



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

NATÁLI TEREZA CAPISTRANO COSTA

**ANÁLISE *IN SILICO* E *IN VITRO* DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DE NOVOS
DERIVADOS SINTÉTICOS HÍBRIDOS ISOXAZOLINAS DE SEIS
MEMBROS/TIAZOLIDINA-2,4-DIONA**

Recife

2021

NATÁLI TEREZA CAPISTRANO COSTA

**ANÁLISE *IN SILICO* E *IN VITRO* DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DE NOVOS
DERIVADOS SINTÉTICOS HÍBRIDOS ISOXAZOLINAS DE SEIS
MEMBROS/TIAZOLIDINA-2,4-DIONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Desenho, Modelagem Molecular e Preparação de Produtos Bioativos

Orientador: Prof^o. Dr. Marcelo Zaldini Hernandes

Coorientadoras: Dra. Aline Caroline da Silva Santos e Dra. Valéria Pereira Hernandes.

Recife

2021

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Costa, Natáli Tereza Capistrano

Análise *in silico* e *in vitro* do potencial leishmanicida de novos derivados sintéticos híbridos isoxazolininas de seis membros/tiazolidina-2,4-diona / Natáli Tereza Capistrano Costa – 2021.

195 f.: il., fig., tab.

Orientador: Marcelo Zaldini Hernandes

Coorientadoras: Aline Caroline da Silva Santos e Valéria Pereira Hernandes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2021.

Inclui referências.

1. Leishmaniose 2. Toxicidade- testes 3. Biologia molecular I. Hernandes, Marcelo Zaldini (orient.) II. Santos, Aline Caroline da Silva (coorient.) III. Hernandes, Valéria Pereira (coorient.) IV. Título

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-172

NATÁLI TEREZA CAPISTRANO COSTA

**ANÁLISE *IN SILICO* E *IN VITRO* DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DE NOVOS
DERIVADOS SINTÉTICOS HÍBRIDOS ISOXAZOLINAS DE SEIS
MEMBROS/TIAZOLIDINA-2,4-DIONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 05/03/2021.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Drº. Marcelo Zaldini Hernandes (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Drº. Luiz Felipe Gomes Rebello Ferreira (Examinador Titular)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Elis Dionisio da Silva (Examinador Titular)
Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer imensamente a minha mãe, por todo esforço e trabalho para me oferecer a oportunidade de chegar onde cheguei. A minha irmã, por ser fonte de inspiração inabalável em toda trajetória. A meu irmão e meu pai por todo apoio ao longo do caminho. A minha tia, por ser peça fundamental na construção da pessoa que sou hoje e ter plantado junto comigo a semente que hoje cresce e dá frutos.

Agradeço de todo coração aos meus orientadores, por toda paciência, por toda palavra de incentivo e agradecimento. Ao professor Marcelo Zaldini, por ter me acolhido, por toda confiança, por cada bronca e cada palavra de apoio, sei e entendo que sem elas eu não estaria aqui. Agradeço a professora Valéria e a Aline, por terem embarcado junto comigo em todo esse processo e serem essenciais para construção desse trabalho. Agradeço a Ana Catarina, Felipe e Marcelo Rabello, por cada ensinamento passado, por estarem sempre disponíveis para sanar minhas dúvidas e por acreditarem em mim.

Agradeço a todos os meus amigos por toda compreensão diante da minha ausência, por todo apoio e suporte e todo amor envolvido na relação. Agradeço a Luciene, Sabino e Horácio por todo cuidado, por sempre acreditarem em mim e sempre estarem presentes em todas as etapas do meu crescimento. Agradeço a André e a Lília, pela presença ao meu lado desde a seleção até o momento da defesa, sem vocês nada disso seria possível. Agradeço a Amanda, Clara, Winny, Priscilla, Luísa e Luiz, por toda amizade e por todo momento vivido ao longo do caminho.

Por fim, mas não menos importante, agradeço com todo meu amor a Kamila, por todo apoio, por cada palavra de incentivo, por todo momento em que só quis desistir e ela me fez ver e acreditar de que era possível, por nunca ter duvidado da minha capacidade (inclusive em momentos que nem eu mesma acreditava), por toda presença contínua e por todo carinho.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada causada por parasitas protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). A doença afeta 98 países, deixando mais de 1 bilhão de pessoas em risco. O atual tratamento para essa patologia tem sérias deficiências, incluindo alto custo, via de administração, resistência aos medicamentos e, efeitos colaterais sérios, havendo, assim, a necessidade do desenvolvimento de novas quimioterapias. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os mecanismos celulares e moleculares de novos derivados sintéticos híbridos isoxazolinas de seis membros/tiazolidina-2,4-diona com potencial atividade antiparasitária e imunomoduladora, associando ensaios *in silico* e *in vitro*. Para a avaliação *in silico*, foram realizados os estudos de docking molecular frente a alvos da leishmania, bem como a utilização das ferramentas online Pro-Tox II e SWISSADME, para obtenção das características físico-químicas, farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas dos compostos em análise. O modelo de QSAR foi obtido através da aplicação do método estatístico de correlação canônica. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada em macrófagos da linhagem RAW 264.7, através do método do MTT. A atividade leishmanicida foi avaliada frente a formas amastigotas e promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. O resultado do docking molecular demonstrou uma grande variação da afinidade das moléculas pelo sítio de ligação das enzimas usadas como alvos biológicos, sendo os ligantes 3G e 3H os que se destacaram em relação aos valores de *score*, na maior parte dos alvos avaliados. A correlação canônica gerou um modelo de QSAR estável (R^2 canônico de 0,862), demonstrando principalmente uma forte correlação entre a variável independente de lipofilicidade (LogP) e a variável dependente de IC50 em *L. amazonensis*. A maioria dos compostos testados apresentou menos toxicidade que a Miltefosina, droga de referência utilizada no tratamento das leishmaniose. Com relação à atividade leishmanicida para a espécie de *L. infantum*, a molécula 3G foi o que apresentou o menor valor de IC50 (13,06 μ M) para promastigota. Para a espécie de *L. amazonensis*, o menor valor de IC50 foi do ligante 3H (10,25 μ M) para promastigota. Os compostos não demonstraram atividade para a forma evolutiva de amastigota em nenhuma das espécies avaliadas. Os resultados obtidos pelos ensaios *in vitro* corroboram com os resultados encontrados pelo docking molecular, identificando as moléculas 3G e 3H como as mais promissoras como leishmanicidas, e que apresentam mais afinidade (*in silico*) pela maior parte dos alvos avaliados. Os compostos 3G e 3H foram capazes de induzir a produção de IL-06 e IL-10,

importantes para o perfil Th2 e a regulação da atividade inflamatória. Diante disso, as abordagens aplicadas neste trabalho permitiram alcançar, em conjunto, um maior entendimento do potencial leishmanicida destas moléculas.

Palavras-chaves: Docking molecular; Imunomodulação; Leishmaniose; QSAR.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease caused by protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). The disease affects 98 countries, leaving more than 1 billion people at risk. The current treatment for this pathology has serious deficiencies, including high cost, route of administration, resistance to drugs and, especially, serious side effects, with the need for the development of new. The objective of this work was to evaluate the cellular and molecular mechanisms of new six-membered isoxazolines / thiazolidine-2,4-dione synthetic derivatives with potential antiparasitic and immunomodulatory activity, associating in silico and in vitro assays. For in silico evaluation, molecular docking studies were carried out against *Leishmania* targets, as well as the use of online tools: Pro-Tox II and SWISSADME to obtain the physical-chemical, pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological characteristics of the compounds in analyze. The QSAR model was obtained by applying the statistical method of canonical correlation. The cytotoxicity of the compounds was evaluated in macrophages of the RAW 264.7 strain, using the MTT method. Leishmanicidal activity was evaluated against amastigote and promastigote forms of *L. infantum* and *L. amazonensis*. The result of molecular docking demonstrated a great variation in the affinity of the compounds for the binding site of the enzymes used as targets, with compounds 3G and 3H being those that had the best score values in most of the evaluated targets. The canonical correlation generated a stable QSAR model (canonical R² of 0.8622), showing a strong correlation between the lipophilicity independent variable (LogP) and the IC₅₀ dependent variable in *L. amazonensis*. Most of the compounds tested showed less toxicity than the reference drug. Regarding the leishmanicidal activity for the species of *L. infantum*, the compound 3G was the one that obtained the lowest IC₅₀ value (13.06 μM) for promastigote. For the species of *L. amazonensis*, the lowest IC₅₀ value was of the compound 3H (10.25 μM) for promastigote. The compounds showed no activity for the evolutionary form of amastigote in any of the evaluated species. The results obtained by the in vitro tests corroborate the results found by the virtual screening, identifying the 3G and 3H molecules as the most leishmanicidal and that have more affinity (in silico) for most of the evaluated targets. The 3G and 3H compounds were able to induce the production of IL-06 and IL-10, important for the Th2 profile and the regulation of inflammatory activity. In view of this, the approaches applied in this work

allowed to achieve, together, a greater understanding of the leishmanicidal potential of these molecules.

Keywords: Molecular docking; Immunomodulation; Leishmaniasis; QSAR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição mundial da LV no ano de 2019.	28
Figura 2 – Incidência de leishmaniose visceral por 100.000 habitantes por segundo nível administrativo subnacional, Região das Américas, 2019.	29
Figura 3 – Distribuição mundial da LC no ano de 2019.....	29
Figura 4 – Incidência de leishmaniose cutânea/mucosa por 100.000 habitantes, segundo nível administrativo subnacional, Região das Américas, 2019.....	30
Figura 5 – Representação das formas da leishmania sp.	31
Figura 6 – Fêmea de Flebotomíneo adulto, engurgitada	32
Figura 7 – Ciclo de vida da Leishmania	33
Figura 8 – Caracterização das formas clínicas da LT.....	34
Figura 9 – Evolução clínica da LV	36
Figura 10 – Estrutura química dos fármacos de primeira linha no tratamento à leishmaniose.	41
Figura 11 – Estrutura química dos fármacos de segunda linha no tratamento à leishmaniose.	41
Figura 12 – Estrutura química do anel de Isoxazolina	49
Figura 13 – Estrutura química no anel tiazolidina-2,4-diona.	50
Figura 14 – Estrutura geral dos compostos	61
Figura 15 – Fluxograma das principais etapas do cálculo de docking molecular	62
Figura 16 – BOILED-EGG.....	76
Figura 17 – Variação dos valores de score em cada alvo avaliado nas espécies de <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i>	82
Figura 18 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3J (Lado A) e 3E (Lado B) e o alvo (Adenina Fosforibosiltransferase).	86
Figura 19 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3O (Lado A) e 3A (Lado B) e o alvo (Adenina Fosforibosiltransferase).	87
Figura 20 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3F (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (CYP51).....	90
Figura 21 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3K (Lado A) e 3E (Lado B) e o alvo (CYP51).....	91
Figura 22 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase).	93

Figura 23 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3P (Lado A) e 3A (Lado B) e o alvo (Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase).	94
Figura 24 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3E (Lado B) e o alvo (Dihidroorotato desidrogenase).	97
Figura 25 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3B (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Dihidroorotato desidrogenase).	98
Figura 26 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).	100
Figura 27 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3C (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).	101
Figura 28 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Glicerol-3-fosfato desidrogenase).	104
Figura 29 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3G (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Glicerol-3-fosfato desidrogenase).	104
Figura 30 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3F (Lado A) e 3A (Lado B) e o alvo (Fosfodiesterase 1).	107
Figura 31 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3L (Lado A) e 3A (Lado B) e o alvo (Fosfodiesterase 1).	108
Figura 32 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3C (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (GlioxalaseII).	110
Figura 33 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3C (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Glioxalase II).	111
Figura 34 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3C (Lado A) e 3H (Lado B) e o alvo (Metionil-tRNA Sintetase).	114
Figura 35 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3P (Lado A) e 3G (Lado B) e o alvo (Metionil-tRNA Sintetase).	115
Figura 36 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3G (Lado A) e 3E (Lado B) e o alvo (Glicose-6-fosfato isomerase).	117
Figura 37 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3G (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Glicose-6-fosfato isomerase).	118
Figura 38 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3G (Lado A) e 3E (Lado B) e o alvo (Pteridina Redutase 1).	120
Figura 39 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3G (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Pteridina Redutase 1).	121

Figura 40 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3J (Lado A) e 3A (Lado B) e o alvo (Piruvato quinase).....	123
Figura 41 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3G (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Piruvato quinase).....	125
Figura 42 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3D (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Triose-fosfato isomerase).....	127
Figura 43 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Triose-fosfato isomerase).....	128
Figura 44 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3G (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Tripanotiona Redutase).	130
Figura 45 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3D (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Tripanotiona Redutase).	131
Figura 46 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3O (Lado A) e 3E (Lado B) e o alvo (Arginase).	134
Figura 47 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3C (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Arginase).	134
Figura 48 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3O (Lado A) e 3E (Lado B) e o alvo (Arginase).	137
Figura 49 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3O (Lado A) e 3L (Lado B) e o alvo (Arginase).	138
Figura 50 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3L (Lado A) e 3A (Lado B) e o alvo (Dihidroorotato desidrogenase).	140
Figura 51 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Dihidroorotato desidrogenase).	141
Figura 52 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3C (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Pteridina Redutase 1).	144
Figura 53 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3A (Lado B) e o alvo (Pteridina Redutase 1).	145
Figura 54 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Tripanotiona Redutase).	147
Figura 55 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3L (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Tripanotiona Redutase).	148

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Dados preditos de lipofilicidade.....	73
Gráfico 2 – Gráfico de correlação dos valores de atividade biológica prevista e experimentais para os 16 novos derivados sintéticos híbridos.....	152

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Substituintes dos compostos.....	61
Quadro 2 – Componentes utilizados para cálculo do docking molecular em alvos de <i>L. infantum</i>	65
Quadro 3 – Componentes utilizados para cálculo do docking molecular em alvos de <i>L. amazonensis</i>	65
Quadro 4 – Resultados in silico obtidos para predição da solubilidade em água dos compostos testados.	72
Quadro 5 – Resultados in silico da predição dos parâmetros farmacocinéticos de absorção do trato gastrointestinal (TGI), permeabilidade a barreira hematoencefálica (BBB) e substrato da glicoproteína P.....	74
Quadro 6 – Resultados in silico da capacidade de inibição das enzimas do citocromo P450.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores normalizados dos descritores químicos que obtiveram correlação linear considerável com os descritores biológicos.....	68
Tabela 2 – Resultados <i>in silico</i> da violação ou não das regras de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge. Numeração representa quantidade de violação.	78
Tabela 3 – Resultados <i>in silico</i> da toxicidade aguda, classificação de toxicidade e porcentagem de similaridade e acurácia dos compostos testados.	79
Tabela 4 – Relatório de toxicidade <i>in vitro</i> dos compostos.....	80
Tabela 5 – Valores de score (ChemPLP) para as principais soluções de docking dos compostos em seus estereoisômeros para a Adenina Fosforibosiltransferase.....	84
Tabela 6 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Adenina Fosforibosiltransferase).	85
Tabela 7 – Valores de score (ChemPLP) para as principais soluções de docking dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Esterol 14-Desmetilase (CYP51).	87
Tabela 8 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Esterol 14-Desmetilase)	88
Tabela 9 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase.....	91
Tabela 10 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase).	92
Tabela 11 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Dihidroorotato desidrogenase.....	95
Tabela 12 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Dihidroorotato desidrogenase)	96
Tabela 13 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	98
Tabela 14 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).	99
Tabela 15 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Glicerol-3-fosfato desidrogenase	102

Tabela 16 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Glicerol-3-fosfato desidrogenase).	102
Tabela 17 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Fosfodiesterase 1.	105
Tabela 18 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Fosfodiesterase 1).	106
Tabela 19 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Glioxalase II	108
Tabela 20 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Glioxalase II.).	109
Tabela 21 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Metionil-tRNA Sintetase	112
Tabela 22 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Metionil-tRNA Sintetase).	112
Tabela 23 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Glicose-6-fosfato isomerase	115
Tabela 24 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Glicose-6-fosfato isomerase).	116
Tabela 25 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Pteridina Redutase 1 (PTR1).	118
Tabela 26 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Pteridina Redutase 1).	119
Tabela 27 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Piruvato quinase	122
Tabela 28 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Piruvato quinase.).	122
Tabela 29 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Triose-fosfato isomerase.	125
Tabela 30 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Triose-fosfato isomerase).	126
Tabela 31 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Tripanotiona Redutase	129
Tabela 32 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Tripanotiona Redutase).	129

Tabela 33 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a Arginase	132
Tabela 34 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Arginase).	132
Tabela 35 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Arginase	135
Tabela 36 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Arginase).	136
Tabela 37 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Dihidroorotato desidrogenase	138
Tabela 38 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Dihidroorotato desidrogenase).	139
Tabela 39 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Pteridina Redutase 1 (PTR1).	142
Tabela 40 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Pteridina Redutase 1).....	142
Tabela 41 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as principais soluções de <i>docking</i> dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Tripanotiona Redutase	145
Tabela 42 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Tripanotiona Redutase).	146
Tabela 43 – Correlação canônica de resposta biológica ou variável dependente (pIC_{50} <i>L. amazonensis</i> , pIC_{50} <i>L. infantum</i> DL_{50} Macrófagos) com descritores químicos ou variável independente (LogP, LUMO e aceitadores de ligação de Hidrogênio).	149
Tabela 44 – Análise de correlação canônica.....	149
Tabela 45 – Cálculo dos índices de redundância para a primeira função canônica	150
Tabela 46 – Análise de redundância de variáveis estatísticas dependentes e independentes para ambas as funções canônicas.....	150
Tabela 47 – Pesos canônicos para as funções canônicas.....	151
Tabela 48 – Estrutura canônica	153
Tabela 49 – Análise de sensibilidade dos resultados de correlação canônica consequentes da remoção de uma variável independente.	155
Tabela 50 – Atividade citotóxica (CC_{50} μ M) dos compostos frente a macrófagos (Raw 264.7).	156

Tabela 51 – Atividade leishmanicida (IC ₅₀ em µM) dos compostos frente as formas evolutivas amastigota e promastigota de <i>L. infantum</i>	157
Tabela 52 – Índices de seletividade (ISE) de novos compostos relativos às formas amastigota e promastigota de <i>L. infantum</i> . NS significa que não houve seletividade.....	158
Tabela 53 – Atividade leishmanicida (IC ₅₀ em µM) dos compostos frente as formas evolutivas amastigota e promastigota de <i>L. infantum</i>	159
Tabela 54 – Índices de seletividade (ISE) de novos compostos relativos às formas amastigota e promastigota de <i>L. amazonensis</i> . NS significa que não houve seletividade.....	160
Tabela 55 – Quantificação de IL-10 em sobrenadantes esplenócitos tratados por 24h e 48h com os compostos 3G e 3H.	161
Tabela 56 – Quantificação de IL-6 em sobrenadantes esplenócitos tratados por 24h e 48h com os compostos 3G e 3H.	162

LISTA DE ABREVIACOES

ACC	Análise de correlao canônica
AMP	Adenosina Monofosfato
APC	Células apresentadoras de antígeno
APPT	Adenina Fosforribosiltransferase
ARG	Arginina
ASN	Asparagina
ASP	Aspartato (cido aspartico)
AZT	Zidovudina
cAMP	Adenosina 3',5'-Monofosfato
cGMP	Monofosfato Cíclico de Guanosina
CC ₅₀	Concentrao capaz de causar a perda de viabilidade em 50% das células
CYS	Cisteína
CYP51	Esterol 14-Desmetilase
DHAP	Fosfato de Dihidroxiacetona
DHDD	Dihidroorotato Desidrogenase
DL	Dose Letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	cido Desoxirribonucleico
DNDi	Drugs for Neglected Diseases initiative
dTMP	Monofosfato de Desoxitimidina
dUMP	Monofosfato de Desoxiuridina
dUTPase	Desoxiuridina 5'-Trifosfato Nucleotidohidrolase
dUTP	Trifosfato de Desoxiuridina
dTTP	DesoxiTimidina Trifosfatada
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme-linkedimmunosorbent assay</i>)
EROs	Espécies Reativas do Oxignio
GAP	Gliceraldeído 3-Fosfato

GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
GHS	<i>Globally Harmonised System</i>
GLU	Glutamato (Ácido glutâmico)
GLN	Glutamina
GSH	Glutathiona
HIS	Histidina
HIV-TR	Transcriptase Reversa do HIV
IC ₅₀	Concentração de Inibição de 50% do crescimento
IDRM	Teste Intradermoreação de Montenegro
IFN- γ	Interferon gama
IFI	Imunofluorescência Indireta
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ILE	Isoleucina
IDRM	Teste Intradermoreação de Montenegro
iNOS	Óxido nítrico síntase induzível
LASOF	Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos
LBDD	<i>Structure based Drug Design</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LEU	Leucina
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LTA	Leishmaniose tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
LYS	Lisina
MET	Metionina
MS	Ministério da Saúde
MW	Peso Molecular
MV	Raio Molecular
NLC	Carreadores lipídicos nanoestruturados

ODC	Ornitina Descarboxilase
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PHE	Fenilalanina
PKA	Proteína Quinase A
PMF	Potencial de Força Média
PRO	Prolina
PTR1	Pteridina redutase 1
PP-ribose-P	5-fosforribosil-1-pirofosfato
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
QSAR	Relação quantitativa estrutura atividade (<i>Quantitative StructureActivity Relationship</i>)
RCSB	<i>Research Collaboratory for Structural Biology</i>
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA	Ácido Ribonucleico
SBDD	<i>Ligand Based Drug Design</i>
SER	Serina
SLN	Nanopartículas sólidas lipídicas
SMILES	<i>Simplified Molecular Input Line Entry System</i>
TGF- β	Fator beta de crescimento e transformação
TGI	Trato Gastrointestinal
Th	Linfócito T auxiliar
THR	Treonina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TPI	Triose Fosfato Isomerase
TPSA	<i>Topological Polar Surface Area</i>
TR	Tripanotiona Redutase
TRP	Triptofano (Triptofana)
TryR	Tripanotiona Redutase
TS	Timidilato Sintase
T[SH] ₂	Tripanotiona

TYR	Tirosina
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VAL	Valina
WHO	World Health Organization

