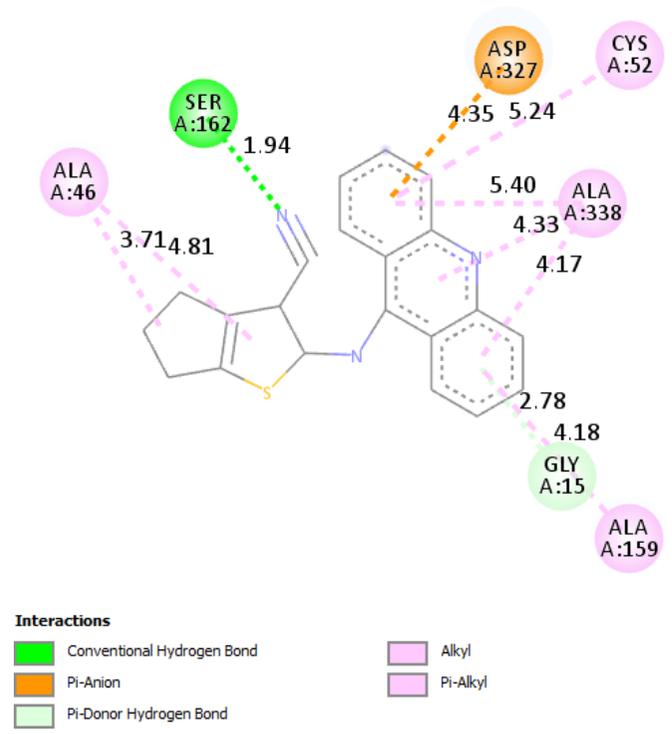
Coordinates of Central Grid Point of Maps = (32.051, 55.534, -6.760)

*Grid Point Spacing* = 0.375 Angstrom





**MAL2**



**MAL3**

## APÊNDICE O - Mapas – Ancoragem molecular - Alvo 3L4D

REDOCKING: RMSD REF.: 1.10

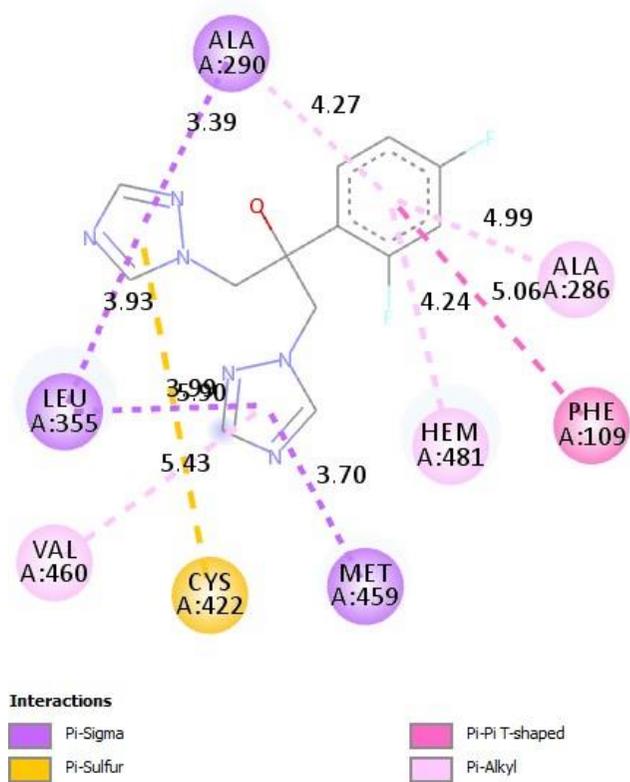
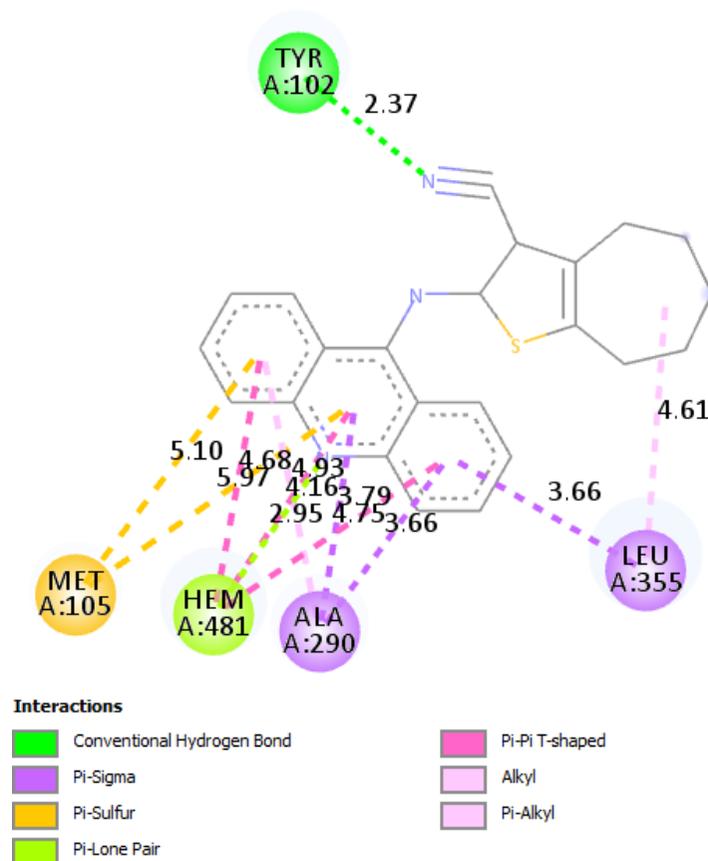