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVOS.....	27
1.1.1 Objetivo geral.....	27
1.1.2 Objetivos específicos.....	27
2 REFERENCIAL TEÓRICO	28
2.1 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES	28
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO E VETORES.....	30
2.3 CICLO BIOLÓGICO E MODO DE TRANSMISSÃO	32
2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE.....	34
2.5 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE	37
2.6 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE	40
2.7 ALVOS MOLECULARES DE <i>LEISHMANIA</i> SP. COM IMPORTÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS PARA LEISHMANIOSE	43
2.7.1. Adenina Fosforibosiltransferase	43
2.7.2 Arginase.....	44
2.7.3 Tripanotiona Redutase.....	44
2.7.4 Dihidroorotato desidrogenase	45
2.7.5 Glioxalase II	45
2.7.6 Pteridina Redutase (PTR1).....	45
2.7.7 Triose-fosfato isomerase.....	46
2.7.8 Metionil-tRNA Sintetase	46
2.7.9 Fosfodiesterase 1	47
2.7.10 Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase	47
2.7.11 Enzimas da via glicolítica.....	48
2.7.11 Esterol 14-Desmetilase (CYP51).....	49
2.8 ISOXAZOLINAS E TIAZOLIDINA-2,4-DIONA	49
2.9 METODOLOGIAS <i>IN SILICO</i> APLICADAS À DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS	51
2.8.1 Ensaios de <i>Docking</i> Molecular.....	52
2.8.2 Relação Quantitativa entre Estrutura e Atividade (QSAR).....	55
2.8.2.1 Análise de correlação canônica (ACC).....	56

3 MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.7 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS	61
3.8 ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	62
3.2.1. Obtenção das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas	62
3.2.2 Docking Molecular	62
3.2.2.1 Obtenção das estruturas em 3D dos ligantes para cálculo de docking	63
3.2.2.2 Execução dos cálculos de docking	64
3.2.2.3 Modelagem por homologia.....	64
3.2.2.4 Programa GOLD.....	64
3.2.2.5 Análise das interações intermoleculares	66
3.2.3 Modelos de QSAR	67
3.2.3.1 Obtenção dos descritores para QSAR	67
3.2.3.2 Análise de correlação canônica e construção do modelo de QSAR.....	67
3.3 ANÁLISES <i>IN VITRO</i>	68
3.3.1 Citotoxicidade	68
3.3.2 Ensaio com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	69
3.3.3 Ensaio com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	70
3.3.4 Obtenção de sobrenadante de cultura de células esplênicas	70
3.3.5 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo	71
3.3.6 Análise estatística	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.1 ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	72
4.1.1 Predição das características farmacocinéticas e físico-químicas dos compostos	72
4.1.2 Predição da toxicidade dos compostos	79
4.1.3 Docking Molecular	81
4.1.3.1 <i>L. infantum</i>	83
4.1.3.1.1 Adenina Fosforibosiltransferase	83
4.1.3.1.2 Esterol 14-Desmetilase (<i>CYP51</i>).....	87
4.1.3.1.3 Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase	91
4.1.3.1.4 Dihidroorotato desidrogenase.....	95
4.1.3.1.5 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	98
4.1.3.1.6 Glicerol-3-fosfato desidrogenase	101
4.1.3.1.7 Fosfodiesterase 1.....	105

4.1.3.1.8	<i>Glioxalase II</i>	108
4.1.3.1.9	<i>Metionil-tRNA Sintetase</i>	111
4.1.3.1.10	<i>Glicose-6-fosfato isomerase</i>	115
4.1.3.1.11	<i>Pteridina Redutase 1 (PTR1)</i>	118
4.1.3.1.12	<i>Piruvato quinase</i>	121
4.1.3.1.13	<i>Triose-fosfato isomerase</i>	125
4.1.3.1.14	<i>Tripanotiona Redutase</i>	128
4.1.3.1.15	<i>Arginase</i>	131
4.1.3.2	<i>L. amazonensis</i>	135
4.1.3.2.1	<i>Arginase</i>	135
4.1.3.2.2	<i>Dihidroorotato desidrogenase</i>	138
4.1.3.2.3	<i>Pteridina Redutase 1 (PTR1)</i>	141
4.1.3.2.4	<i>Tripanotiona Redutase</i>	145
4.1.4	Análise Modelo de QSAR através de Análise de correlação canônica	148
4.2	ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	156
4.2.1	Atividade citotóxica	156
4.2.2	Atividade leishmanicida	157
4.2.2.1	<i>L. infantum</i>	157
4.2.2.2	<i>L. amazonensis</i>	159
4.2.3	Atividade imunomoduladora	161
5	CONCLUSÃO	164
6	PERSPECTIVAS	166
	REFERÊNCIAS	167

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidos através da picada do flebotomíneo. A doença é endêmica em 98 países com mais 1 bilhão de pessoas vivendo em áreas endêmicas correndo o risco de contrair a infecção, caracterizando-a então como um risco a saúde pública nos países tropicais e subtropicais subdesenvolvidos (WHO, 2020). No Brasil, o Ministério da Saúde relata uma incidência de 28 mil casos por ano (SOUZA et al., 2010), estando presente em todos as regiões.

Considerada uma das doenças tropicais mais negligenciadas no mundo, acomete a população que possui menores recursos socioeconômicos e menor acesso à saúde, sendo responsável por uma variedade de manifestações clínicas. A depender da espécie infectante e da resposta imune do hospedeiro, podem causar quadros que afetam o sistema fagocítico mononuclear, particularmente a medula óssea, fígado, baço e gânglios, estabelecendo a forma visceral, também conhecida como calazar, ou lesões cutâneas e/ou mucosas desenvolvendo o quadro da leishmaniose tegumentar ou cutânea (SANTOS et al., 2012; RIO DE JANEIRO, 2019). No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), apresentação da forma cutânea (LC) e mucocutânea (LMC) da leishmaniose, é responsável por 90% de todos os casos da doença no país, apresentando uma ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras (BRASIL, 2017; VASCONCELOS et al., 2018).

A primeira escolha para a terapêutica da leishmaniose é a utilização de medicamentos à base de antimônio. Atualmente, existem duas formulações de antimoniais pentavalentes disponíveis no mercado internacional: o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, sendo este último não comercializado no Brasil (BRASIL, 2017). O antimoniato de meglumina é especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral, provocando regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como a esterilização do parasita (RATH et al., 2003). Apesar de sua eficiência contra o parasita, o atual tratamento para essa patologia tem sérias deficiências, incluindo alto custo, via de administração e, especialmente, efeitos colaterais sérios como pancreatite, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e distúrbios gastrointestinais (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). O tratamento descontínuo, associado à necessidade de serviços de maior complexidade para sua administração, além das baixas dosagens levaram a ocorrência de falhas terapêuticas e consequentemente aumento das formas resistentes de parasitas (SUNDAR et al., 2001; RATH

et al., 2003), havendo a necessidade então do desenvolvimento de novas quimioterapias mais eficazes e com menos efeitos colaterais.

Nessa busca para o desenvolvimento de um potencial inibidor, na química medicinal, o grupo isoxazolina é de extrema importância e desperta grande interesse em estratégias sintéticas que buscam a obtenção de compostos com potencial atividade biológicas. Dentre as atividades descritas na literatura estão: atividade anti-inflamatória, anticonvulsivante, anticâncer, antimicrobiana, entre outras (HABEEB; PRAVEEN RAO; KNAUS, 2001; LEPAGE; HUBLOT, 1991; KHAZIR et al., 2013; GAONKAR; RAI; PRABHUSWAMY, 2007). Outro grupo de interesse que possui grande relevância para o desenvolvimento de potenciais fármacos é o grupo tiazolidina-2,4-diona, que têm demonstrado possuir atividade antimicobactéria, anticâncer, antitumoral, anti-inflamatório, entre outras (TROTSCO et al., 2020; FUJII et al. 2018; SINGH et al., 2019; SHARMA et al., 2019). Logo, espera-se que a obtenção de novos derivados híbridos, para esses dois grupos de interesse, possa resultar na potencialização de suas ações e potencial ação leishmanicida.

As metodologias *in silico* surgem como uma alternativa para a descoberta de potenciais novas drogas, por ser capaz de resolver problemas como o alto custo e o processo demorado associado as metodologias tradicionais (GELDENHUYS, 2006). Atualmente o planejamento racional de fármacos pode ser feito através de dois métodos: baseados na estrutura do alvo ("SBDD - *Structure Based Drug Design*"), como o *docking* molecular, e baseados na estrutura do ligante ("LBDD - *ligand based Drug Design*"), como os modelos de QSAR. Devido ao alto grau de sinergismo e complementaridade de conhecimentos entre essas diferentes abordagens, sua combinação pode gerar informações importantes no processo da descoberta de novas drogas, economizando a síntese e testes experimentais de moléculas que não apresentariam atividade biológica satisfatória, segundo os modelos preditivos *in silico*.

Tendo em vista a importância do desenvolvimento de novas quimioterapias mais eficazes e com menos efeitos colaterais contra a leishmaniose, o presente estudo tem o objetivo de associar ensaios *in silico* e *in vitro*, buscando elucidar os mecanismos moleculares e celulares de novos derivados sintéticos contra o agente etiológico da leishmaniose. A atividade leishmanicida de 16 derivados sintéticos híbridos foi avaliada, determinando a toxicidade desses compostos sobre macrófagos e a atividade sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *infantum*. Estes ensaios permitirão investigar potenciais mecanismos de ação que contribuirão com a elucidação para adequada eleição de protótipos a fármacos leishmanicidas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial leishmanicida de novos derivados sintéticos híbridos isoxazolininas de seis membros/tiazolidina-2,4-diona.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar características físico-químicas e farmacocinéticas dos compostos utilizando ferramentas computacionais *online* de predição;
- Realizar a predição de alvos biológicos que possam estar envolvidos no mecanismo de ação dos compostos utilizando o *Docking* Molecular;
- Analisar as interações intermoleculares entre as moléculas estudadas e os possíveis alvos biológicos;
- Obter modelos de QSAR (Relações Quantitativas entre a Estrutura e Atividade);
- Determinar a atividade citotóxica das substâncias obtidas por meio sintético sobre macrófagos;
- Avaliar o efeito dos compostos sobre formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. infantum* e *L. amazonensis*, *in vitro*;
- Quantificar a produção das citocinas IFN- γ (interferon-gama), TNF- α (fator de necrose tumoral alpha), IL (interleucina)-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 em sobrenadantes de cultura de células esplênicas após tratamento *in vitro* com os compostos;

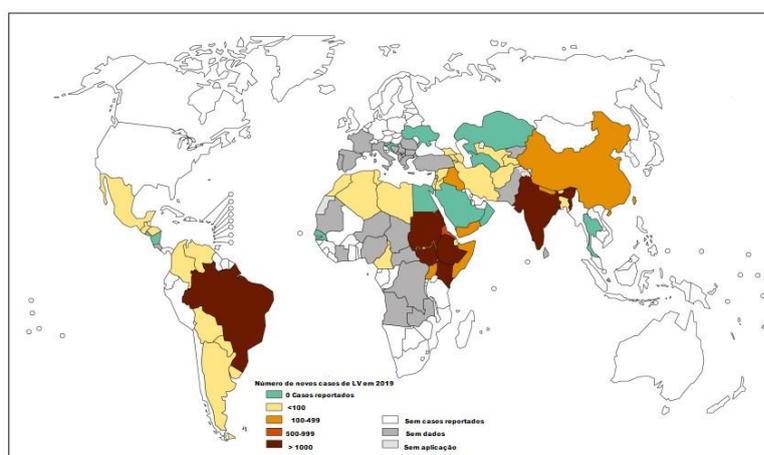
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

A leishmaniose é um grupo de doenças, classificadas como negligenciadas, causada por parasitas protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). A doença afeta 98 países, deixando mais de 1 bilhão de pessoas em risco (DNDi, 2020). É uma antropozoonose considerada um grande problema de saúde pública, com manifestações clínicas variadas e diversidade epidemiológica (BRASIL, 2017). Esta doença apresenta prevalência estimada de 700.000 a 1 milhão de novos casos anualmente (WHO, 2020). A depender da espécie de *Leishmania* envolvida e do estado imune do hospedeiro, a doença pode se manifestar na forma visceral (Leishmaniose visceral - LV) ou cutânea (Leishmaniose Tegumentar Americana – LTA) (GURUNG; KANNEGANTI, 2015; BRASIL, 2014).

A LV, também conhecida como calazar, é a forma mais severa da doença, podendo ser fatal em 85-90% dos pacientes não tratados. Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram em todo o mundo a cada ano, dos quais apenas 25 a 45% são relatados à OMS (WHO, 2020). Afeta populações economicamente vulneráveis em mais de 80 países incluídos na Ásia, África Oriental, América do Sul e a região do Mediterrâneo, ilustrado na figura 1. Os sete países mais afetados: Brasil, Índia, Etiópia, Quênia, Sudão do Sul, Somália e Sudão, representam mais de 90% dos novos casos (DNDi, 2020).

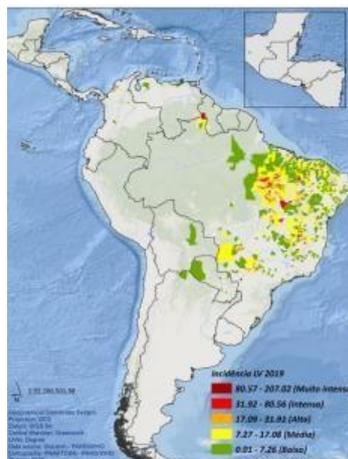
Figura 1 – Distribuição mundial da LV no ano de 2019.



Fonte: Who - World Health Organization (2019).

No Brasil, no período de 2003 a 2018, foram confirmados mais de 51 mil casos humanos, com incidência média de 1,7 casos/100 mil habitantes, variando de 1,4 a 2,1 e letalidade de 7,2% (BRASIL, 2019). A figura 2 demonstra a distribuição da LV no território das Américas.

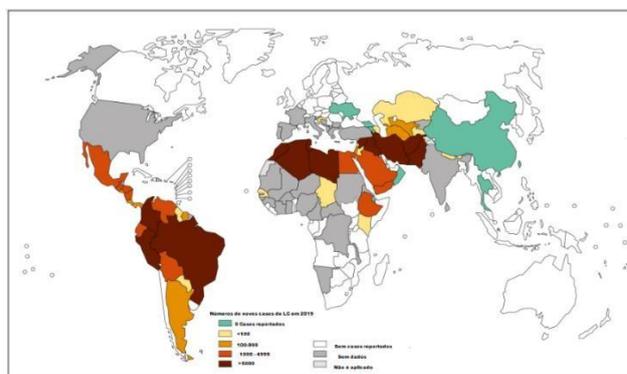
Figura 2 – Incidência de leishmaniose visceral por 100.000 habitantes por segundo nível administrativo subnacional, Região das Américas, 2019.



Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados notificados pelos programas nacionais de leishmanioses/ serviços de vigilância.

A leishmaniose tegumentar Americana (LTA) ou leishmaniose cutânea (LC) constitui um problema de saúde pública em 85 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), essa distribuição é demonstrada na figura 3. A maioria dos casos ocorre no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria e estima-se que entre 600.000 a 1 milhão de novos casos ocorram em todo o mundo anualmente (WHO, 2020).

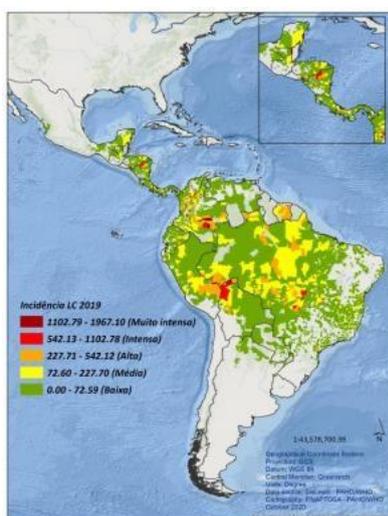
Figura 3 – Distribuição mundial da LC no ano de 2019.



Fonte: Who - World Health Organization (2019).

No Brasil, a partir da década de 80 nota-se um aumento no número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995), já no período de 1995 a 2014, verifica-se uma média anual de 25.763 casos novos registrados e coeficiente de detecção médio de 14,7 casos/100 mil habitantes. Entre 2003 e 2018, foram registrados mais de 300.000 casos, com média de 21.158 casos por ano. A figura 4 ilustra a distribuição de LC nas Americas. No território nacional, o coeficiente médio de detecção foi de 11,3 casos por 100.000 habitantes, variando de 5,7 – 17,8 (BRASIL, 2019). É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e a capacidade de produzir deformidades (BRASIL, 2017; DNDi, 2020; WHO, 2020).

Figura 4 – Incidência de leishmaniose cutânea/mucosa por 100.000 habitantes, segundo nível administrativo subnacional, Região das Américas, 2019.



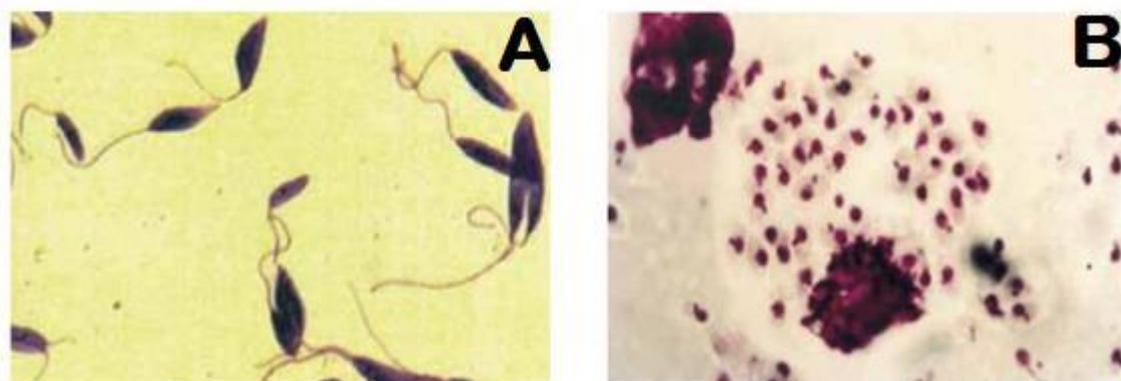
Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados notificados pelos programas nacionais de leishmanioses/serviços de vigilância).

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO E VETORES

O gênero *Leishmania* pertence a ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae e agrupa espécies de protozoários unicelulares, digenéticos (heteroxenos), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro (NEVES, 2005). São parasitas intracelulares obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas

principais (figura 5): uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor que é fusiforme, apresenta núcleo central e possui flagelo, organela relacionada à locomoção do parasito, e outra aflagelada ou amastigota, não apresenta flagelo visível e é encontrada no interior dos fagolisossomos dos macrófagos. (BRASIL, 2007; DE OLIVEIRA; SACRAMENTO e MARQUES, 2011).

Figura 5 – Representação das formas da *Leishmania*.



Fonte: MS – Ministério da saúde (2007).

Legenda: A) Promastigota. B) Amastigota.

Esses parasitas são classificados em 2 subgêneros: i) Subgênero *Leishmania*: parasitos do homem e de outros mamíferos, com o desenvolvimento nos insetos vetores limitados ao intestino nas regiões média e anterior; ii) Subgênero *Viannia*: parasitos do homem e de outros mamíferos, apresentando nos insetos vetores as formas paramastígotas e promastígota. As paramastígotas encontram-se aderidas as paredes do intestino (píloro e/ou íleo) pelo flagelo, através de hemidesmossomos, e as promastígotas, formas livres, que migram do intestino posterior para as regiões média e anterior (NEVES, 2005).

Atualmente nas Américas são reconhecidas 11 espécies causadoras da leishmaniose tegumentar em humanos e oito espécies descritas, somente em animais. No entanto, no Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste. (BRASIL, 2007). Já para os casos de leishmaniose visceral, no novo mundo, a *L. (L.) infantum* é a espécie comumente isolada nos pacientes (BRASIL, 2014).

Os vetores desses parasitas são insetos denominados flebotomíneos (figura 6) pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero

Lutzomyia (BRASIL, 2007). Existem cerca de 500 espécies de flebotomíneos conhecidos, mas apenas cerca de 30 foram encontrados com potencial para transmitir leishmaniose (WHO, 2020). No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei* (BRASIL, 2007). Já para a LV as espécies que estão relacionadas a transmissão são: *L. longipalpis* ou *L. cruzi* (BRASIL, 2014).

Figura 6 – Fêmea de Flebotomíneo adulto, engurgitada.



Fonte: MS – Ministério da Saúde (2007).

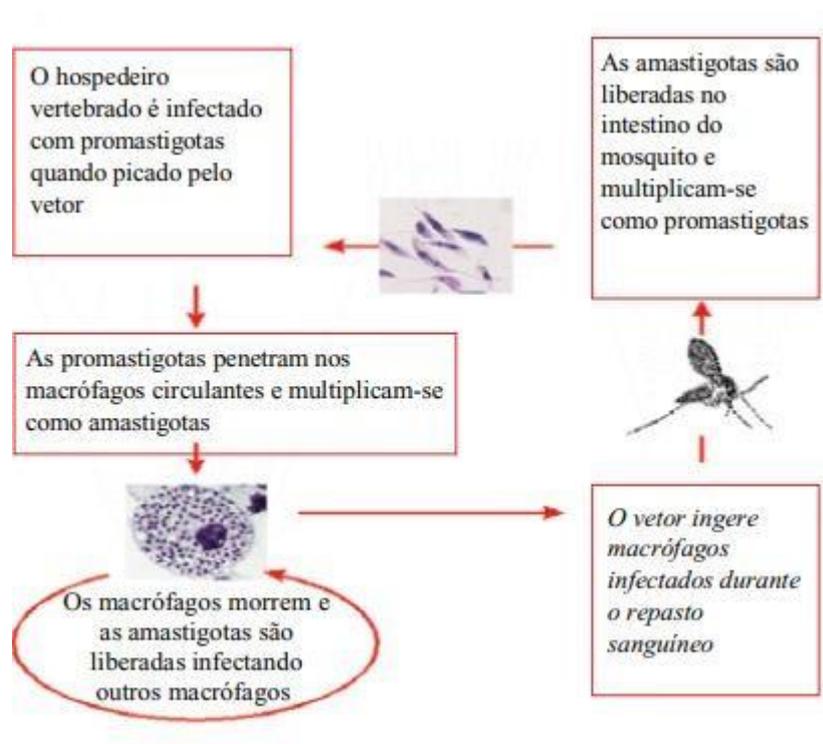
2.3 CICLO BIOLÓGICO E MODO DE TRANSMISSÃO

O principal modo de transmissão é através da picada de insetos transmissores infectados, porém outras formas de transmissão já foram relatadas na literatura, como por meio transfusional e transmissão sexual (JIMENEZ-MARCO et al., 2016; DEY et al., 2006; SINGH; SEHGAL, 2010; TURCHETTI et al., 2014). De maneira geral para todas as espécies de *Leishmania* spp., o ciclo se inicia com a contaminação do vetor através da ingestão de sangue de um hospedeiro vertebrado contendo macrófagos que possuem amastigotas no seu interior. No trato digestivo anterior ocorre a lise do macrófago infectado com a forma amastigotas que se transformam em promastigotas e se aderem às microvilosidades do intestino médio do inseto através de hemidesmossomas. Nesta fase, ocorre novamente a transformação para a forma paramastigota, onde continuam se reproduzindo e transformando-se, após alguns dias em promastigotas metacíclicos, que são muito móveis e perdem a capacidade de divisão. Os

promastigotas metacíclico migram através do estômago e colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo e são injetados com a saliva durante o próximo repasto sanguíneo. A metaciclogênese ocorre durante a migração no trato digestivo do vetor, em que as células atingem um estado infectivo. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas (SACKS; KAMHAWI, 2001; BRASIL, 2007; BASANO, 2004; BATES, 2007).

O vetor, agora infectado, faz o repasto sanguíneo, ocorrendo a transmissão do parasita. Na epiderme do hospedeiro, a forma promastigota metaciclíca é fagocitada por células do sistema mononuclear fagocitário que sobrevivem aos mecanismos de defesa inatos do hospedeiro. Dentro dos macrófagos forma-se o fagossomo, onde as formas promastigotas metacíclicas sobrevivem e estabelecem as condições favoráveis para a diferenciação em amastigotas, que se multiplicam, lisam o macrófago, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea, repetindo o ciclo (figura 7). (SACKS; KAMHAWI, 2001; BRASIL, 2007).

Figura 7 – Ciclo de vida da *Leishmania*



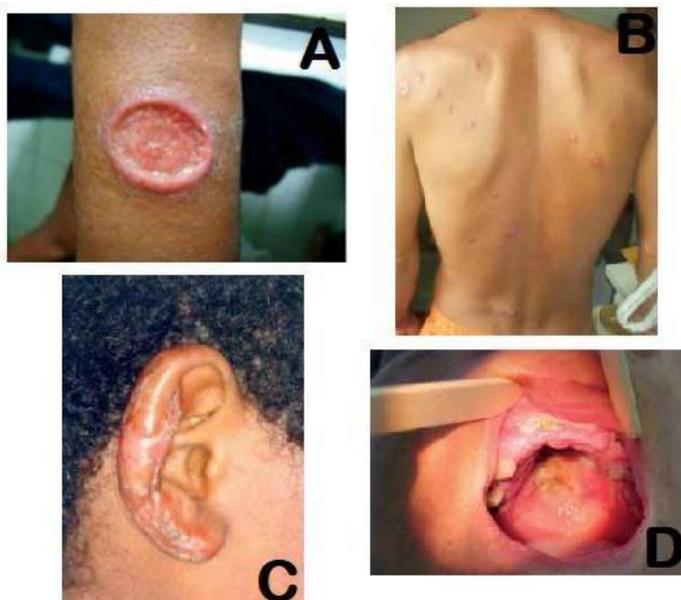
Fonte: Ministério da Saude (2007).

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE

Uma das características mais marcantes do gênero *Leishmania* é a diversidade das manifestações clínicas que depende da espécie de *Leishmania* envolvida e de sua relação com o hospedeiro (SARAVIA et al., 1989). Algumas espécies do parasita apresentam maior afinidade por macrófagos da epiderme e derme, causando a leishmaniose cutânea. Quando este tropismo é pelo tecido mucocutâneo origina a leishmaniose mucocutânea, já a afinidade pelo sistema reticuloendotelial ocasiona a leishmaniose visceral (KULKARNI et al., 2014).

A LTA pode se apresentar de forma assintomática ou através de um espectro de formas clínicas (figura 8) podendo variar desde lesões cutâneas localizadas, disseminadas, difusas ou nodulares até as graves lesões mucocutâneas (CLEM, 2010). A forma cutânea localizada se caracteriza por lesões únicas ou múltiplas na pele, geralmente no rosto, braços e pernas. Possui bordas elevadas, em moldura, geralmente indolor, com o fundo granuloso, podendo conter ou não exsudação. A lesão é geralmente do tipo úlcera, com tendência à cura espontânea e apresentando boa resposta ao tratamento. Na Região Norte, as lesões múltiplas são frequentemente causadas por *L. (V.) guyanensis* e parecem estar relacionadas às múltiplas picadas de *L. umbratilis* (HEPBURN, 2000; BELO HORIZONTE, 2007; BRASIL, 2007).

Figura 8 – Caracterização das formas clínicas da LT.



Fonte: MS- Ministério da saúde (2007).

Legenda: A) Forma cutânea Localizada - Lesão ulcerada franca, única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso. B) Forma cutânea Disseminada - Polimorfismo lesional (lesões nódulo infiltrativa, impetigóide, ulceradas pequenas) distribuídas na face posterior do tronco. C) Forma cutânea difusa – Lesão infiltrada com áreas descamativas na orelha (Tempo de doença 12 anos). D) Forma mucosa tardia – Lesão ulcerada do palato mole, com bordas infiltradas recobertas por exsudato (BRASIL, 2007).

A forma cutânea disseminada apresenta múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco. As lesões apresentam características clássicas de úlceras de fundo granuloso e bordas elevadas. As duas espécies reconhecidas como causadoras desta síndrome são a *Leishmania (V.) braziliensis* e a *Leishmania (L.) amazonensis*. A forma cutânea difusa apresenta lesões nodulares persistentes deformantes e muito graves, espalhando-se no corpo inteiro do paciente.

A espécie reconhecida como causadora desta síndrome é a *Leishmania (L.) amazonensis*. Já a forma mucocutânea, geralmente secundária às lesões cutâneas, afetam de maneira preponderante as mucosas da face, como fossas nasais e o palato, observa-se a infiltração das áreas atingidas, ulceração, perfuração do septo nasal, lesões ulcerovegetantes, ulcero-crostosas em cavidades nasal e ulcero-destrutivas. O agente etiológico que origina essa forma clínica em nosso país é a *L. (V.) braziliensis*, entretanto já foram citados casos na literatura atribuídos a *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (HEPBURN, 2000; BELO HORIZONTE, 2007; BRASIL, 2007).

No Brasil, a principal forma de transmissão da LV é através da picada dos vetores - *L. longipalpis* ou *L. cruzi* – infectados pela *Leishmania (L.) infantum*. De acordo com a evolução clínica da leishmaniose visceral, podemos dividi-la em três períodos (figura 9):

- Período inicial ou Fase Aguda: o paciente apresenta febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. Muitas vezes o paciente apresenta tosse e diarreia.
- Período de Estado: a partir evolução clínica com mais de 2 meses, o paciente passa a apresentar febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia.
- Período Final: se caracteriza com a evolução da parasitose sem o tratamento e diagnóstico apropriado, ocorrendo febre contínua e com emagrecimento progressivo, conduzindo o paciente para desnutrição protéico-calórica, caquexia acentuada, mesmo com apetite preservado. Aparecem quadros de hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite, podendo levar o paciente a óbito (BRASIL, 2007; NEVES, 2005).

Figura 9 – Evolução clínica da LV.



Fonte: MS – Ministério da Saúde (2014)

Legenda: A) Período Inicial ou Fase Aguda. B) Período de Estado. C) Período Final

As principais formas de diagnóstico laboratorial para a leishmaniose consiste fundamentalmente de três grupos de exames: parasitológicos, imunológicos e moleculares. Embora não esteja definido o teste padrão-ouro na LT, a pesquisa direta apresenta vantagens como ser rápida, de fácil execução e ter menor custo. É realizada através dos procedimentos de escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa (BRASIL, 2007). A

especificidade destes métodos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no mesmo tecido (GONTIJO; MELO, 2004).

Dentre os métodos sorológicos, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é utilizado. É uma técnica sensível, porém com possibilidade de reações cruzadas especialmente com a doença de Chagas e LV. Devido a reduzida antigenicidade do parasita ou os baixos níveis de anticorpo circulante a RIFI apresenta resultados variáveis e não deve ser utilizada como critério isolado para diagnóstico de LTA, podendo ser associada ao Teste Intradermoreação de

Montenegro (IDRM) ou técnicas parasitológicas, no diagnóstico diferencial com outras doenças, especialmente nos casos sem demonstração de qualquer agente etiológico (BRASIL, 2007; KAR, 1995; GONTIJO; MELO 2004).

O IDRM baseia-se na visualização da resposta de hipersensibilidade celular retardada. Possui um grande valor presuntivo no diagnóstico de LTA, estimando-se uma positividade de 84% e 100% nas formas cutâneas e mucocutânea, respectivamente, e resultados negativos na forma cutânea difusa, lesões recentes e pacientes imunodeprimidos. (SHAW; LAINSON, 1975; VEGA-LÓPEZ, 2003).

Outros autores avaliaram a persistência de anticorpos IgG, durante o desenvolvimento da LTA, utilizando-se o ensaio imunoenzimático- ELISA (MENDONÇA et al., 2004). Diante das limitações existentes (reatividade cruzada em virtude dos antígenos existentes), sobretudo

das técnicas de IFI e ELISA, abordagens imunológicas sorológicas alternativas vêm sendo desenvolvidas. Uma delas é a citometria de fluxo (CF) (OLIVEIRA et al., 2013).

A LV se caracteriza por uma marcada estimulação policlonal de linfócitos B, que resulta em hipergamaglobulinemia, que caracteriza a resposta específica, através da produção de imunoglobulinas G (IgG e IgM), com grande produção de proteínas inespecíficas, favorecendo o diagnóstico através de testes sorológicos (GONTIJO; MELO, 2004; NEVES, 2005). Técnica como de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA), são geralmente utilizados. O teste mais utilizado é o IFI, por apresentar fácil execução e uma sensibilidade alta na detecção de casos de LV (NEVES, 2005).

Em 2010 o Ministério da saúde passou a recomendar a utilização do teste imunocromatográfico (Teste rápido) com antígeno rK39 pelos estados e municípios, para diagnóstico da LV. Esta metodologia apresenta sensibilidade de 93% e especificidade de 97%, se tornando essencial para o diagnóstico acurado e rápido da LV, contribuindo dessa forma para a redução da letalidade associada às complicações tardias da doença (ASSIS et al., 2008).

A IDRM não costuma ser utilizado por se apresentar sempre como negativa na progressão da patologia, positivando apenas após o período de cura (BRASIL, 2007). A punção aspirativa esplênica é o método que oferece maior sensibilidade (90-95%) para demonstração do parasita, porém são procedimentos invasivos e exigem ambientes apropriados para a coleta, sendo assim inadequados para estudos epidemiológicos em larga escala (SUNDAR; RAI, 2002).

A técnica molecular da reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta sensibilidade diagnóstica que chega a 88% quando comparado a outros métodos como esfregaço (51%), cultura (47%) e o exame histopatológico (35%), segundo dados do estudo de revisão de Davies et al. (2000). Porém devido exigências técnicas e o custo relativamente elevado, é uma técnica pouco utilizada na rotina laboratorial, mais que acrescenta em sensibilidade quando utilizado com os métodos parasitológicos tradicionais (BRASIL, 2007; GONTIJO; MELO, 2004).

2.5 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE

A resposta imune observada em humanos frente a leishmaniose é dependente de célula T em todas as formas clínicas da doença, sendo desencadeada um perfil de citocinas Th1 ou Th2, relacionados com a resistência e susceptibilidade à infecção, respectivamente

(HOLZMULLER; BRAS-GONÇALVES; LEMESRE, 2006; REIS et al., 2006). Apesar da participação, em segundo plano dos anticorpos (resposta imune humoral), a expansão das células T CD4⁺ em um perfil do tipo 1 com produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12, tem sido associado com o controle e resistência a infecção, decorrente da ativação macrofágica e destruição parasitária (AMEEN, 2010; ROBERTS, 2006). Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β (perfil Th2), inibem a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos, que foram previamente ativados por IFN- γ , favorecendo dessa forma a multiplicação parasitária, e consequentemente, o desenvolvimento das formas clínicas da patologia (GOMES-SILVA et al., 2007). Como um mecanismo de resistência, a *Leishmania* consegue direcionar a diferenciação de células T para uma resposta do tipo Th2, e assim favorecer a infecção. (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; REIS et al., 2006).

A diferenciação celular dos linfócitos T em um perfil Th1 ou Th2 depende das citocinas produzidas pelos macrófagos e células dendríticas (células apresentadoras de antígeno - APC's) após o contato com a *Leishmania sp.* A produção de IL-12 e IFN- γ desencadeia a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ para um perfil Th1, enquanto que a produção de IL-4 pelas APC's estimula a diferenciação na subpopulação Th2 (REIS et al., 2006; SAKAGUCHI et al., 2008). A resposta imunológica humana também é influenciada pelas moléculas contidas na saliva dos flebótomos. Esses vetores são capazes de produzir substâncias que inibem as funções da célula T e a atividade dos macrófagos, levando ao aumento da secreção de prostaglandinas E2 e IL-4, ocasionando uma infecção exarcebada (de CAMPOS, et al., 2006).

Em humanos, a resposta imune frente a *Leishmania* não está tão esclarecida como a resposta em camundongos que são o modelo de infecção experimental utilizados para a devida elucidação da relação parasito-hospedeiro (NATALE; SEIXAS; DE ALMEIDA, 2016). A linhagem de camundongos C57BL/6, por exemplo, vem sendo estudada como um modelo de resistência a infecção por *Leishmania* devido a produção de baixos níveis de IL-4 quando infectados por diversos parasitas (HEINZEL et al., 1989; WATANABE et al., 2004). Esses animais são capazes de resolver de maneira espontânea a lesão cutânea provocada por *L. major* em infecções experimentais devido a presença de linfócitos T CD4⁺ (no fenótipo do tipo Th1) com altas concentrações de IFN- γ , que atua diretamente sobre os macrófagos, que são as principais células infectadas pelo parasito (MOSSER; EDWARDS, 2008; TRACEY et al., 2008).

A produção de TNF- α em combinação com o IFN- γ gera a ativação de macrófagos com alta atividade microbicida, capaz então de produzir ânions superóxido e radicais de oxigênio e nitrogênio resultando na morte do parasito intracelular (NATALE; SEIXAS; DE ALMEIDA,

2016). Além disso, esse modelo de resistência exibe também um aumento na produção de IL-12 que ativa células NK e células T CD4⁺ e CD8⁺ a produzirem IFN- γ , somatizando para o desenvolvimento da resposta Th1 (HOWARD; HALE; CHAN-LIEW, 1980; ROGERS et al., 2002).

Por outro lado, os modelos de susceptibilidade a infecção vêm sendo estudados utilizando camundongos BALB/c em que o perfil de diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ está polarizado em um perfil Th2, desenvolvido em um ambiente com altos níveis de IL-4 e baixos níveis de IFN- γ , resultando no aparecimento da doença de maneira progressiva e severa com um aumento na expressão de RNA mensageiro (mRNA) para IL-4 e na produção de IL-5, IL-10 e IL-13 (HIMMELRICH et al., 2000; KANE; MOSSER, 2001; PADIGEL et al., 2003; PASSERO et al., 2010). Camundongos BALB/c IL10^{-/-} se mostraram capazes de controlar a progressão da patologia quando infectados por *L. major*, indicando que a IL-10 age na inibição da ativação macrófagica, levando ao crescimento do parasito nas lesões (KANE; MOSSER, 2001).

Em humanos, observa-se que os perfis Th1 e Th2 não são bem definidos em indivíduos com processo clínico ativo, ambas citocinas ativadoras (IFN- γ , e IL-12) e supressoras (IL-10, IL-3, IL-4 e TGF) são detectadas (MURRAY et al., 2005). Na LTA, citocinas como IFN- γ e TNF e uma alta frequência de células B foram encontradas nas lesões decorrentes da forma cutânea, demonstrando o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1. Lesões mucocutâneas exibem citocinas pertencentes aos perfis Th1 e Th2, altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ são produzidas, além também da IL4. Essa resposta é fracamente regulada por IL-10 e TGF- β , mostrando que uma resposta inadequada do tipo Th1, considerada protetora na maioria das formas dessa doença, pode levar a uma imunopatogênese exacerbada (AMATO; ANDRADE; DUARTE, 2003; BACELLAR et al., 2002; JUNQUEIRA-PEDRAS et al., 2003). Na forma difusa foi encontrado um perfil Th2, com altos níveis de IL-4 (CÁCERES-DITTMAR et al., 1993; PIRMEZ et al., 1993; REIS et al., 2006).

A regulação das células efetoras locais é realizada pelas células T regulatórias (Treg) que se acumulam no local da lesão, promovendo a auto-tolerância imunológica e a regulação das respostas inflamatórias (BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018). Durante o curso da infecção por *L. major*, as Treg acumulam-se na derme, suprimindo, por mecanismos dependentes ou não de IL-10, a habilidade de células T efetoras CD4⁺ CD25⁻ eliminarem o parasito no sítio de infecção, logo favorecem a multiplicação precoce do parasito (de CAMPOS, et al., 2006; RIBEIRO et al., 1989). A relação entre células T efetoras e reguladoras nos sítios de infecção crônica podem refletir nas estratégias de sobrevivência da relação parasito-

hospedeiro, e essa compreensão influenciaria diretamente no desenvolvimento de novas estratégias quimioterápicas e profiláticas (BELKAID et al., 2002).

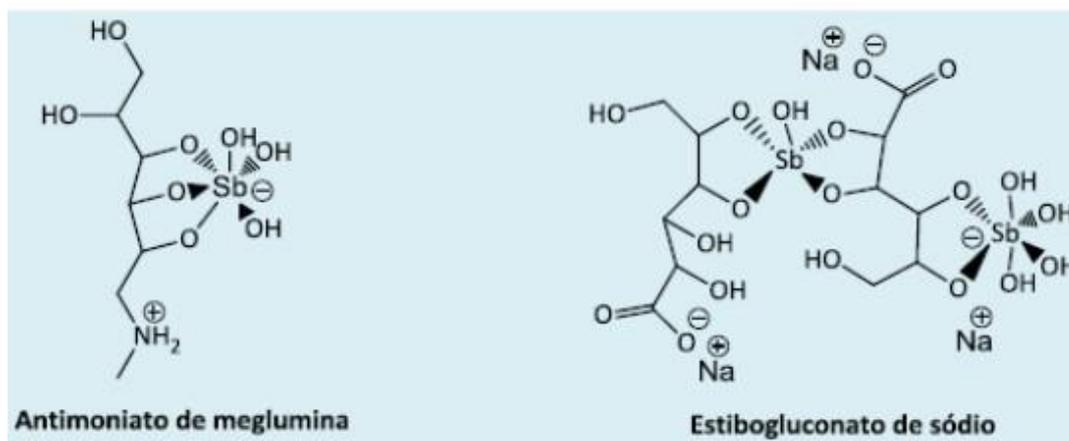
2.6 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Baseada na imunopatogênese da *Leishmania*, a eficácia de alguns tratamentos leishmanicidas depende do sistema imune do hospedeiro. O tratamento atual para leishmaniose induz efeito de morte direto no parasita nas formas promastigotas e nas formas amastigotas. Porém, a eficácia clínica do tratamento pode não depender do efeito direto desse tratamento; entretanto, uma efetiva resposta imune pode ter papel crítico na cura das infecções de leishmaniose em humanos (NO, 2016).

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e estibogliconato sódico (Pentostam[®]) são utilizados para o tratamento de todas as formas de leishmaniose, sendo o tratamento de primeira escolha (Figura 10). O mecanismo de ação preciso dos antimoniais pentavalentes permanece incerto. É pressuposto que várias enzimas de *Leishmania spp* sejam inibidas seletivamente. Esses agentes também parecem inibir a fosfofrutoquinase, com subsequente bloqueio da produção de adenosina trifosfato, indução do efluxo de glutathiona (GSH) e tripanotona ($T[SH]_2$) e a inibição da atividade da enzima tripanotona redutase (TryR) (WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004; ANVISA, 2020; WISHART et al., 2018; MURRAY et al., 2005).

Esses fármacos apresentam uma taxa de cura parasitológica superior a 90% frente a LV e LC (HALDAR; SEN; ROY, 2011). Contudo, o uso de antimoniais para o tratamento da leishmaniose é considerado insatisfatório em decorrência de fatores como o longo tempo de tratamento e incidência de efeitos adversos graves (ex. pancreatite, pancitopenia, neuropatias, elevação de aminotransferases séricas, insuficiência renal, hepática e cardiotoxicidade, inclusive com relatos de morte súbita) (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Aliado a isso, erros de dosagem, frequência, intervalo entre doses, além da descontinuidade da terapia têm contribuído para o desenvolvimento de resistência em regiões endêmicas, como a Índia e África (HALDAR; SEN; ROY, 2011).

Figura 10 – Estrutura química dos fármacos de primeira linha no tratamento à leishmaniose.



Fonte: MARIA; DE LIMA, 2013.

A pentamidina é um derivado sintético da amidina, que se mostrou eficaz contra diversos parasitas, incluindo a leishmania, se tornando uma alternativa para o uso dos antimoniais pentavalentes, e sua estrutura química pode ser vista na figura 11 (NGUEWA et al., 2005). Estudos na literatura demonstram sua efetividade e utilização para tratamento de LC em localidades onde há predomínio de *L. (V.) guyanensis* (de OLIVEIRA GUERRA et al., 2003; TALHARI et al., 1985; NEVES et al., 2011; ROBLEDO et al., 2006). As reações adversas mais frequentes são: dor, induração e abscessos estéreis no local da aplicação, além de náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaléia, hipotensão, lipotímias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia (BRASIL, 2007).

A droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente atualmente é a anfotericina B (Figura 11) (SIPOS, 1977). É a droga de escolha para o tratamento de grávidas e pacientes portadores do vírus do HIV com LV. Sua ação se baseia na ligação preferencial com esteróis (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática da Leishmania, nas formas promastigotas e amastigotas do parasita (BRASIL, 2014). Porém apresenta frequentes efeitos adversos, dose dependente que incluem febre, náuseas, vômitos, lesão tubular renal, hipocalcemia, anemia e flebite no local da infusão, possuindo assim o uso limitado (PALUMBO, 2009).

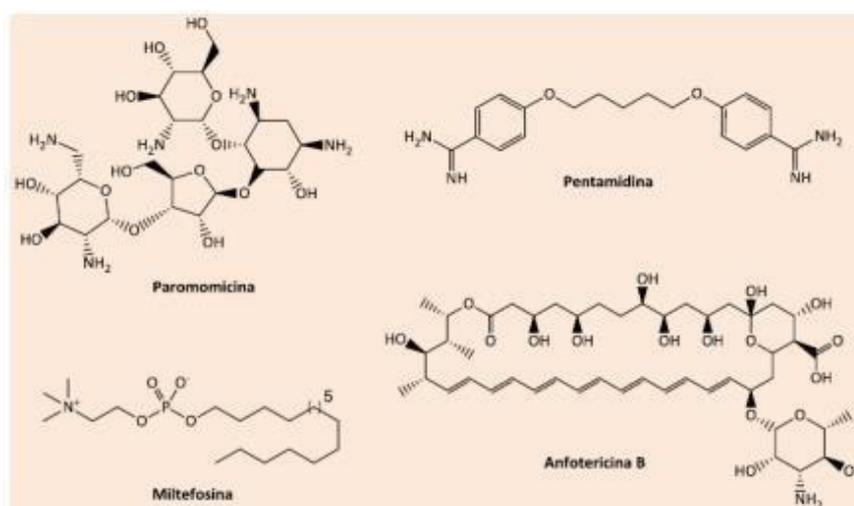
Uma estratégia que tem sido empregada para melhorar a eficiência do tratamento para a leishmaniose é utilização de sistemas lipossomais e as nanopartículas, que apresentam como principais benefícios:

- Possibilidade de direcionamento do princípio ativo para seu alvo específico, como consequência a redução dos efeitos adversos;

- A proteção do fármaco contra a degradação em fluidos biológicos, permitindo a administração por novas vias;
- O aumento da biodisponibilidade, possibilitando a administração por via oral, utilização de menor quantidade do princípio ativo, resultando em menor custo, maior intervalo de administração, melhor aceitação do tratamento pelo paciente.

A principal desvantagem seria o elevado custo para sua produção e comercialização (ALVING, 1983; ROSSI-BERGMANN, 2008).

Figura 11 – Estrutura química dos fármacos de segunda linha no tratamento à leishmaniose.



Fonte: MARIA; DE LIMA, 2013.

Nos últimos anos, novas terapias potenciais, tais como a formulação lipídica de Anfotericina B, Miltefosina, Pentamidina e Paromomicina foram introduzidas para o tratamento da leishmaniose (Figura 11) (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2015; SANGRAULA et al., 2003; VICENS; WESTHOF, 2001). Além disso, alguns complexos organometálicos e de coordenação de paládio, ouro, irídio, ródio, platina e sulfato de zinco como agentes quimioterápicos potentes contra a leishmaniose foram explorados e testados (FRICKER et al, 2008; PLANO, 2011). Porém, ainda assim os resultados parecem insatisfatórios, por esses medicamentos apresentarem alto custo e necessidades especiais para aplicação, tornando promissora a pesquisa por novos fármacos mais seletivos ao parasita e menos tóxicos ao indivíduo.

Atualmente, a DNDi e instituições parceiras no Brasil estão implementando um estudo de laboratório para melhorar o conhecimento sobre o parasita e seus mecanismos de resistência à miltefosina, único tratamento oral existente para a doença. Para as leishmanioses cutânea e

mucosa, a DNDi coordena um estudo no Peru e na Colômbia para avaliar a eficácia e a segurança de uma combinação de termoterapia com um esquema mais curto de miltefosina (DNDi, 2020).

2.7 ALVOS MOLECULARES DE *LEISHMANIA* SP. COM IMPORTÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS PARA LEISHMANIOSE

Para o desenvolvimento de um novo fármaco busca-se um alvo cujas vias sejam específicas do parasita, ou que tenha diferenças estruturais e funcionais significativas em relação às homólogas em mamíferos, contribuindo desta maneira para sua seletividade. Para tal, é preciso levar em consideração as vias metabólicas e bioquímicas que são essenciais para a sobrevivência do parasita, essas muitas vezes regidas por enzimas (CHAWLA; MADHUBALA, 2010; SCOTTI et al., 2015).

A pesquisa por novas drogas leishmanicidas envolve a busca por novos alvos bioquímicos relacionados ao mecanismo de defesa do parasita, metabolismo de RNA ou DNA, vias glicolíticas, esteróis ou ácidos graxos, via das purinas, nucleotídeos ou qualquer rota bioquímica do parasita que favoreça a ligação com a droga.

Um total de 15 diferentes alvos biológicos avaliados como potenciais para o tratamento da leishmaniose foram analisados no presente estudo, sendo eles:

2.7.1 Adenina Fosforibosiltransferase

A adenina fosforibosiltransferase (APRT) está envolvida na síntese *de novo* de purinas, catalisando a síntese de AMP (adenosina monofosfato) a partir de adenina e 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PP-ribose-P) na presença de magnésio (Mg^{2+}) (MUSICK; NYHAN, 1981). Esta é uma via bioquímica de grande importância para a sobrevivência do parasita, principalmente na sua forma evolutiva de amastigota (intracelular do hospedeiro) (LOOKER; BERENS; MARR, 1983). Devido às diferenças filogenéticas entre o hospedeiro e o parasita, existem distinções suficientes entre as enzimas envolvidas na síntese *de novo* de purinas do hospedeiro

e do parasita, tornando a APRT um alvo potencial para o desenvolvimento de uma nova quimioterapia contra esses organismos (EL KOUNI, 2003).

2.7.2 Arginase

Esta enzima é responsável pela hidrólise do aminoácido, L-arginina, em L-ornitina e ureia. A L-ornitina, é então descarboxilada pela ornitina descarboxilase (ODC) para gerar putrescina, substrato da via bioquímica de síntese de poliamina, indispensável para a proliferação celular e desintoxicação de espécies reativas do oxigênio (EROs) por tripanotona (BALAÑA-FOUCE et al., 2012; COLOTTI; ILARI, 2011). Iniesta, Gómez-nieto e Corraliza (2001) investigaram a dependência de arginase para a infecção pela *L. major* e *L. infantum* e demonstraram que o crescimento parasitário dependia da indução eficiente da arginase nas células dos macrófagos. Os resultados obtidos por Da Silva e colaboradores (2012) corroboram com esta afirmação, confirmando que a ausência de arginase em *L. major* influencia a viabilidade e infectividade deste parasita. Logo, inibidores específicos da arginase podem ser novas substâncias potenciais de interesse farmacológico para o tratamento da leishmaniose.

2.7.3 Tripanotona Redutase

A tripanotona redutase (TR) é uma enzima dependente de NADPH, responsável pela catalise da reação de redução da tripanotona disulfeto [T(S)₂] em tripanotona ditiol [T(SH)₂], primeira etapa que resulta na neutralização de espécies reativas de oxigênio, servindo para manter o equilíbrio redox do parasita (BAIOCCO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2008). É uma enzima exclusiva dos parasitas da família Trypanosomatidae, atuando na proteção do parasita contra danos causados por xenobióticos, metais pesados tóxicos e defesas antioxidantes (TOVAR et al., 1998; FAIRLAMB et al., 1985; FAIRLAMB; CERAMI, 1992). Dada sua singularidade e seu papel fisiológico relevante no metabolismo antioxidante do parasita, a TR é considerada promissora para a identificação de novas moléculas inibidoras promissoras candidatas a quimioterapia leishmanicida.

2.7.4 Dihidroorotato desidrogenase

A Dihidroorotato desidrogenase (DHDD) é uma flavoenzima que está envolvida na quarta etapa da síntese *de novo* de pirimidina, processo vital para a biossíntese de DNA e RNA. É responsável pela única reação redox desta via bioquímica, catalisando a oxidação de (S)-dihidroorotato em orotato (CORDEIRO et al., 2012). Dada a importância das pirimidinas no metabolismo celular parasitário, a inibição seletiva da DHDD se torna uma abordagem farmacológica potencial para a inovação quimioterápica leishmanicida (CARTER et al., 2008).

2.7.5 Glioxalase II

A via da glioxalase compreende glioxalase I e glioxalase II, que atuam em conjunto para converter o metilglioxal (Subproduto tóxico e mutagênico da glicólise) em d-lactato, usando tripanotona como cofator. As espécies de *Leishmania* spp. são conhecidas por sua rápida proliferação, necessitando assim de uma alta demanda energética, que é compensada nas taxas de glicólise, gerando altas concentrações de metilglioxal. Este sistema metabólico é a principal via bioquímica de desintoxicação do metilglioxal (WYLLIE; FAIRLAMB, 2011; SILVA; BARATA; FERREIRA et al., 2008). Diante de sua singularidade e importância nas vias metabólicas glicolíticas da *Leishmania* spp., a glioxalase II tornou-se um promissor alvo terapêutico.

2.7.6 Pteridina Redutase (PTR1)

Uma vez que o gênero *Leishmania* é auxotrófico para pteridinas, livres ou conjugadas, esses parasitas possuem uma via bioquímica que lhes permite utilizar pteridinas presentes no organismo do hospedeiro (KUMAR et al., 2008). Portanto, enzimas que participam dessa via bioquímica de recuperação de folatos são alvos promissores para o desenvolvimento de compostos leishmanicidas. Em parasitas de *Leishmania*, o H4-folato é gerado a partir de folato

e /ou diidrofolato (H₂-folato) pela enzima diidrofolato redutase (DHFR) dependente de NADPH, que também catalisa a conversão de monofosfato de desoxiuridina (dUMP) a monofosfato de desoxitimidina (dTMP), portanto, atua como uma timidilato sintase (TS) e, portanto, é geralmente conhecido como DHFR-TS (SINGH, KUMAR e SINGH, 2012).

Devido à importância desse alvo, estudos foram realizados e Nare; Hardy e Beverley (1997), demonstraram que a inibição desse alvo era ineficaz contra *L. major*. Esse paradoxo foi esclarecido pela descoberta da Pteridina Redutase 1 (PTR1), uma redutase de cadeia curta, que garante as quantidades necessárias de folato, quando a *L. major* DHFR-TS é inibida (HARDY, 1997). A ausência de PTR1 acarreta em modificações morfológicas drásticas, resultando em células com múltiplos núcleos, cinetoplastos e flagelos (CAVAZZUTI et al., 2008). Além disso, esta enzima não está presente em hospedeiros mamíferos, tornando-se um alvo promissor para o desenvolvimento de medicamentos.

2.7.7 Triose-fosfato isomerase

A triose fosfato isomerase (TPI) faz parte do grupo de enzimas glicolíticas consideradas vitais para o funcionamento da célula. É responsável pela isomerização reversível entre o gliceraldeído 3-fosfato (GAP) e o fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) e devido ao seu papel essencial no metabolismo energético, bem como a sua caracterização enzimática e estrutural bem compreendida, a TPI de um organismo patogenético é frequentemente considerado como uma droga potencial e alvos de vacina (GÓMEZ-PUYOU et al., 1995; VELANKER et al., 1997; KUSHAWAHA et al., 2012).

2.7.8 Metionil-tRNA Sintetase

Esta enzima pertence família de enzimas aminoacil-tRNA sintetases (classe I), catalisando a reação de ligação do aminoácido metionina ao seu tRNA correspondente. O primeiro passo desta via metabólica é a obtenção de um intermediário metionil-AMP e pirofosfato e em seguida a produção de metionil-tRNA e AMP (SHIBA et al., 1994; PERONA;

GRUIC-SOVULJ, 2013). Devido a seu envolvimento na síntese proteica, via metabólica essencial nos organismos vivos, e pela validação comprovada deste alvo em *Trypanosoma brucei* (Protozoário pertencente também à classe dos Kinetoplastea, com 76% de semelhança na sequência de aminoácido desta enzima com a *Leishmania* spp.), a metionil-tRNA sintetase tornou-se um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas drogas leishmanicida (TORRIE et al., 2017; SHIBATA et al., 2011; RANADE et al., 2013; DEVINE et al., 2017).

2.7.9 Fosfodiesterase 1

As fosfodiesterases são hidrolases altamente específicas responsáveis pela conversão de adenosina 3',5'-monofosfato (cAMP) ou monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) nos 5'-monofosfatos correspondentes (5'-AMP e 5'-GMP), desempenhando um papel central na sinalização de nucleotídeos cíclicos (SEEBECK; STERK; KE, 2011). Em um estudo de Malki-feldman e Jaffe (2009) com inibidores da fosfodiesterase e da proteína quinase A (PKA), foi demonstrada a diminuição da proliferação celular de promastigotas em *L. major*. Diante da sua importância em processos fisiológicos essenciais para a proliferação e desenvolvimento celular, a fosfodiesterase é um potencial alvo para o desenvolvimento de novas drogas.

2.7.10 Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase

A desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase (dUTPase) está envolvida no metabolismo de nucleotídeos, catalisando a hidrólise de trifosfato de desoxiuridina (dUTP) em monofosfato de desoxiuridina (dUMP) e pirofosfato inorgânico na presença de íons de magnésio. Atuando também, de maneira essencial na biossíntese *de novo* de desoxiTimidina Trifosfatada (dTTP), fornecendo o substrato para a timidilato sintase (CAMACHO et al., 2000; HEMSWORTH et al., 2011; SHLOMAI; KORNBERG, 1978). Em um estudo realizado por Hidalgo-zarco e Gonzalez-pacnowska (2001), sobre a dUTPase como potencial alvo terapêutico para parasitoses, demonstrou que a expressão de dUTPase parece ser essencial para a viabilidade celular em *L. major*, onde sua inibição causa comprometimento no crescimento

celular. As diferenças estruturais entre a dUTPases de tripanossomas e de humanos (HEMSWORTH et al., 2011) e sua importância na via metabólica de síntese de DNA e RNA, tornam a dUTPase um alvo atraente para o desenvolvimento de novos medicamentos contra as doenças causadas por estes organismos.

2.7.11 Enzimas da via glicolítica

A glicólise é uma via metabólica presente em todos os eucariotos e é responsável pelo fornecimento de energia celular, para os tripanosomatídeos esta via encontra-se bastante ativa nos hospedeiros vertebrados, ocorrendo no interior de organelas, chamadas glicosomos (TIELENS; VAN HELLEMOND, 2009). Esta via metabólica é constituída de diferentes enzimas.

A Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima chave da via glicolítica, desempenhando um papel crucial no catabolismo e anabolismo de carboidratos (SANTOS et al., 2012). Essa enzima desempenha na glicólise o papel de catalisador da oxidação da gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato, ao reagir com o fosfato inorgânico e tendo o NAD⁺ como coenzima (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011). As enzimas de GAPDH de espécies como *Plasmodium falciparum* e *T. Cruzi* são consideradas alvos moleculares promissores para o desenvolvimento de agentes antiprotozoários, devido diferenças estruturais significativas quando comparadas à enzima humana (GUIDO, 2008).

A glicerol 3-fosfato isomerase, ou fosfoglicose isomerase é outra enzima presente na via glicolítica do *T. cruzi* e está relacionada ao bloqueio dessa via. Ela está presente em duas isoformas uma citosólica e outra glicosomal e sua atuação está relacionada a glicose 6-fosfato desidrogenase, sendo o acúmulo desta responsável pela inibição da glicerol 3-fosfato isomerase e consequente bloqueio da glicólise (CONCEPCION et al., 1999).

A glicólise é concluída com a piruvato quinase, que catalisa a na qual P-enolpiruvato e ADP são convertidos em piruvato e ATP (MORGAN et al., 2011). A inibição desta enzima causa um desequilíbrio de energia no parasita (SCOTTI et al., 2015), tornando a piruvato quinase e as outras enzimas da via glicolítica alvos potenciais para a obtenção de uma quimioterapia mais eficaz contra a leishmaniose.

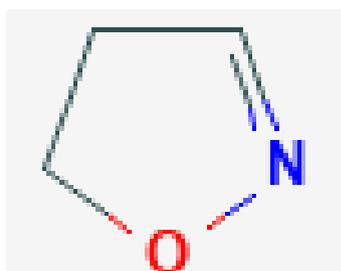
2.7.12 Esterol 14-Desmetilase (CYP51)

A esterol 14-desmetilase (CYP51) é uma oxidoreductase envolvida na síntese do ergosterol, que é responsável pela definição da fluidez da membrana e permeabilidade celular, além da modulação da atividade de proteínas ligadas à membrana e canais iônicos (LEPESHEVA; WATERMAN, 2007; EDWARDS; ERICSSON, 1999). A CYP51 que catalisa uma reação única de três etapas de remoção oxidativa do grupo 14-metil do núcleo de esterol, etapa crucial para a sobrevivência do organismo (LEPESHEVA; WATERMAN, 2011; DE SOUSA; RODRIGUES, 2009). Em um estudo realizado por Mccall e colaboradores (2015), demonstrou o papel essencial da CYP51 na sobrevivência da *L. donovani*, tornado este alvo potencial para o desenvolvimento de novas drogas.

2.8 ISOXAZOLINAS E TIAZOLIDINA-2,4-DIONA

Os compostos heterocíclicos possuem uma ampla diversidade de aplicação biológica, sendo predominante na composição de diversos produtos farmacêuticos (PENNING et al., 1997; FAN; KATRITZKY, 1996; MENG et al., 2009; HORTON; BOURNE; SMYTHE, 2003). Possuem uma alta versatilidade como blocos de construção de intermediários sintéticos, atraindo a atenção para a pesquisa contínua por parte da química orgânica que busca o desenvolvimento de novas estratégias mais eficazes (MAJUMDAR et al., 2010). Dentro da família dos heterociclos de cinco membros está o grupo isoxazolininas caracterizada por possuir dois heteroátomos: um átomo de oxigênio na posição 1 e um átomo de nitrogênio na posição 2 do anel, hibridizado em sp^2 (figura 12).

Figura 12 – Estrutura química do anel de Isoxazolina

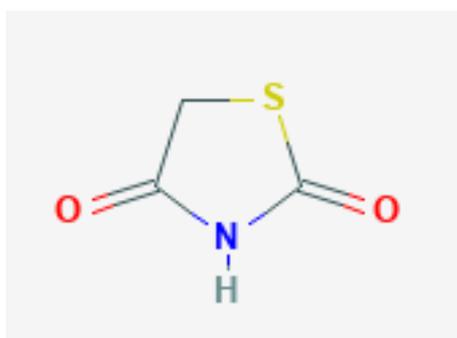


Este anel heterocíclico possui grande importância, com várias citações na literatura para sua ampla atividade biológica, que inclui: atividade antimicrobiana (AGGARWAL, BANSAL & MITTAL, 2013; TANGALLAPALLY, 2007; SUN et al., 2009) e antiparasitária (OZOE et al, 2010), dentre outras. ZHANG e colaboradores (2012) demonstraram a atividade inibitória de novos derivados sintéticos contendo o núcleo isoxazolinico frente transcriptase reversa do HIV (HIV-TR) com resultados melhores que o controle positivo, a Zidovudina (AZT). WEBER e SELZER (2016), ressaltam a aplicação de derivados isoxazolinicos capazes de bloquear os canais de cloreto bloqueados por ligantes, causando a morte de artrópode e assim sua utilização contra ectoparasitas.

MONDAL e colaboradores (2012) sintetizaram uma nova série de análogos do núcleo isoxazolinico, que possuíam também o heterociclo indol, evidenciando sua atividade analgésica, antibacteriana (*Pseudomonas mirabilis*, *Pseudomonas auroginosa*, *E. coli*, e *Staphylococcus aureus*) e anti-helmíntica (*Pheretima posthuma*). Essa atividade foi atribuída a esses núcleos heterocíclicos que contribuíram para um caráter analgésico e lipofílico responsável pela penetração do composto dentro da cepa bacteriana. PAIRAS e colaboradores (2017) demonstraram a importância do núcleo isoxazolinico como um importante núcleo para o desenvolvimento de drogas para a terapêutica neuropsiquiátrica.

Outro grupo de interesse que possui grande relevância para o desenvolvimento de potenciais fármacos é o grupo tiazolidina-2,4-diona. É caracterizado por possuir um anel de 5 membros, contendo um átomo de enxofre e um átomo de nitrogênio nas posições 1 e 3, respectivamente e carbonilas nas posições 2 e 4 (figura 13). Na literatura é possível encontrar artigos que demonstram sua atividade anticâncer, anticonvulsivante, antiinflamatória e antimicrobiana (LESYK et al, 2006; DEVINYAK et al, 2014; EL-FEKY, 1993; OTTANA et al, 2005; MACCARI et al, 2007; KOYAMA et al, 2003; VICINI et al, 2006; TOMAŠIĆ e PETERLIN-MASIC, 2014).

Figura 13 – Estrutura química no anel tiazolidina-2,4-diona.



BOZDAĞ-DÜNDAR e colaboradores (2007) demonstraram em seu estudo a atividade antibacteriana e antifúngica desse heterociclo frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, inclusive na cepa resistente a meticilina, *Escherichia coli* e *C. albicans*. Em outro estudo de ROMAGNOLI e colaboradores (2013) foi possível demonstrar a atividade anticâncer desse composto, que foi capaz de suprimir a proliferação de células HL-60 e U937 da leucemia mielóide induzindo a morte celular apoptótica através de um mecanismo que envolveu a ativação de múltiplas caspases.

A atividade leishmanicida desse grupo foi avaliada e validada por LEITE e colaboradores (2016), que visualizaram sua capacidade inibitória frente a enzima pteridina redutase 1 (PTR1) em cepas da *L. major*. A molécula com melhor resultado apresentou um IC₅₀ de 44,67µM e através de um estudo de mecanismo de inibição, viu-se seu comportamento não competitivo, no qual se descobriu que a molécula se ligava no local do cofator (competidor NADPH).