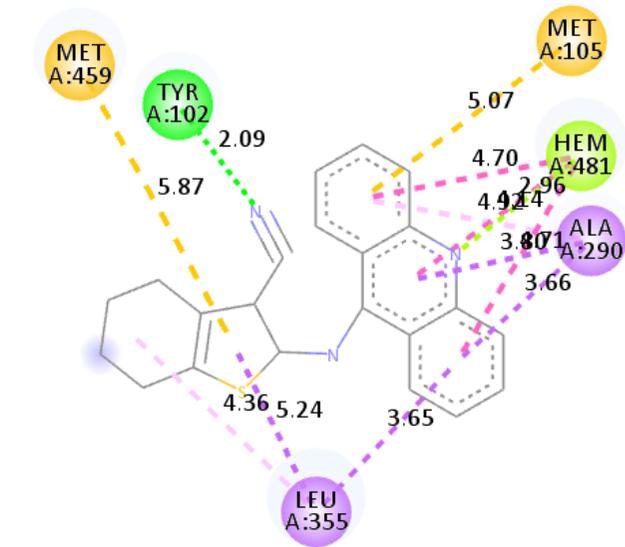
Imagem: ligante co-cristalizado no alvo (amarelo) e o ligante redocado (cinza)

Grid Point Spacing = 0.375 Angstroms

Even Number of User-specified Grid Points = 40 x-points/ 40 y-points/ 40 z-points

Coordinates of Central Grid Point of Maps = (32.011, -30.136, -1.185)

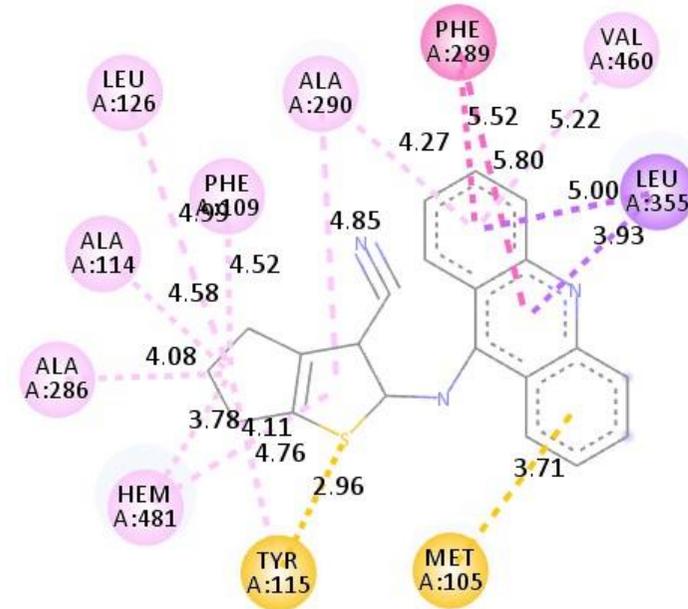
**FLUCONAZOL****MAL1**



**Interactions**

- Conventional Hydrogen Bond
- Pi-Sigma
- Pi-Sulfur
- Pi-Lone Pair
- Pi-Pi T-shaped
- Alkyl
- Pi-Alkyl

**MAL2**



**Interactions**

- Sulfur-X
- Pi-Sigma
- Pi-Sulfur
- Pi-Pi T-shaped
- Alkyl
- Pi-Alkyl

**MAL3**