2.9 METODOLOGIAS *IN SILICO* APLICADAS À DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

A descoberta de novos fármacos envolve um processo complexo, longo e de alto custo, sendo intimamente ligado as inovações científicas e tecnológicas da época (ANDRICOPULO; GUIDO; OLIVA, 2008). Segundo DIMASI, GRABOWSKI e HANSEN (2016) o preço para produzir uma nova droga e introduzi-la ao mercado é estimado em mais de US\$ 2,7 bilhões. Esse valor é explicado pela série de estudos pré-clínicos e clínicos necessários para que se possa comprovar a segurança e eficácia do novo medicamento (DE NEGRI, 2018). Logo, as empresas farmacêuticas buscam sempre novas formas de otimizar os custos associados à P&D, com o objetivo de aumentar suas margens de lucro (GELDENHUYS, 2006).

Um ciclo típico para a descoberta de novas drogas surge a partir da identificação da molécula ativa, otimização estrutural e sua entrada em ensaios clínicos, onde se estima levar cerca de 14 anos (MYERS; BAKER, 2001). Um dos maiores desafios encontrados pela indústria farmacêutica e pelo meio acadêmico é a identificação e otimização da molécula ativa promissora, os chamados *Leads*. Logo, a utilização de conceitos racionais e modernos métodos computacionais se tornaram amplamente utilizados para a descoberta e seleção dessas moléculas ativas (ANDRICOPULO; SALUM; ABRAHAM, 2009).

A adição de tecnologias de design de medicamentos computadorizadas às abordagens de P&D de uma empresa pode levar a uma redução no custo do design de medicamentos e desenvolvimento em até 50% (MCGEE, 2005; FDA, et al. 2004; RAMAKRISHNAN et al., 2020; ORRO et al., 2021). Os métodos *in silico* surgem então como uma alternativa para superar todas as adversidades comuns ao processo de desenvolvimento de novos fármacos, se tornando uma promessa para a identificação de moléculas promissoras mais rapidamente e a um menor custo (GELDENHUYS, 2006).

Estes métodos *in silico* são bastante abrangentes e incluem: (i) estudos de *docking* molecular, em que um ligante ou candidato a fármaco é estudado computacionalmente durante a sua ligação a uma proteína-alvo específica; (ii) QSAR - *Quantitative StructureActivity Relationship*, onde a atividade biológica e a estrutura química são correlacionadas usando métodos estatísticos; ou (iii) bioinformática, onde alvos de drogas são derivados de dados genômicos (GELDENHUYS, 2006).

O número de proteínas com uma estrutura tridimensional conhecida está aumentando rapidamente, atualmente o RCSB PDB (*Research Collaboratory for Structural Biology*) um dos maiores bancos de dados do mundo conta com cerca de 170 mil estruturas (BERMAN et al. 2000; GOODSELL et al., 2020). O conhecimento das estruturas de alvos macromoleculares ou de complexos do tipo ligante-receptor permite a aplicação de estratégias de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *structure-based drug design*).

Em contraste, quando a estrutura do alvo eleito não é conhecida, métodos de planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*) podem ser utilizados, explorando propriedades e características de séries de ligantes bioativos. Os ensaios de *docking* molecular exigem o conhecimento das estruturas tridimensionais do alvo em questão, enquanto os ensaios de QSAR não necessitam desse conhecimento (ANDRICOPULO; GUIDO; OLIVA, 2008; ANDRICOPULO; SALUM; ABRAHAM, 2009).

2.8.1 Ensaios de *Docking* Molecular

Os estudos de *docking* molecular é baseado na previsão de ligação do ligante dentro do sítio ativo do alvo farmacológico em estudo, sendo então uma tentativa de prever a estrutura intermolecular do complexo formado entre o ligante e o alvo (SOUZA; FERNANDES;

RAMOS, 2006). A modelagem estrutural precisa e a correta predição da afinidade entre o ligante e o alvo farmacológico, são os principais objetivos desse tipo de estudo. Os aspectos típicos de uso dos programas de *docking* convergem na busca para identificação de determinadas características moleculares responsáveis pelo específico reconhecimento biológico, ou ainda a previsão de possíveis modificações estruturais no ligante que seriam responsáveis pelo melhoramento da potência e na triagem virtual (*virtual screening*) de grandes bancos de dados para identificação de potenciais *leads* (KITCHEN et al., 2004; WARREN, et al., 2006).

Existem duas partes principais de qualquer programa de *docking*: a busca dos graus de liberdade configuracionais e conformacionais e a função de pontuação. O algoritmo de pesquisa, utilizado dentro desses programas, deve pesquisar o cenário de energia potencial em detalhes suficientes para encontrar o mínimo de energia global total. O cálculo pode ser performado de duas maneiras, rígido onde o algoritmo de busca explora diferentes posições apenas das moléculas ligantes no local ativo do receptor usando os graus de liberdade de translação e rotação e o flexível que acrescenta exploração a graus de liberdade de torção de alguns resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo do receptor neste processo (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003).

A função de pontuação deve ser capaz de prever corretamente a afinidade dos ligantes pelo alvo farmacológico através da avaliação de suas interações intermoleculares (KITCHEN et al., 2004), estimando tanto a complementaridade estérica entre o ligante e o receptor quanto bem como a sua complementaridade química (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003). O correto design de funções e esquemas de pontuações é uma etapa essencial para a obtenção de resultados mais fidedigno com a realidade.

O processo do cálculo de *docking* é feito em várias etapas, em que se acrescenta em cada etapa crescentes graus de complexidade, buscando-se maximizar as interações intermoleculares minimizando a energia total do sistema (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003). O processo se inicia com a aplicação de algoritmos que posicionam pequenas moléculas no sítio ativo proteico. O ligante interage diretamente com a superfície da proteína, essa superfície pode ser descrita através de modelos matemáticos, como por exemplo, por descritores de formas geométricas ou por uma grade (*Grid*), assim como também pode envolver o tratamento dinâmico dessa superfície (HALPERIN et al., 2002; KITCHEN et al., 2004).

Moléculas orgânicas, mesmo que pequenas, podem conter muitos graus de liberdade e a amostragem desses graus de liberdade deve ser realizada com precisão suficiente para identificar a conformação que melhor corresponda à estrutura do receptor, e deve ser rápida o

suficiente para permitir a avaliação de milhares de compostos em um curto período de tempo. Algumas técnicas de flexibilização, ao menos de algumas partes do alvo, podem ser aplicadas através de métodos como utilizando algorítmico de Monte Carlos, Biblioteca de rotâmeros e conjunto de *grids* proteicos (KITCHEN et al., 2004; HART; READ, 1992; OSHIRO; KUNTZ; DIXON, 1995; MORRIS et al., 1998; LEACH, 1994; DESMET, 1992; KNEGTEL; KUNTZ; OSHIRO, 1997).

Os algoritmos são complementados por funções de pontuação (ou *score*), que podem ser de três tipos: funções de pontuação baseadas em campo de força, funções empíricas e funções baseadas no conhecimento (KITCHEN et al., 2004). As funções de pontuação baseadas em campo de força são fundamentadas em campos de força da mecânica molecular, que geralmente quantificam a soma de duas energias, a energia de interação receptor-ligante e a energia interna do ligante. Elas avaliam a estabilidade do complexo por sua energia de interação, quanto mais negativo for essa energia, mais estável será o complexo formado (KITCHEN et al., 2004; MORGON; COUTINHO, 2007).

As interações entre o ligante e o receptor são descritas usando uma combinação de van der Waals, os termos da energia eletrostática e o termo de energia para ligação de hidrogênio. O termo de energia de van der Waals é dado por uma função potencial de Lennard-Jones, onde seus parâmetros variam dependendo da "rigidez" desejada do potencial. O termo eletrostático é dado pela formulação de Coulomb com uma função dielétrica dependente da distância, fazendo com que a contribuição das interações carga-carga diminua. O termo de ligação de hidrogênio (*Hbond*) é baseado em uma potência na ordem de 10 a 12 no denominador, sendo tratado como independente do termo de Coulomb. A energia interna do ligante é calculada de modo muito semelhante à energia de interação proteína-ligante e também inclui contribuições de van der Waals e/ou termos eletrostáticos (KITCHEN et al, 2004).

As funções de pontuação empíricas são adequadas para reproduzir dados experimentais baseando-se na ideia de que a associação da energia livre de ligação pode ser decomposta como uma soma de várias funções básicas dependentes das coordenadas do ligante e do receptor. Os coeficientes dos vários termos são obtidos a partir da análise de regressão utilizando energias de ligação determinadas experimentalmente e informações a cerca da estrutura cristalográfica (KITCHEN et al., 2004; MORGON; COUTINHO, 2007).

Já as funções de pontuação baseadas no conhecimento fundamentam-se nas regras e princípios gerais derivados estatisticamente e são projetadas para reproduzir estruturas experimentais em vez de vincular energias. Utiliza a lei de Boltzmann para calcular o potencial de força média (PMF), obtido a partir da função densidade de probabilidade associada aos pares

de átomos e da distância entre eles (estruturas determinadas experimentalmente) (KITCHEN et al., 2004; MORGON; COUTINHO, 2007).

2.8.2 Relação Quantitativa entre Estrutura e Atividade (QSAR)

QSAR é uma metodologia em que se aplica análise estatística entre descritores, baseados nas estruturas moleculares, e suas respectivas atividades biológicas, de maneira quantitativa. Possui uma longa história no ramo da descoberta de novos fármacos, alcançando um grande impacto na otimização dos *lead compounds* (compostos protótipos) para alvos específicos, facilitando, por exemplo, a descoberta de inibidores de enzimas, agonistas ou antagonistas de alvos farmacológicos importantes. Muitos modelos úteis de QSAR foram construídos a partir do conhecimento das relações entre as atividades biológicas e os descritores dos candidatos a fármaco (ANDRICOPULO; GUIDO; OLIVA, 2008; SALUM; POLIKARPOV; ANDRICOPULO, 2008; SALUM; POLIKARPOV; ANDRICOPULO, 2007; MUEGGE; PODLOGAR, 2001; TROSSINI et al., 2009).

Em um estudo de QSAR, a atividade biológica ou a propriedade que se deseja modelar é dita como variável dependente (matriz Y) que é então correlacionada, através de métodos de regressão, com descritores moleculares (matriz X), que são chamadas de variáveis independentes. O objetivo final dessa metodologia é a obtenção de modelos capazes de prever a atividade biológica de compostos relacionados, os quais não foram usados na construção dos modelos (ALBUQUERQUE et al., 2007; DUDEK; ARODZ; GÁLVEZ, 2006; KUBINYI, 1997).

Segundo FERREIRA e colaboradores (2002) a construção dos modelos requer a elaboração de conjunto ou matriz de dados contendo a medida quantitativa da atividade biológica e os parâmetros físico-químicos e estruturais capazes de descrever as propriedades dos compostos. A qualidade do ajuste do modelo aos valores observados da atividade biológica pode ser avaliada através do cálculo do coeficiente de correlação (R), do desvio-padrão (s) e do teste de Fischer (F). Em termos simplificados, um modelo bem ajustado deverá apresentar valor de R próximo à unidade, s pequeno e F grande.

As análises QSAR, geralmente, são baseadas supondo de que as contribuições aditivas das diferentes propriedades estruturais ou características de um composto vão se relacionar linearmente com a sua atividade biológica, desde que não existem dependências não lineares

de transporte ou ligação a certas propriedades físico-químicas (KUBINYI, 1997). Dessa forma, o centro das análises de QSAR são os descritores químicos. O número de dimensões utilizadas para o cálculo desses descritores classifica os diferentes métodos dessa metodologia, podendo ser: QSAR clássico (2D), QSAR tridimensional (QSAR-3D) e QSAR multidimensional (4D, 5D, 6D). Este trabalho será baseado no QSAR clássico.

A capacidade de interpretação do modelo de QSAR depende fortemente da natureza dos descritores químicos utilizados. Parâmetros físico-químicos bem conhecidos e caracterizados (volumes e superfícies de van der Waals, lipofilicidade, parâmetros relacionados à ligação H e etc.) podem ajudar na interpretação do modelo. As análises relacionadas à configuração eletrônicas dos compostos (cargas parciais, momento dipolar, energias de orbitais e etc.) também se mostram eficazes para interpretação no contexto da hipótese de reatividade.

Além disso, *fingerprint* moleculares e fragmentos de descritores como MNA (LAGUNIN et al., 2007), G-QSAR (AJMANI; JADHAV; KULKARNI, 2009), ISIDA (VARNEK et al., 2008), e Simplex (SiRMS) (KUZ'MIN; ARTEMENKO; MURATOV, 2008) possuem uma conexão direta com a estrutura molecular e, portanto, tem o grande potencial de dar interpretabilidade para um modelo (DURANT et al., 2002; BENDER et al., 2004; BREMSER, 1978; CHERKASOV et al., 2014).

Segundo a OECD, *Organization for Economic Co-operation and Development* (2007), em seu guia para validação dos modelos de QSAR, devem ser atendidos os seguintes critérios: (i) possuir um endpoint (dado biológico) definido; (ii) utilizar algoritmos não ambíguos; (iii) possuir um domínio de aplicabilidade definido; (iv) ser validado utilizando medidas apropriadas de robustez e preditividade; (v) permitir uma interpretação mecanística, se possível.

Para este estudo, a técnica estatística multivariada de correlação canônica foi utilizada para obtenção do modelo de QSAR.

2.8.2.1 Análise de correlação canônica (ACC)

A análise de correlação canônica é um modelo estatístico multivariado, podendo ser visto como uma extensão da regressão múltipla, o qual permite o estudo das inter-relações entre os conjuntos de múltiplas variáveis dependentes e múltiplas variáveis independentes possibilitando a previsão simultânea dessas variáveis (LATTIN; CARROLL; GREEN, 1978;

DILLON; GOLDSTEIN, 1984). A equação básica (eq.1) desse modelo pode ser expressa da seguinte forma:

$$Y_1 + Y_2 + Y_3 + \dots + Y_n = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n \quad (\text{eq. 1})$$

A ACC se tornou uma alternativa mais simples de reduzir as complexidades para se obter a relação entre dois conjuntos de variáveis (TRUGILHO; LIMA; AKIRA, 2003). O princípio básico desse tipo de correlação é estabelecer uma combinação linear das variáveis Y (variáveis independentes, ou no nosso caso de QSAR, resposta biológica) e uma combinação linear das variáveis X (variáveis dependentes, ou no nosso caso, descritores químicos), de forma que a correlação entre esses dois conjuntos seja maximizada (VESSONI, 1998). Devido a ACC ser baseada na determinação de variáveis canônicas ortogonais, essa metodologia exige que as variáveis de cada grupo sejam linearmente independentes.

Esta técnica é amplamente utilizada em diferentes campos como: Agricultura (ALVES et al., 2016; SILVA et al., 2020; VIEIRA et al., 2019; BANDINELLI et al., 2017), Meteorologia (RODRIGUES et al., 2019), estudos psicosociais (NEISSE; HONGYU, 2017; KROTH; NEDUZIAK, 2020), áreas médicas (AGUIAR; CAMÊLO; SÁNCHEZ, 2018) e também há estudos na literatura de sua aplicação para obtenção de modelos de QSAR (PAZ et al., 2018; MAGER et al., 1992; CASAÑOLA-MARTIN et al., 2010; PRADO-PRADO et al., 2008).

O número máximo de variáveis estatísticas (funções) canônicas que podem ser extraídas dos conjuntos de variáveis é igual ao número de variáveis no menor conjunto de dados, independentes ou dependentes e sua magnitude sempre decresce com a ordem em que são estimadas (HAIR et al, 2005). As funções finais obtidas devem ser testadas, tanto isoladamente, como em conjunto. Os testes a serem empregados são: lambda de Wilks, critério de Pillai, traço de Hotteling e a maior raiz de Roy.

Dentro da análise de dois grupos (X e Y), onde X seria o grupo de variáveis dependentes e Y o grupo de variáveis independentes, determina-se então, uma combinação linear entre essas variáveis:

$$U = a'X \quad (U = a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots + a_n x_n) \quad (\text{eq.2})$$

$$V = b'Y \quad (V = b_1 y_1 + b_2 y_2 + \dots + b_n y_n) \quad (\text{eq.3})$$

Onde, $a' = [a_1, a_2, \dots, a_n]$ é o vetor $1 \times p$ de pesos das características do grupo da variável X; e $b' = [b_1, b_2, \dots, b_n]$ é o vetor $1 \times q$ de pesos das características do grupo da variável Y.

Busca-se então que a $\text{Corr}(U,V)$ seja maximizada. Logo, supondo X sendo uma matriz $n \times p$ e Y $n \times q$, obtemos a seguinte matriz COV (X,Y) :

$$C = \begin{bmatrix} \sum_{p \times p}^{11} & \sum_{p \times q}^{12} \\ \sum_{q \times p}^{21} & \sum_{q \times q}^{22} \end{bmatrix} \quad (\text{eq. 4})$$

Resumindo então este conjunto de variáveis, tem-se:

$$\text{Var}(U) = a' \cdot \text{Cov}(X) \cdot a = a' \cdot \sum_{11} \cdot a \quad (\text{eq.5})$$

$$\text{Var}(V) = b' \cdot \text{Cov}(Y) \cdot b = b' \cdot \sum_{22} \cdot b \quad (\text{eq.6})$$

$$\text{Cov}(U, V) = a' \cdot \text{Cov}(X, Y) \cdot b = a' \cdot \sum_{12} \cdot b \quad (\text{eq. 7})$$

A ACC busca então a determinação dos vetores a e b tais que a eq.8 seja possível:

$$\text{Corr}(U, V) = \frac{a' \sum_{12} b}{\sqrt{a' \sum_{11} a} \sqrt{b' \sum_{22} b}} \quad (\text{eq. 8})$$

Existirão $\min(p,q)-1$ pares de variáveis canônicas independentes do par de correlação máxima, que irão expressar a variância total dos dois grupos de variáveis. Esse máximo é calculado através de:

$$\max_{a,b} \text{Corr}(U, V) = \rho_1 \quad (\text{eq. 9})$$

Restrita pela combinação linear (primeiro par de variáveis canônicas):

$$U_1 = \underbrace{e_1' \sum_{11}^{-1/2} X}_{a_1'} \quad e \quad V_1 = \underbrace{f_1' \sum_{22}^{-1/2} Y}_{b_1'} \quad (\text{eq. 10})$$

Neste caso, ρ_1^2 é o autovalor de $\sum_{11}^{-1/2} \sum_{12} \sum_{22}^{-1} \sum_{21} \sum_{11}^{-1/2}$ e e_1 é o seu respectivo autovetor.

Supondo 'A' uma matriz quadrada $k \times k$ e 'v' um vetor $k \times 1$, pode-se mostrar que a equação tem k soluções, sendo λ um escalar. Cada solução é dada por um par formado por um escalar λ_i e um vetor v_i . O escalar é chamado de autovalor de A e o vetor de autovetor de A.

O k -ésimo par de variáveis canônicas pode ser descrito como:

$$U_k = e_k' \sum_{11}^{-1/2} X \quad e \quad V_k = f_k' \sum_{22}^{-1/2} Y \quad (\text{eq. 11})$$

maximizando,

$$\text{Corr}(U_k, V_k) = \rho_k^* \quad (\text{eq.12})$$

Para testar cada correlação canônica utiliza-se a distribuição de qui-quadrado. A fórmula para esta distribuição é:

$$\chi^2 = -[N - 1 - 0,5(p + q + 1)] \times \ln \left[\prod_{i=1}^q (1 - R_{ci}^2) \right] \quad (\text{eq.13})$$

Onde, N = tamanho da amostra, p = número de variáveis dependentes, q = número de variáveis independentes, R^2 = correlação canônica ao quadrado da equação a ser testada. Esse R^2 representa uma estimativa da variância encontrada entre os dois grupos em estudo.

A interpretação do modelo final obtido pode ser feita através dos “pesos canônicos” similares aos “betas” de uma regressão múltipla, onde se observa uma maior contribuição estatística nas variáveis que apresentam pesos maiores e vice-versa. Assim como, pesos de sinais opostos demonstram uma relação inversa uma com a outra e do mesmo sinal uma relação direta. Porém, este tipo de Análise gera instabilidades entre as amostras, logo, não é muito utilizado (HAIR et al, 2005; LAMBERT; DURAND, 1975).

Uma outra forma de interpretação é utilizando as chamadas “cargas canônicas” (ou *canonical loading*) mede a correlação linear simples entre uma variável, dependente ou independente, e o par canônico. Este parâmetro reflete a variância que uma determinada variável compartilha com a variável canônica. Assim como os pesos canônicos, quanto maior seu valor, maior é a importância dessa variável dentro de seu grupo. Apesar de também sofrerem certas instabilidades, são mais estáveis que os pesos canônicos (HAIR et al, 2005).

Por fim, a análise também pode ser feita utilizando as chamadas ‘canonical cross-loadings’ ou cargas canônicas cruzadas. Neste tipo de análise, cada uma das variáveis independentes é correlacionada com a variável estatística canônica dependente e vice-versa. STEWART e LOVE (1968) sugeriram outra maneira de Análise que seria utilizando o chamado índice de redundância, que calcula a quantidade de variância em um conjunto de variáveis que pode ser explicada pela variância no outro conjunto. Esta outra forma de Análise surgiu para

superar as instabilidades e viés dos outros métodos, oferecendo avaliações mais práticas das raízes canônicas (HAIR et al, 2005).

A validação do modelo final obtido pode ser feita através remoção de uma variável dependente e/ou independente para avaliar a sensibilidade dos resultados obtidos originalmente, comparando-os quanto a similaridade de funções canônicas, a cargas das variáveis estatísticas e semelhantes (HAIR et al, 2005).

Diante da importância das avaliações *in silico* para a descoberta de novos protótipos a fármaco, buscou-se a associação dessas com as metodologias tradicionais de análises *in vitro* para elucidação das possíveis atividades leishmanicidas de novos derivados sintéticos. Esse tipo de estudo possui grande relevância e importância para o desenvolvimento de quimioterapias mais eficazes e menos tóxicas para a população acometida por leishmaniose.

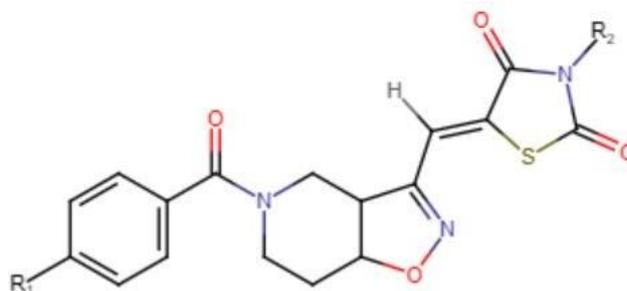
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS

Os 16 compostos testados foram provenientes do Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos (LASOF) do Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e estão demonstrados na figura 14 e Quadro 1. Os aldeídos isoxazolinicos de seis membros foram obtidos segundo adaptação de metodologia desenvolvida pelo grupo de pesquisa do LASOF para a série de cinco membros (REIS et al, 2011).

As tiazolidina-2,4-dionas foram obtidas a partir condensação da tiouréia e ácido cloroacético. Com a fusão destas duas partes, os compostos finais foram obtidos, solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocados a -20°C . Esta solução foi então dissolvida em meio de cultura para obter as diferentes concentrações para realização dos demais experimentos.

Figura 14 – Estrutura geral dos compostos



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Quadro 1 – Substituintes dos compostos.

Moléculas	R1	R2
3A	4-Cloro	Hidrogênio
3B	4-Cloro	1-(4-clorofenil) etanona
3C	4-Cloro	1-(4-nitrofenil) etanona
3D	4-Cloro	1-(4-fluorfenil) etanona
3E	4- T-butil	Hidrogênio
3F	4- T-butil	1-(4-clorofenil) etanona
3G	4- T-butil	1-(4-nitrofenil) etanona
3H	4- T-butil	1-(4-fluorfenil) etanona

3I	4- Nitro	Hidrogênio
3J	4- Nitro	1-(4-clorofenil) etanona
3K	4- Nitro	1-(4-nitrofenil) etanona
3L	4- Nitro	1-(4-fluorfenil) etanona
3M	4- Metoxi	Hidrogênio
3N	4- Metoxi	1-(4-clorofenil) etanona
3O	4- Metoxi	1-(4-nitrofenil) etanona
3P	4- Metoxi	1-(4-fluorfenil) etanona

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

3.2 ANÁLISE *IN SILICO*

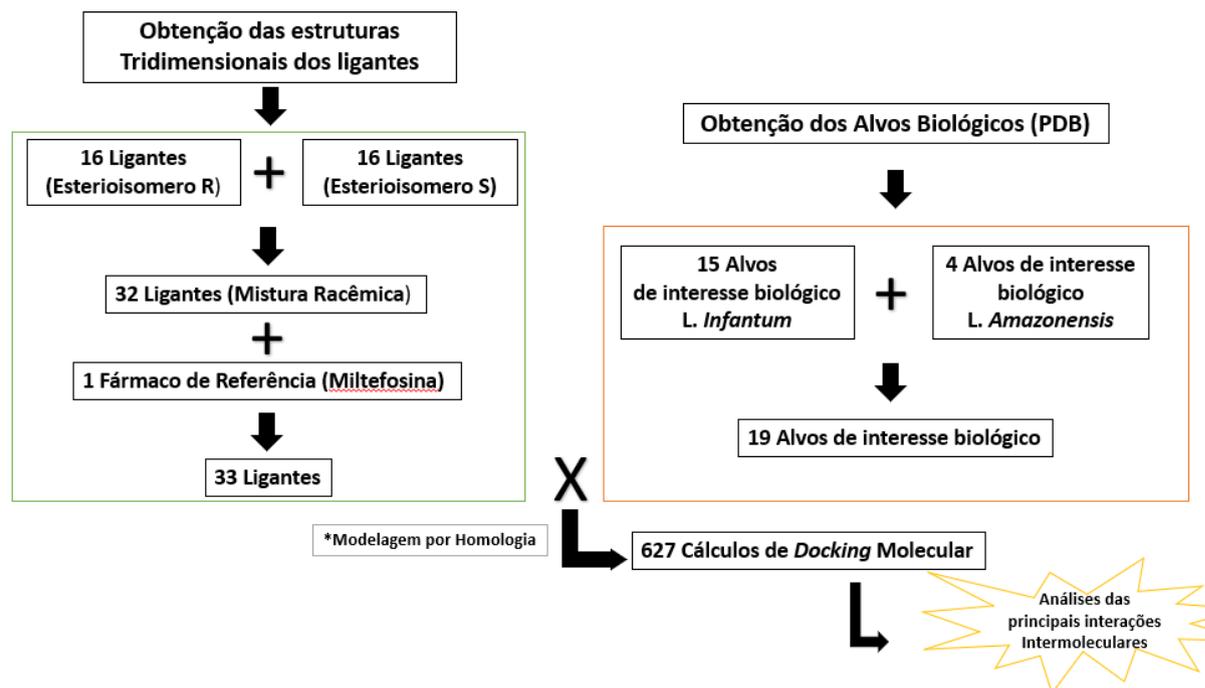
3.2.1. Obtenção das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas

A ferramenta *online* do SWISSADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) foi utilizada para predição das características farmacocinéticas, físico-químicas e *druglikeness* dos compostos. A predição da toxicidade dos ligantes foi avaliada utilizando a ferramenta online ProTox-II (BANERJEE et al., 2018). Para a execução de ambos os programas, as estruturas dos ligantes foram carregadas no formato SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*).

3.2.2 Docking Molecular

A figura 15 mostra o fluxo de etapas seguidas para as análises subsequentes, também descritas no texto abaixo.

Figura 15 – Fluxograma das principais etapas do cálculo de docking molecular.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

3.2.2.1 Obtenção das estruturas em 3D dos ligantes para cálculo de docking

As estruturas dos compostos foram obtidas aplicando-se o método semi-empírico de química quântica RM1 (ROCHA et al., 2006), disponível no programa Spartan® 08' (—Spartan 08 Tutorial and User's Guidel, 2008), utilizando-se critérios de convergência padrão. As estruturas foram obtidas na configuração Z para a dupla ligação exocíclica, pois havia a comprovação experimental a cerca da mesma. Porém, como partiu-se da informação que a síntese orgânica não foi assimétrica, ou seja, gerando as misturas racêmicas para os compostos, ambos os estereoisômeros R e S foram utilizados para o cálculo, a fim de se obter informações completas dos possíveis modos de ligação dessas moléculas com os alvos farmacológicos.

3.2.2.2 Execução dos cálculos de docking

As estruturas tridimensionais das proteínas utilizadas para o cálculo foram obtidas a partir do RCSB PDB (<http://www.rcsb.org>). Visando obter os resultados mais fidedignos *in silico*, quando comparados ao *in vitro*, foram utilizados diferentes alvos, porém apenas para as espécies *L. infantum* e *L. amazonensis* (Espécies utilizadas para os ensaios *in vitro*) para realização dos cálculos de *docking*. O *docking* por homologia foi realizado nos casos em que a estrutura disponível não era a mesma das espécies pretendidas.

3.2.2.3 Modelagem por homologia

A modelagem por homologia foi realizada utilizando-se a ferramenta online do SWISS-MODEL (BIASINI et al., 2014). Os Modelos finais das estruturas foram construídos a partir da introdução da sequência de aminoácidos de cada alvo desejado disponível no NCBI (National Center Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A escolha do modelo final foi baseada na maior porcentagem de identidade possível e a presença de ligante co-cristalizado disponível.

3.2.2.4 Programa GOLD

O programa GOLD (JONES et al, 1997) conta com uma interface gráfica intuitiva, para a preparação dos cálculos de *docking*, no módulo Wizard, existente na interface gráfica do programa Hermes. Os quadros 1 e 2 descrevem os componentes utilizados para a realização do cálculo para as espécies de *L. infantum* e *L. amazonensis*, respectivamente. A coluna nomeada de organismo descreve as espécies em que o modelo por homologia se baseou para construção dos *templates* – Modelos finais utilizados no cálculo. Para a espécie de *L. amazonensis* foi realizado o cálculo de docking em apenas quatro alvos devido a ausência de estruturas primárias, dos demais alvos, no banco de dados NCBI.

O sítio de ligação foi definido pela região de contato com o ligante co-cristalizado em cada enzima, com um espaço de busca no raio que variou de 6 a 8Å, objetivando cobrir todos os principais resíduos do sítio ativo das enzimas. Alguns resíduos de aminoácido foram tratados como flexíveis com o intuito de modelar mais precisamente os efeitos do ajuste induzido (“induced fit”), conforme descrição encontrada nos quadros 2 e 3. Os cálculos foram realizados com a precisão ajustada para 200%, tornando o resultado mais robusto e preciso, apesar da demanda computacional mais elevada.

Quadro 2 – Componentes utilizados para cálculo do docking molecular em alvos de *L. infantum*.

Organismo	Alvo	PDB	Resíduos Flexíveis
<i>L. major</i>	Dihidroorotato desidrogenase	3TQ0	VAL22;LYS44;SER45;ASN68;MET70;LEU72;GLU126;ASN128;ASN133;ASN195.
<i>L. major</i>	Metionil-tRNA Sintetase	3KFL	TYR219;SER231;ASP256;ASP336;TRP443;ASP486TRP516;LYS522;ILE523;LYS525.
<i>L. major</i>	Fosfodiesterase 1	2R8Q	TYR680;HIS681;ASP722;MET797;ASP835;ASP838;VAL853;PHE857GLN887;PHE890.
<i>L. major</i>	Pteridina Redutase 1 (PTR1)	5L4N	ARG17;SER111;PHE113;ASP181;MET183;LEU188;TYR194;LEU226;SER227;LEU229.
<i>L. major</i>	Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase	2YAY	GLN21;ASN25;GLU51;GLU76;ASP79;PHE83;LYS179;ASN183;ARG186;TYR191.
<i>L. Mexicana</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	2B4R	ARG11;LEU98;CYS149;THR150;HIS176;THR178;THR181;ASP192;ARG231;ASN313.
<i>L. Mexicana</i>	Glicerol-3-fosfato desidrogenase	1M66	PHE22;SER24;HIS46;ILE47;LYS48;TYR64;ILE94;GLN97;PHE98;PHE102.
<i>L. Mexicana</i>	Glicose-6-fosfato isomerase	1T10	ILE204;SER207;SER257;LYS258;THR262;PHE318;VAL322;ILE332;GLN406;GLU410.
<i>L. Mexicana</i>	Piruvato quinase	3PP7	THR35;ILE36;GLN41;ARG58;HIS63;TYR68;HIS69;THR72;SER339;LYS344.
<i>L. Mexicana</i>	Triose-fosfato isomerase	1IF2	ANS12;LYS14;ILE93;HIS96;CYS127;GLU168;TYR211;VAL215;LEU233;VAL234.
<i>L. infantum</i>	Esterol 14-Desmetilase (CYP51)	3L4D	PHE289;TYR102;VAL460;LEU358;MET105;THR294;CYS422;TYR115;MET459;PHE104.
<i>L. infantum</i>	Glioxalase II	2P1E	LEU21;ASP23;ASN24;ASP41;HIS76;HIS78;ASP80;HIS81;HIS139;HIS143.
<i>L. infantum</i>	Tripanotona Redutase	4APN	CYS52;GLU18;TYR110;MET113;SER109;THR335;ILE339;ILE106;VAL58;TRP21
<i>L. donovan</i>	Adenina Fosforibosiltransferase	1QB7	ARG37;PHE42;APS44;ARG82;ASP147;VAL148;LEU149;THR151;LEU176;ILE178.
<i>L. Mexicana</i>	Arginase	4ITY	ASP113;TRP135;ASP137;HIS139;ASP141;VAL149;SER150;HIS154;GLU197;GLU288.

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Quadro 3 – Componentes utilizados para cálculo do docking molecular em alvos de *L. amazonensis*.

Organismo	Alvo	PDB	Resíduos Flexíveis
<i>L. Donovan</i>	Dihidroorotato desidrogenase	3C61	VAL22;LYS44;SER45;ASN68;MET70;LEU72;GLU126;ASN128;ASN133;ASN195.
<i>L. major</i>	Pteridina Redutase 1 (PTR1)	1E7W	ARG17;SER111;PHE113;ASP181;MET183;LEU188;TYR194;LEU226;SER227;LEU229.

<i>L. infantum</i>	Tripanotiona Redutase	6I7N	CYS52;GLU18;TYR110;MET113;SER109; THR335;ILE339;ILE106;VAL58;TRP21
<i>L.Mexicana</i>	Arginase	4ITY	ASP113;TRP135;ASP137;HIS139;ASP141; VAL149;SER150;HIS154;GLU197;GLU288

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

3.2.2.5 Análise das interações intermoleculares

O programa BINANA[®] (DURRANT, MCCAMMON, 2011) foi utilizado para a análise das interações intermoleculares presentes no melhor e pior resultado do cálculo de *docking*, utilizando sua configuração padrão, exceto para a distância de ligação de hidrogênio, que foi alterada para o máximo de 3.5Å. Para rodar este programa, foi necessário converter todos os arquivos que estavam no formato MOL2 para o formato PDBQT, utilizando a ferramenta MGLTools. As imagens foram geradas utilizando-se o programa Pymol (pymol.org).

3.2.3 Modelos de QSAR

3.2.3.1 Obtenção dos descritores para QSAR

As propriedades eletrônicas, topológicas, geométricas e físico-químicas dos 16 compostos em estudo foram obtidas através da utilização dos *softwares* MARVIN 4.0.6. ChemAxon, MOPAC (STEWART, 1990) e SWISSADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Utilizando o *software* MARVIN 4.0.6. ChemAxon os descritores topológicos de Contagem de átomos alifáticos, ligação alifática, átomo aromático, ligação aromática, contagem total de átomos e ligações, contagem de cadeia de átomo e ligação, ligações rotavéis, Platt index, Randic index, Balaban index, Harary index, Hyper wiener index, Szeged index, Wiener index, Wiener polarity e fsp3 foram obtidos. Assim como os descritores geométricos de Energia dielétrica (Kcal/mol), Campo de força MMFF94 (Kcal/mol), Mínima e máxima área de projeção, mínimo e máximo raio de projeção, Comprimento perpendicular da área máxima e mínima, volume de van der Waals, área de superfície polar (2D) e área de superfície de van der Waals (3D). Por fim, foram também obtidos os dados quanto a contagem de átomos doadores e aceptores da ligação de hidrogênio e índice de refatividade.

O programa MOPAC (STEWART, 1990) foi utilizado para o cálculo das propriedades eletrônicas dos compostos, por meio do método semi-empírico PM7 de química quântica. As propriedades calculadas foram: Energia total de formação (ϵ_{TOTAL}), energias dos orbitais moleculares HOMO e LUMO (ϵ_{HOMO} e ϵ_{LUMO} , respectivamente) e cargas sobre os átomos (C₁, C₂, N₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, O₁₄, O₂₈, N₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₂, S₃₃, C₃₄, O₃₅, N₃₆, C₃₇ e O₃₈).

Por fim, os valores de LogP e peso molecular foram calculados utilizando-se a ferramenta online do SWISSADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

3.2.3.2 Análise de correlação canônica e construção do modelo de QSAR

Para obtenção dos modelos de QSAR, primeiro os valores dos descritores foram normalizados (autoescalados, ou seja, seus valores médios foram divididos pelo respectivo desvio padrão) e em seguida foi obtida uma matriz de correlação entre os descritores químicos

e as atividades biológicas dos compostos (pIC_{50} em *L. amazonensis* e *infantum*, e DL_{50} em macrófagos). Aqueles descritores que apresentaram uma correlação linear maior que $|0,5|$ ($p=0,05$ com nível de confiança de 95%) com ao menos uma das atividades biológicas foram selecionados para gerar o modelo e seus valores normalizados podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1 – Valores normalizados dos descritores químicos que obtiveram correlação linear considerável com os descritores biológicos.

	IC50Amaz	IC50Infa	DL50Macr	LogP	Accitador	LUMO
Ligante 3A	-1,056714	-0,804059	-0,915571	-0,806023	-1,336051	-0,361444
Ligante 3B	0,846065	0,227203	0,233617	1,020371	-0,758299	1,211367
Ligante 3C	-0,155075	-0,391124	1,741438	0,005707	0,68608	-1,393853
Ligante 3D	1,18939	1,368708	-0,250345	0,766705	-0,758299	0,372534
Ligante 3E	0,384199	0,805649	-1,088338	-0,105905	-1,336051	0,566111
Ligante 3F	1,230277	-1,001681	-1,312794	1,629169	-0,758299	0,929068
Ligante 3G	0,511794	2,100875	-0,563663	0,644945	0,68608	-0,240459
Ligante 3H	1,384749	0,088739	-0,716959	1,456676	-0,758299	1,235564
Ligante 3I	-1,319974	-1,001681	1,346339	-1,932299	0,68608	-1,41805
Ligante 3J	-0,286469	-0,025807	-0,493919	-0,055172	0,68608	-0,716335
Ligante 3K	-1,319974	-1,001681	1,706035	-1,161155	2,130459	-1,75681
Ligante 3L	0,325152	-0,340931	0,341951	-0,278398	0,68608	-0,635678
Ligante 3M	-1,319974	-1,001681	0,39895	-1,323501	-0,758299	0,412863
Ligante 3N	0,053162	1,226923	0,109706	0,462306	-0,180547	1,025856
Ligante 3O	-1,319974	-1,001681	-1,235969	-0,572651	1,263832	-0,329181
Ligante 3P	0,853367	0,752226	0,699523	0,249227	-0,180547	1,098447

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Para as correlações canônicas e lineares foram utilizados os softwares STATÍSTICA 12.0 e SAS Institute Inc (STATSOFT INC, 2013).

3.3 ANÁLISES *IN VITRO*

3.3.1 Citotoxicidade

A citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliada através de ensaios com MTT. Esse ensaio baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de

células metabolicamente ativas. Cristais de formazan são formados no interior dessas células, que deve ser lisadas para a solubilização e posterior análise por espectrofotometria. Uma vez que a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis, quanto maior for a viabilidade celular, maior será a proporção de redução do MTT e maior será a absorbância.

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram soltos das garrafas de cultura e foram plaqueados em placas de 96 poços, fundo reto e incubadas por 24h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, para aderência. Após esse tempo, os compostos foram adicionados nas concentrações de 6,25 a 200 µg/mL e incubados novamente por um período de 48h. Foram utilizados poços apenas com meio de cultura como controle negativo. Após a incubação foi acrescentado 25µL de MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo difenil tetrazólio) a 5mg/mL em PBS, seguida de uma nova incubação por 2h, a 37°C e ao abrigo da luz. Parte do meio de cultura juntamente com o restante de MTT foi aspirado e 100µL de DMSO foi adicionado por poço para solubilização dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A concentração citotóxica para 50% da cultura (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão pelo software GraphPad Prism. Cada amostra foi realizado em duplicata.

3.3.2 Ensaios com promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB 0016) e *L. infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram mantidas a 26° C em meio Schneider's (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (meio completo). Parasitas na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos.

Para o ensaio de atividade leishmanicida, os parasitas foram contados e diluídas em meio Schneider's (Sigma) completo a 1×10^6 células/mL. Os parasitas foram incubados a 26°C na presença de diferentes concentrações dos compostos (1,5 a 200µg/mL) por 72h. Parasitas incubados apenas com meio de cultura e com o veículo foram utilizados como controle negativo. Após a incubação, os poços foram lavados e foi adicionada solução de CPRG (500µM, 0,5% de Nonidet P-40, em PBS), seguida de nova incubação por 10 minutos, a 22°C. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC

Multiskan FC. A atividade leishmanicida dos compostos foi verificada pela diminuição no número de promastigotas nas culturas tratadas em comparação com a cultura controle sem tratamento. A Miltefosina foi utilizada como controle positivo. Os valores de IC₅₀ foram calculados por análise de regressão utilizando o software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

3.3.3 Ensaio com amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

Para esta avaliação, macrófagos RAW 264.7 (3×10^5 células/mL) foram incubados para aderência por 1h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Após essa incubação inicial foram acrescentadas promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. infantum* na proporção de 15 parasitas/macrófago, por um período de 6h, a 37°C e 5% de CO₂. Os parasitas não internalizados foram removidos por lavagem e a cultura foi incubada novamente na presença de diferentes concentrações dos compostos (3,125 a 100 µg/mL) por 24h, a 37°C e 5% de CO₂. Amastigotas incubadas apenas com meio de cultura e com Miltefosina foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Após a incubação, os poços foram lavados e foi adicionada solução de CPRG (500µM, 0,5% de Nonidet P-40, em PBS), seguida de nova incubação por 18h, a 22°C. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A atividade leishmanicida dos compostos foi verificada pela diminuição no número de amastigotas intracelulares nas culturas tratadas em comparação com a cultura controle sem tratamento. Os valores de IC₅₀ foram calculados por análise de regressão utilizando o software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

3.3.4 Obtenção de sobrenadante de cultura de células esplênicas

Suspensões de células esplênicas foram depositadas em placas de 24 poços (10^6 células/mL) em duplicata. As células foram tratadas com compostos na concentração de 10µg/mL e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 24, 48, 72 e 96 horas. A droga de referência utilizada foi a miltefosina e o controle negativo foi feito com poços sem tratamento.

Após o tempo de incubação, as placas foram centrifugadas (400 x g por 10 min, a temperatura ambiente.) e os sobrenadantes de cultura foram coletados e estocados a -20°C para posterior utilização na dosagem de citocinas por citometria de fluxo.

3.3.5 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo

Citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 foram dosadas nos sobrenadantes de esplenócitos murinos estimulados com os compostos na concentração de 10µg/mL pelo método de CBA (do inglês, Cytometric Bead Array). Devido as diferentes dinâmicas de produção de cada citocina pelas células, foram utilizados quatro diferentes tempos de incubação (24 h, 48 h, 72 h e 96h). Foram quantificadas por este método as citocinas IL-2, -4, -6, -10, -17, IFN- γ e TNF. A aquisição e análise dos padrões e das amostras foi realizado utilizando citômetro de fluxo (FACScalibur, BD) e pelo software BD FCAP Array v3.0, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.3.6 Análise estatística

As análises de regressão linear e de significância foram feitas no programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad, Califórnia, EUA). Para as análises de significância foi utilizado ANOVA seguida do teste de Dunnett sempre considerando significativo valor $p < 0.05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDOS *IN SILICO*

4.1.1 Predição das características farmacocinéticas e físico-químicas dos compostos

A ferramenta online do SwissADME fornece diferentes parâmetros físico-químicos como: peso molecular, número de átomos pesados, número de átomos pesados aromáticos, número de ligações rotativas, número de aceptores da ligação H, número de doadores da ligação H, fração de saturação das ligações de carbono (Csp³), o número de carbonos sp³ hibridados/contagem total de carbono e a refratividade molar.

A solubilidade em água, uma das principais propriedades físico-químicas observadas durante o desenvolvimento de novos fármacos, é predita por essa ferramenta online através do uso de três diferentes métodos: O modelo ESOL (DELANEY, 2004), modelo Ali (ALI et al., 2012) e o modelo SILICOS-IT. Os principais resultados podem ser observados no quadro 4.

Quadro 4 – Resultados *in silico* obtidos para predição da solubilidade em água dos compostos testados.

Moléculas	ESOL	Ali	Silicos-IT
3A	Solúvel	Moderado solúvel	Solúvel
3B	Pouco Solúvel	Pouco Solúvel	Pouco Solúvel
3C	Moderado solúvel	Pouco Solúvel	Moderado solúvel
3D	Moderado solúvel	Pouco Solúvel	Pouco Solúvel
3E	Moderado solúvel	Moderado solúvel	Moderado solúvel
3F	Pouco Solúvel	Pouco Solúvel	Pouco Solúvel
3G	Pouco Solúvel	Pouco Solúvel	Pouco Solúvel
3H	Pouco Solúvel	Pouco Solúvel	Pouco Solúvel
3I	Solúvel	Moderado solúvel	Solúvel
3J	Moderado solúvel	Pouco Solúvel	Moderado solúvel
3K	Moderado solúvel	Pouco Solúvel	Moderado solúvel
3L	Moderado solúvel	Pouco Solúvel	Moderado solúvel
3M	Solúvel	Moderado solúvel	Solúvel
3N	Moderado solúvel	Pouco Solúvel	Pouco Solúvel
3O	Moderado solúvel	Pouco Solúvel	Moderado solúvel

3P	Moderado solúvel	Pouco Solúvel	Moderado solúvel
----	------------------	---------------	------------------

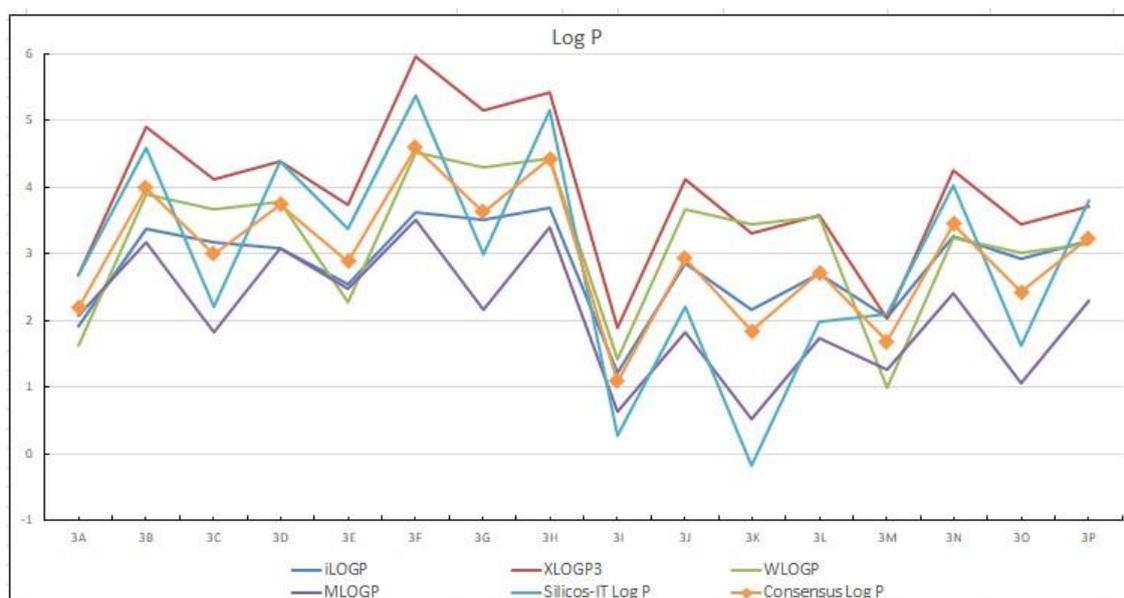
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

A partir da Análise do quadro 4 é possível observar que a solubilidade dos compostos varia de pouco solúvel para solúvel. O método de predição ESOL obteve que 18,75% das moléculas são solúveis, 25% pouco solúvel e 56,25% moderadamente solúvel. Já o método Ali demonstra que 75% das moléculas são pouco solúveis e 25% moderadamente solúveis. Por fim, o método SILICOS-IT demonstra que 18,75% dos ligantes são solúveis, 35,5% são pouco solúveis e 43,75% são moderadamente solúveis.

De maneira geral é importante observar que os compostos que possuem o átomo de hidrogênio em seu R2 (3A, 3E, 3I e 3M) apresentam-se como moderadamente solúveis a solúveis. A presença de um átomo doador na ligação de hidrogênio facilita a ligação com a molécula de água e assim aumenta de certa forma, a solubilidade. Os compostos 3F, 3G e 3H apresentam-se como pouco solúvel nos três métodos. Esses ligantes possuem em comum o grupo t-butil ligado ao R1, um grupamento altamente apolar. A presença do grupamento de cloro (Cl^-) no composto 3B também aparenta contribuir para sua pouca solubilidade.

O SwissADME fornece também o acesso a cinco diferentes modelos preditivos para obtenção do coeficiente de partição entre n-octanol e água ($\log P_{o/w}$), que é o descritor clássico de lipofilicidade (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Dados preditos de lipofilicidade.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Legenda: A linha azul representa o modelo preditivo ILOGP; A linha vermelha representa o modelo preditivo

XLOGP3; A linha verde representa o modelo preditivo WLOGP; a linha roxa representa o modelo preditivo MLOGP; A linha azul marítimo representa o modelo preditivo Silicos-IT Log P e a linha laranja, com pontos, representa o consenso Log P.

Os modelos preditores XLOGP3 e WLOGP são baseados em métodos atomísticos. O MLOGP e SILICOS-IT Log P são baseados em métodos topológicos. O ILOGP é um método que depende de energias livres de solvatação em n-octanol e água, calculado pelo modelo Generalized-Born e área de superfície acessível a solventes (GB / SA), incluído na ferramenta SwissADME. O consenso LogP é a média aritmética dos valores previstos pelos cinco métodos propostos (CHENG et al., 2007; WILDMAN; CRIPPEN, 1999; MORIGUCHI et al., 1994; DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Os valores do consenso LogP variam de 1.08 (Ligante 3I) até 4.59 (Ligante 3F), quanto maior o LogP significa que mais hidrofóbico e lipossolúvel é o composto, neste caso o ligante 3F seria o mais lipossolúvel da classe enquanto o ligante 3I seria o mais hidrofílico, resultado que corrobora com o achado da solubilidade desses compostos, visto que o ligante 3I variou de moderadamente solúvel a solúvel enquanto o ligante 3F foi predito como pouco solúvel nos três modelos preditores de solubilidade. Apesar da aparente variação entre os resultados nos diferentes métodos, é possível observar uma mesma tendência nos resultados.

O SwissADME calcula também diferentes parâmetros farmacocinéticos que podem ser visualizados no quadro 5 abaixo:

Quadro 5 – Resultados *in silico* da predição dos parâmetros farmacocinéticos de absorção do trato gastrointestinal (TGI), permeabilidade a barreira hematoencefálica (BBB) e substrato da glicoproteína P.

Moléculas	Absorção pelo TGI	Permeabilidade a BBB	Substrato a P-gP
3A	alta	não	não
3B	alta	não	não
3C	baixa	não	não
3D	alta	não	não
3E	alta	não	não
3F	baixa	não	não
3G	baixa	não	não
3H	alta	não	não
3I	baixa	não	não
3J	baixa	não	não
3K	baixa	não	não
3L	baixa	não	não
3M	alta	não	não
3N	alta	não	não
3O	baixa	não	não
3P	alta	não	não

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

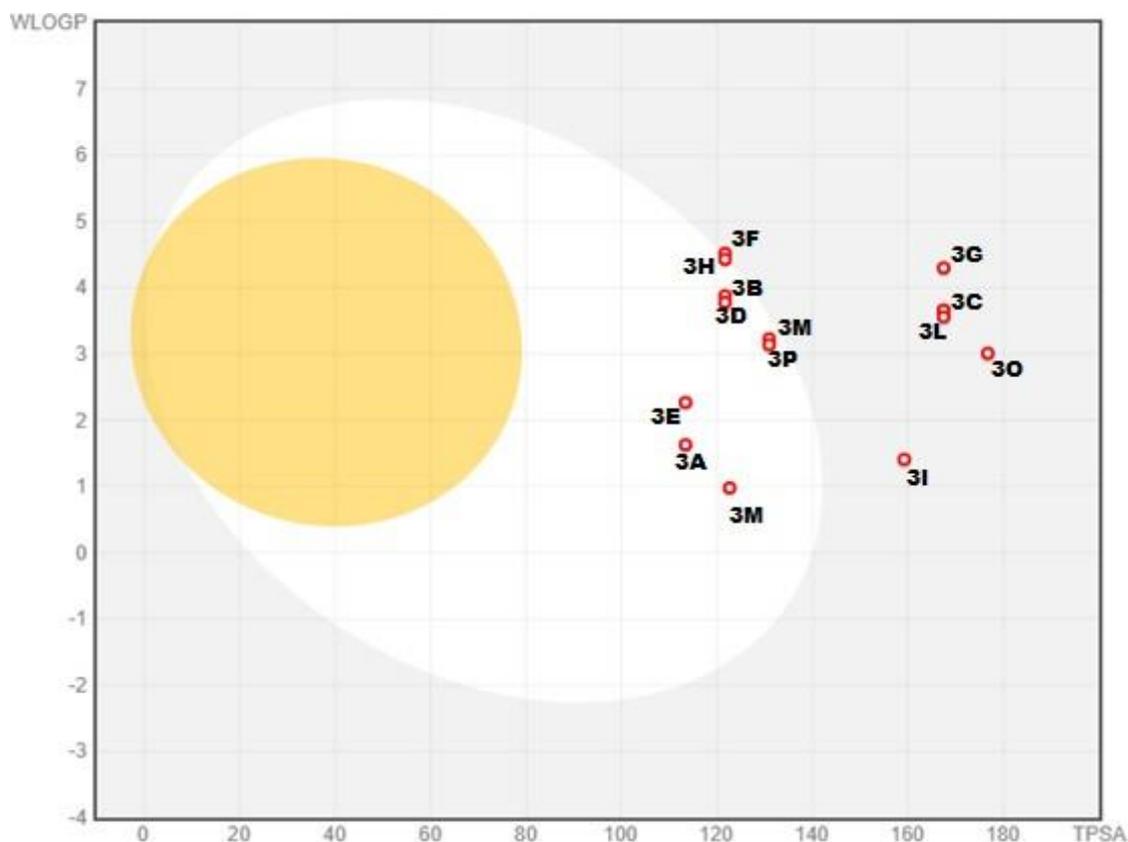
A partir da Análise do quadro 5 é possível observar que 50% dos compostos apresentam uma alta capacidade de atravessar o TGI, são eles: 3A, 3B, 3D,3E, 3H,3M,3N e 3P. Enquanto os outros 50% possuem baixa capacidade de absorção no TGI, são eles: 3C,3F,3G,3I,3J,3K,3L e 3O. O alto peso molecular e uma baixa lipofilicidade são características que podem causar esse problema. Essa baixa absorção pode ser resolvida pelo uso da tecnologia farmacêutica e o emprego de diferentes técnicas, como uso, por exemplo, de excipientes inteligentes, ciclodextrinas, nanocarreadores, NLC (Carreadores lipídicos nanoestruturados) e SLN (Nanopartículas sólidas lipídicas) que aumentem a absorção, e conseqüentemente, a biodisponibilidade no organismo (JACKSON; YOUNG; PANT, 2000; AUNGST, 2012; KHADKA et al., 2014; DE SOUZA et al., 2020; LOFTSSON; MÁSSON; BREWSTER, 2004)

Nenhum dos compostos possui características farmacocinéticas preditas para alcançar o sistema nervoso central. As manifestações clínicas no Sistema nervoso central são incomuns, independentemente do estado imunológico do hospedeiro, mas foram relatadas em pessoas imunossuprimidas, geralmente em conjunto com infecção disseminada por leishmaniose e experimentalmente em cultura de células (SNYDMAN et al., 2006; ALBRECHT et al., 1996; ASENSI et al., 2000; ABREU-SILVA et al., 2003).

A gp-P é glicoproteína de superfície e esta presente na membrana citoplasmática de diversos tecidos atuando como barreira fisiológica, uma vez que é capaz de causar o efluxo de toxinas e xenobióticos para o exterior das células (SRIVALL; LAKSHMIE, 2012; SHAROM, 2011). Essa glicoproteína é capaz de interagir com uma diversidade de compostos de diferentes estruturas químicas e atividades farmacológicas desempenhando um papel crucial na farmacocinética de inúmeros fármacos, influenciando diretamente na biodisponibilidade de várias moléculas, assim como também na multirresistência a fármacos (SILVA et al., 2015). Os compostos testados fogem desse mecanismo de transporte, visto que, não são substrato para a G-gP.

O SwissADME fornece ainda o BOILED-Egg (DAINA; ZOETE, 2016), gráfico que correlaciona o TPSA (*topological polar surface area*) com lipofilicidade (LogP - WLOGP) e fornece informações relacionadas ao seguinte: capacidade do composto de atravessar a barreira hematoencefálica; absorção gastrointestinal passiva; potencial de ligação à glicoproteína P, que pode ser visualizado na figura 16.

Figura 16 – BOILED-EGG.



Fonte: SwissADME

Legenda: região amarela - composto com potencial para atravessar a barreira hematoencefálica; Região branca - composto com características que podem ser absorvidas pelo TGI; Região cinzenta - composto com parâmetros farmacocinéticos desfavoráveis. Pontos vermelhos – moléculas que não são substratos da glicoproteína P.

O modelo BOILED-Egg fornece um método robusto, rápido, intuitivo, facilmente reproduzível e estatisticamente sem precedentes, útil para a descoberta e desenvolvimento de medicamentos. Os compostos que ficaram na área cinza foram, 3I, 3L, 3O, 3C e 3G, enquanto os que ficaram na área branca do gráfico foram o 3M, 3A, 3E, 3P, 3N, 3D, 3B, 3F e 3H. O ligante 3J ficou fora da área de análise do gráfico por apresentar valores de correlação de TPSA e LogP fora dos estipulados pelo modelo.

Uma outra predição fornecida pelo SwissADME é a capacidade de inibição ou não das enzimas da superfamília de citocromo P450. Elas são encontradas principalmente no fígado e no epitélio do intestino e sua principal função é a metabolização dos fármacos (GUENGERICH, 2008). O resultado é expresso no quadro 6.

Quadro 6 – Resultados *in silico* da capacidade de inibição das enzimas do citocromo P450.

Moléculas	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
3A	não	sim	sim	não	sim
3B	não	sim	sim	não	sim
3C	não	não	sim	não	sim
3D	não	sim	sim	não	sim
3E	não	sim	sim	não	sim
3F	não	sim	sim	não	sim
3G	não	não	sim	não	sim
3H	não	sim	sim	não	sim
3I	não	não	não	não	não
3J	não	não	sim	não	sim
3K	não	não	sim	não	sim
3L	não	não	sim	não	sim
3M	não	sim	não	não	não
3N	não	sim	sim	não	sim
3O	não	não	sim	não	sim
3P	não	sim	sim	não	sim

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Nenhum dos compostos apresenta capacidade predita de inibição para as enzimas CYP1A2 e CYP2D6. Quanto às isoformas CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4 existe a previsão de inibição por grande parte dos compostos testados. A Inibição dessas proteínas está relacionada a interações medicamentosas, bem como ao acúmulo de medicamentos e/ou de seus metabólitos (GUENGERICH, 2008).

O conceito de *Drug-likeness* também é aplicado por essa ferramenta computacional, que conta com a aplicação de 5 diferentes regras: Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge (Tabela 2). (LIPINSKI et al., 1997; GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999; VEBER et al., 2002; EGAN; MERZ; BALDWIN, 2000; MUEGGE; HEALD; BRITTELLI, 2001).

Tabela 2 – Resultados *in silico* da violação ou não das regras de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge. Numeração representa quantidade de violação.

Moléculas	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge
3A	0	0	0	0	0
3B	1	2	0	0	0
3C	2	2	1	1	1
3D	1	2	0	0	0
3E	0	0	0	0	0
3F	1	2	0	0	1
3G	2	2	1	1	2
3H	1	2	0	0	1
3I	0	0	1	1	1
3J	2	2	1	1	1
3K	2	2	1	1	1
3L	2	2	1	1	1
3M	0	0	0	0	0
3N	1	2	0	0	0
3O	2	2	1	1	1
3P	1	2	0	0	0

Fonte: Elaborado pela própria autora (2020).

As violações as regras de Lipinski foram com relação $MW > 500$ daltons e mais do que 10 aceptores da ligação de hidrogênio. Com exceção dos compostos 3A, 3E, 3I e 3M, os demais quebraram ao menos 1 dessas regras. Na regra de Ghose apenas os ligantes 3A, 3E, 3I e 3M não violaram nenhuma das regras, os demais violaram 2 regras ($MW > 480$ e $MR > 130$).

As regras de Veber e de Egan foram quebradas pelos ligantes 3C, 3G, 3I, 3J, 3K, 3L e 3O que apresentaram uma $TPSA > 140 \text{ \AA}^2$ e $TPSA > 131.6 \text{ \AA}^2$, respectivamente. A regra de Muegge de foi quebrada pelos ligantes 3C, 3F, 3H, 3I, 3J, 3K, 3L e 3O que apresentaram um $XLOGP3 > 5$. Já o composto 3G violou a regra de Muegge por possuir $XLOGP3 > 5$ e $TPSA > 150 \text{ \AA}^2$.

Drug-likeness aplica o conceito de comparação das propriedades físico-químicas das moléculas candidatas a fármaco com fármacos já aprovados e consolidados no mercado, ajudando a otimizar a farmacocinética e propriedades farmacêuticas, por exemplo, solubilidade, estabilidade química, perfil de biodisponibilidade e distribuição (VISTOLI; PEDRETTI; TESTA, 2008; DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). A violação de algumas dessas propriedades caracteriza os ligantes como prováveis a terem uma má absorção ou permeação e uma baixa biodisponibilidade quando administrados oralmente. Com exceção dos ligantes 3A, 3E e 3M, todos violaram ao menos uma das regras. Contudo, é importante lembrar que vários fármacos comerciais já a muitos anos bem estabelecidos no mercado farmacêutico também não passariam em todos os critérios destas regras de *Drug-likeness*. Portanto, estas regras precisam ser aplicadas com parcimônia e equilíbrio.

4.1.2 Predição da toxicidade dos compostos

A ferramenta online ProTox-II funciona como um laboratório virtual especializado na predição da toxicidade relacionada a estrutura química dos compostos a serem testados. Essa predição se baseia na utilização de um banco de dados de estruturas químicas em que já foram feitos os ensaios experimentais, *in vitro* ou *in vivo*, obtendo as informações completas e a partir dessas, utiliza o conceito de similaridade química para prever a toxicidade de novas estruturas químicas.

Essa plataforma fornece informações a respeito da toxicidade aguda, como a DL₅₀ (Dose necessária de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste), assim como a classificação da toxicidade e as porcentagens de similaridade química das moléculas testes com as estruturas do banco de dados. Esses resultados podem ser visualizados na tabela 3.

Tabela 3 – Resultados *in silico* da toxicidade aguda, classificação de toxicidade e porcentagem de similaridade e acurácia dos compostos testados.

Moléculas	DL50 (mg/kg)	Classificação da Toxicidade	Similaridade (%)	Acurácia (%)
3A	1000	4	37,37	23
3B	1000	4	35,88	23
3C	1600	4	34,45	23
3D	1000	4	34,91	23
3E	500	4	34,89	23
3F	1000	4	35,91	23
3G	1600	4	34,53	23
3H	500	4	34,89	23
3I	500	4	33,68	23
3J	1600	4	34,74	23
3K	1600	4	34,44	23
3L	500	4	33,65	23
3M	500	4	35,53	23
3N	1000	4	34,67	23
3O	500	4	34,06	23
3P	500	4	34,09	23
Média	931,25	4	34,85	23

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

A partir da análise dessas informações é possível verificar que todos os compostos foram classificados na classe 4 de toxicidade, com uma DL₅₀ que variou de 500 até 1600mg/Kg. Essa classificação varia da classe 1 (Mais tóxica - DL₅₀ ≤ 5 mg/Kg) e classe 6 (Não tóxica - DL₅₀ > 5000 mg/Kg), na classe 4 estão os compostos em que a DL₅₀ varia entre 300 e 2000mg/Kg sendo esses compostos caracterizados como nocivos para ingestão, segundo a classificação da GHS (*Globally Harmonised System*), que é um Sistema Globalmente Harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos (OECD, 1997).

A similaridade dos compostos testados com o banco de dados teve uma média de 34,85%, onde o composto 3A foi o mais similar com a base de dados (37,37%) e o composto 3L foi o que apresentou a menor porcentagem de similaridade com o banco de dados (33,65%). A acurácia de todos os compostos foi de 23%. A porcentagem de acurácia depende da semelhança do composto de entrada com compostos com valores conhecidos de DL₅₀. A porcentagem relativamente baixa de acurácia e similaridade química podem ser explicadas pelo fato de que os compostos testados são entidades químicas inéditas, fruto da hibridização de dois grupos distintos, embora muito bem conhecidos, da química medicinal.

O servidor fornece também informações a respeito da toxicidade de órgãos (hepatotoxicidade), desfechos de toxicidade (Mutagenicidade, Carcinogenicidade, Citotoxicidade e Imunotoxicidade) (Tabela 4), além de vias toxicológicas e alvos de toxicidade, fornecendo informações sobre o possível mecanismo molecular por trás dessa resposta tóxica.

Tabela 4 – Relatório de toxicidade *in vitro* dos compostos.

Moléculas	Hepatotoxicida	Carcinogenicidade	Imunotoxicidade	Mutagenicidade	Citotoxicidade
3A	Inativo (0,58)	Inativo (0,54)	Inativo (0,82)	Inativo (0,51)	Inativo (0,64)
3B	Inativo (0,59)	Inativo (0,53)	Inativo (0,82)	Inativo (0,53)	Inativo (0,61)
3C	Inativo (0,54)	Ativo (0,60)	Inativo (0,53)	Ativo (0,84)	Inativo (0,60)
3D	Inativo (0,61)	Inativo (0,53)	Ativo (0,51)	Inativo (0,52)	Inativo (0,61)
3E	Inativo (0,62)	Inativo (0,53)	Inativo (0,70)	Inativo (0,59)	Inativo (0,66)
3F	Inativo (0,60)	Inativo (0,55)	Ativo (0,51)	Inativo (0,61)	Inativo (0,62)
3G	Inativo (0,58)	Ativo (0,60)	Ativo (0,64)	Ativo (0,70)	Inativo (0,59)
3H	Inativo (0,60)	Inativo (0,54)	Ativo (0,68)	Inativo (0,61)	Inativo (0,60)
3I	Inativo (0,55)	Ativo (0,69)	Inativo (0,74)	Ativo (0,87)	Inativo (0,63)

3J	Inativo (0,54)	Ativo (0,60)	Inativo (0,53)	Ativo (0,84)	Inativo (0,60)
3K	Inativo (0,57)	Ativo (0,70)	Inativo (0,73)	Ativo (0,84)	Inativo (0,62)
3L	Inativo (0,54)	Ativo (0,64)	Ativo (0,64)	Ativo (0,84)	Inativo (0,60)
3M	Inativo (0,58)	Ativo (0,50)	Inativo (0,52)	Inativo (0,51)	Inativo (0,66)
3N	Inativo (0,58)	Inativo (0,56)	Ativo (0,68)	Inativo (0,53)	Inativo (0,62)
3O	Inativo (0,56)	Ativo (0,61)	Ativo (0,78)	Ativo (0,84)	Inativo (0,61)
3P	Inativo (0,60)	Inativo (0,55)	Ativo (0,82)	Inativo (0,52)	Inativo (0,63)

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Legenda: Entre parênteses está probabilidade de haver um determinado desfecho ou toxicidade orgânica. A cor azul sinaliza a inatividade e a cor vermelha sinaliza a atividade dos compostos. Ausência de coloração sinaliza que o método não foi capaz de atingir valores significativos de predição.

A probabilidade de haver um desfecho de toxicidade varia de 0 (improvável) a 1 (provável), onde os valores acima de 0,7 estão fortemente relacionados a atividade ou inatividade, a depender da classificação obtida pelo composto. Dessa forma, segundo a predição dessa ferramenta online, apenas o composto 3K se mostrou ativo para carcinogenicidade. O composto 3I pode ser classificado como potencialmente carcinogênico por atingir uma probabilidade de 0,69. Os compostos 3A, 3B, 3E, 3I e 3K se mostraram inativos para Imunotoxicidade, enquanto os compostos 3O e 3P demonstraram toxicidade *in silico* para células do sistema imune. Com relação à mutagenicidade os compostos 3C, 3G, 3I, 3J, 3K e 3O se mostraram ativos para esse desfecho.

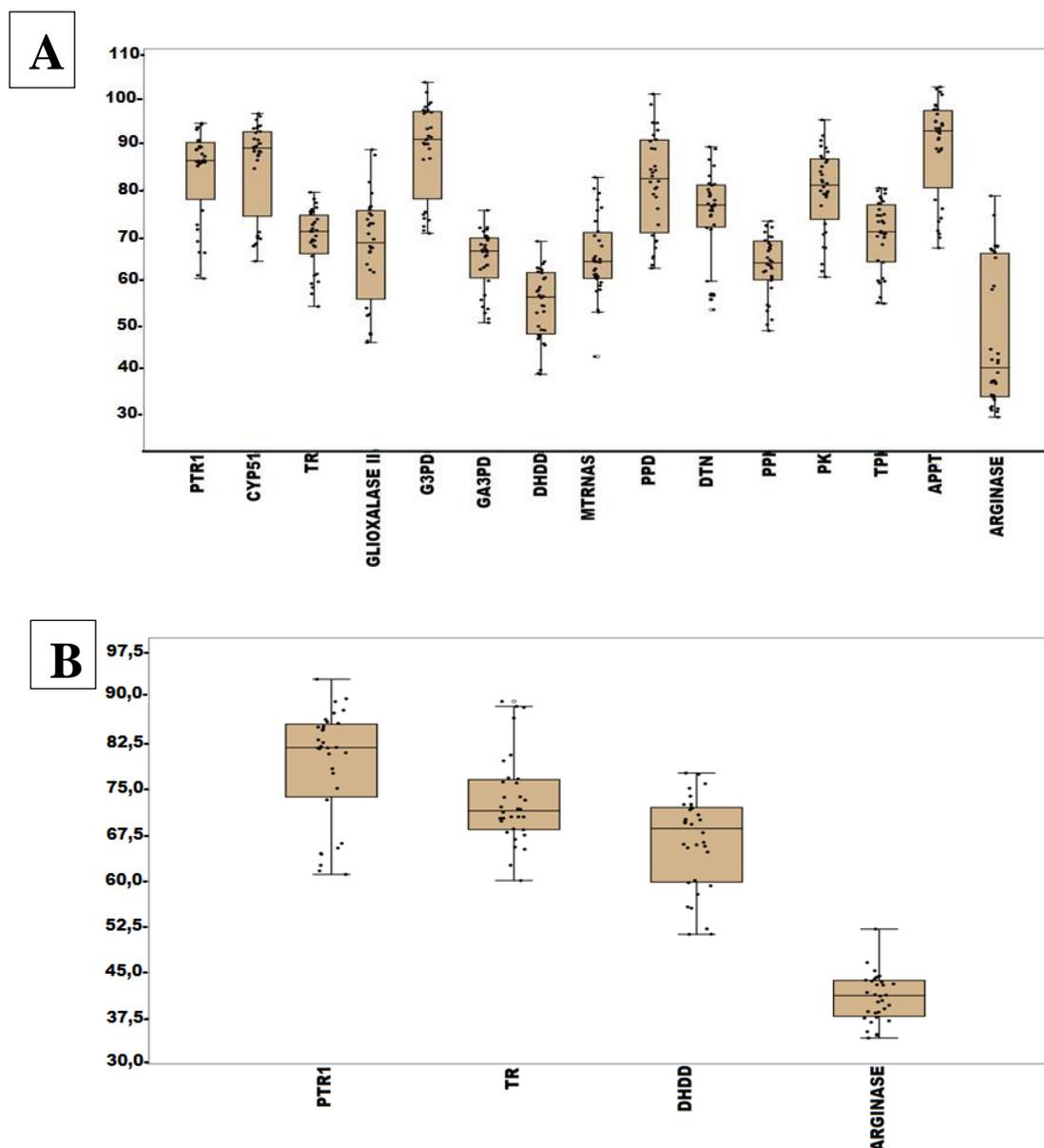
O servidor não encontrou vias toxicológicas e alvos de toxicidade para os compostos testados.

4.1.3 Docking Molecular

A partir da realização dos cálculos de *docking molecular* utilizando-se o programa GOLD foi possível obter os valores dos *scores* (funções de pontuação) e as estruturas dos complexos ligante-receptor, para posterior análise das interações intermoleculares utilizando-se o programa BINANA. A função de pontuação utilizada foi a padrão do programa, ChemPLP (Korb et al., 2006), com valores adimensionais e crescentes, ou seja, quanto maiores, melhor é

a afinidade do complexo ligante-receptor. O cálculo foi feito utilizando 15 diferentes estruturas de alvos biológicos conhecidos como potenciais para o tratamento da leishmaniose para a espécie de *L. infantum* e 4 alvos biológicos para a espécie de *L. amazonensis*. A variação dos resultados de *score* em cada alvo (em ambas as espécies) pode ser vista na figura 17.

Figura 17 – Variação dos valores de *score* em cada alvo avaliado nas espécies de *L. infantum* e *L. amazonensis*



Fonte: Gráficos gerados utilizando o software PAST versão 4. (HAMMER et al., 2001).

Legenda: (A) Valores de *score* para cada alvo para a espécie de *L. infantum*. (B) Valores de *score* para cada alvo para a espécie de *L. amazonensis*. Cada valor é graficado como um ponto. As caixas são desenhadas em uma variação dos quartis no intervalo de 25 – 75%. A mediana é mostrada com uma linha horizontal dentro da caixa. Os valores mínimo e máximo são mostrados com linhas horizontais curtas (“whiskers”). Os valores que representam “outliers” são mostrados como círculos fora dos intervalos definidos pelos “whiskers”.

A partir da análise da figura 15, é possível notar que a enzima arginase foi a que apresentou os menores valores de *score* em ambas as espécies analisadas. Para a espécie de *L. infantum*, neste alvo, houve grande variação nos valores de *score* apresentado pelos ligantes testados. O alvo que apresentou o maior valor de *score* para a espécie de *L. infantum* foi a enzima Glicerol-3-fosfato desidrogenase, com valores que chegaram a 103.73 do ligante 3G na configuração espacial S. Para a espécie de *L. amazonensis* o maior valor de *score* foi atingido pelo ligante 3C, na configuração espacial R, na enzima Pteridina Redutase 1 atingindo o valor de 93.22.

Além dos novos derivados híbridos, foi realizado também o cálculo de docking molecular para a miltefosina, droga de referência utilizada nos ensaios *in vitro*, afim de fazer um comparativo com os demais ligantes. A miltefosina é utilizada como fármaco de segunda escolha no tratamento da leishmaniose, seu mecanismo de ação ainda permanece desconhecido, porém sabe-se que esse fármaco é capaz de causar a apoptose das células dos parasitas, causar a perturbação das vias de sinalização celular dependentes de lipídios e causar a interrupção da homeostase de Ca^{2+} do parasita (DORLO et al., 2012; RAKOTOMANGA et al., 2007; PINTO-MARTINEZ et al., 2018). Os valores de *score* obtidos entre a miltefosina e os alvos analisados se manteve na média dos demais ligantes ou abaixo.

A seguir serão apresentados os valores de *score* de cada ligante em cada alvo analisado. Visando uma melhor organização estrutural, os resultados serão divididos para as espécies de *L. infantum* e *L. amazonensis*.

4.1.3.1 *L. infantum*

4.1.3.1.1 Adenina Fosforibosiltransferase

O cálculo de *docking* para essa enzima foi realizado utilizando-se um modelo de homologia que se baseou na estrutura tridimensional da Adenina Fosforibosiltransferase de *L. donovani* para se obter o modelo tridimensional da mesma enzima para a espécie de *L. infantum* atingindo uma identidade de 100%. Ao se observar os valores de *score* obtidos entre os compostos e a enzima adenina Fosforibosiltransferase (tabela 5), nota-se que ambos os

estereoisômeros atingiram valores de *score* considerados altos e que os ligantes na configuração R obtiveram, em sua maioria, valores mais altos quando comparados com aos mesmos ligantes na configuração S. O ponto foi utilizado como separador de casa decimal para manter o formato original oriundo do programa GOLD (linguagem americana).

Tabela 5 – Valores de score (ChemPLP) para as principais soluções de docking dos compostos em seus estereoisômeros para a Adenina Fosforibosiltransferase.

Moléculas	R	S
3A	72.76	66.86
3B	100.98	91.34
3C	96.67	89.01
3D	95.11	94.15
3E	69.17	70.02
3F	97.69	92.83
3G	98.48	88.62
3H	93.46	91.00
3I	75.60	77.58
3J	102.24	93.00
3K	94.56	98.71
3L	101.61	97.68
3M	73.50	70.67
3N	92.38	88.28
3O	94.94	102.69
3P	93.54	88.96
Miltefosina	75.97	

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

O maior *score* foi do ligante 3O, na configuração S, atingindo um valor de 102.69, seguido do ligante 3J, na configuração R, que chegou a um valor de 102.24, ambos demonstrando uma alta afinidade pelo sítio de ligação da enzima. O valor de *score* mais baixo, logo uma menor afinidade com o alvo, foi do ligante 3A (66.86), na configuração S, e o menor valor de *score* para a configuração R foi do ligante 3E (69.17). Para melhor compreender as razões que levaram a essas diferentes pontuações (33.07 e 35.83 para os estereoisômeros R e S, respectivamente) foi realizado o mapeamento das interações intermoleculares entre o melhor e o pior resultado em ambos os estereoisômeros (Tabela 6).

Tabela 6 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Adenina Fosforibosiltransferase).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3J)	Pior (3E)	Melhor (3O)	Pior (3A)
PHE42	CH	PIT	CH	CH
VAL39	CH	CH	CH	CH
VAL148	CH	CH	CH	CH
ARG82	CH	CH		Cat-pi
ARG41	3.2			
PRO40	CH	CH	CH	CH
PHE180	PI		PI	
ALA150		CH	CH	CH
ARG37		CH	Cat-pi	3.3
LEU181			CH	CH
ILE178		CH	CH	CH
ASP206			CH	
<i>Score</i>	102.24	69.17	102.69	66.86

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. Cat-pi s significa interação cátion- π , PI significa interação Pi-stacking e PIT significa interação T-stacking.

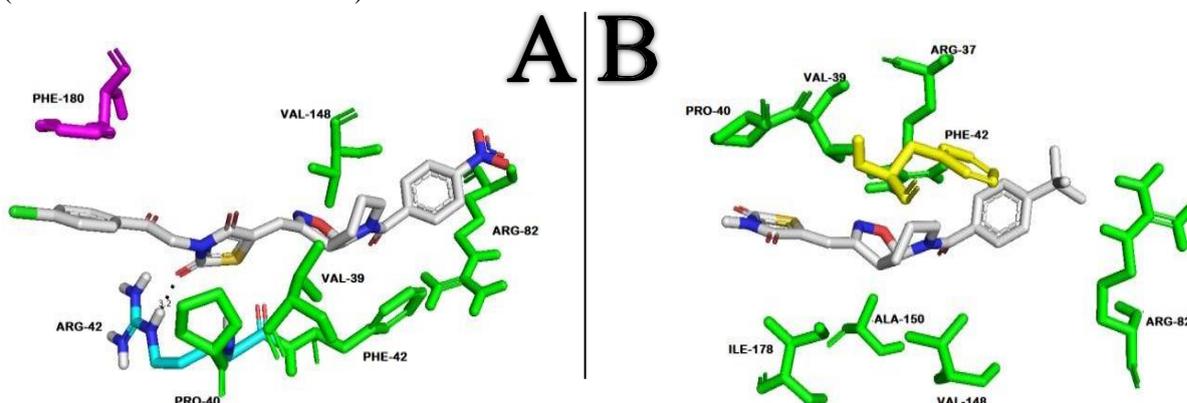
Ao analisar as interações presentes entre os ligantes e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação da enzima, é possível perceber que os resíduos de PHE42, VAL39, VAL148 e PRO 40 interagiram hidrofobicamente com todos os ligantes, se mostrando importantes para a formação de um complexo ligante-alvo estável. Os resíduos de ARG37 e ARG82 aparecem interagindo com os ligantes S-3O e S-3A, respectivamente, através da interação cátion-pi (interação não covalente entre a face de um anel aromático e um cátion adjacente). Além disso, os resíduos de ARG41 e ARG37 estabelecem ligação de hidrogênio com os ligantes R-3J e S-3A.

Na configuração R, o ligante 3J interagiu com o sítio de ligação da enzima através do contato hidrofóbico com 5 diferentes resíduos de aminoácido, uma ligação de hidrogênio (Com uma distância de 3.2Å entre o átomo doador e o átomo aceitador), com o resíduo de ARG41 além da interação Pi-stacking (interações não covalentes entre anéis aromáticos, geralmente um paralelo ao outro) com o resíduo de PHE180. Já o ligante 3E interagiu com o sítio de ligação da enzima através de contato hidrofóbico com 7 resíduos de aminoácido, e uma interação T-stacking, com o resíduo de PHE42. Apesar do ligante 3E interagir com o alvo de maneira significativa, as interações estabelecidas entre o ligante 3J e o sítio de ligação da enzima favoreceram a formação do complexo ligante-alvo com uma maior afinidade *in silico*.

A diferença estrutural entre esses dois ligantes consiste na presença do grupo nitro substituído na posição R1 para o ligante 3J, enquanto nesta mesma posição está o grupo T-butil

para o ligante 3E. Além disso, o ligante 3J apresenta o grupo de maior volume substituído na posição R2 (1-(4-clorofenil) etanona), enquanto o ligante 3E possui um átomo de hidrogênio nesta mesma posição. A presença de substituintes mais volumosos e eletronegativos parece garantir ao ligante 3J características que permitem uma maior interação com o sítio de ligação da enzima e assim atingir uma maior estabilidade, refletida no valor do *score*. As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 18 abaixo:

Figura 18 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3J (Lado A) e 3E (Lado B) e o alvo (Adenina Fosforibosiltransferase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

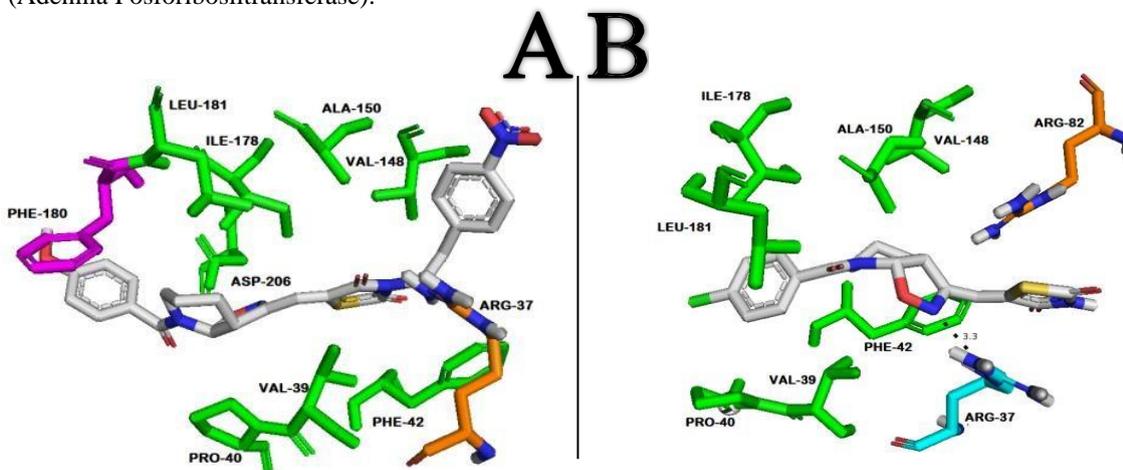
Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, a interação PI-stacking em rosa, a interação T-stacking em amarelo e ligação de hidrogênio em cyan.

Na configuração S, o ligante 3O interage com o sítio de ligação da enzima através de diferentes contatos hidrofóbicos (com 8 diferentes resíduos de aminoácido), interação Pi-stacking com o resíduo de PHE180 e interação cátion-pi com o resíduo de ARG37. Já o ligante 3A interage com a enzima através de contatos hidrofóbicos (com 7 diferentes resíduos de aminoácido), interação cátion-pi com o resíduo de ARG82 e uma ligação de hidrogênio com o resíduo de ARG37 a uma distância de 3.3Å entre o átomo doador e o átomo aceitador. Apesar de formar interações importantes com o alvo, o ligante 3A forma um complexo de menor estabilidade quando comparado com o ligante 3O.

A diferença estrutural entre esses dois ligantes consiste na presença do átomo de cloro como substituinte na posição R1 para o ligante 3A, enquanto o ligante 3O possui o grupamento metoxi nessa mesma posição. Além disso, o ligante 3O conta com a presença de um grupo volumoso na posição R2 (1-(4-nitrofenil) etanona). enquanto o ligante 3A possui um átomo de hidrogênio ligado a mesma. Assim como explicado anteriormente, essas diferenças estruturais em relação ao volume parecem assegurar ao ligante S-3O características que o permitem

interagir de forma mais estável com o alvo biológico. As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 19.

Figura 19 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3O (Lado A) e 3A (Lado B) e o alvo (Adenina Fosforibosiltransferase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, a interação PI-stacking em rosa, a interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cyan.

4.1.3.1.2 Esterol 14-Desmetilase (CYP51)

A estrutura tridimensional desse alvo estava disponível experimentalmente para a espécie de *L. infantum*, logo, não houve necessidade realizar uma modelagem por homologia. Ao se observar os valores de score obtidos entre os compostos e a enzima CYP51 (tabela 7), nota-se que não houve diferenças muito grandes entre os valores de *score* entre os estereoisômero R e S porém, todos os ligantes na configuração S obtiveram valores de *score* superior ao estereoisômero R.

Tabela 7 – Valores de score (ChemPLP) para as principais soluções de docking dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Esterol 14-Desmetilase (CYP51).

Moléculas	R	S
3A	67.48	69.15
3B	90.14	93.98
3C	89.03	95.4
3D	87.38	88,39
3E	67.28	68.91

3F	92.79	94.08
3G	88.37	96.17
3H	89.29	93.44
3I	67.85	69.58
3J	88.25	93.59
3K	90.91	96.76
3L	84.54	92.52
3M	63.92	70.42
3N	86.39	89.17
3O	89.54	91.14
3P	87.68	90.12

Miltefosina 81.24

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

O ligante 3K, na configuração S, atingiu o maior valor de *score* da série (96.76), porém esse resultado não foi muito diferente do melhor resultado do estereoisômero R, onde o ligante 3F atingiu um *score* de 92.79. Já o pior resultado de *score* foi do 3M (63.92), na configuração R, semelhante também ao pior resultado do estereoisômero S, em que ligante 3E atingiu um *score* de 68.91. Para melhor compreender as razões que levaram a essas diferentes pontuações (28.87 e 27.85 para os estereoisômeros R e S, respectivamente) o mapeamento das interações intermoleculares entre o melhor e o pior resultado em ambos os estereoisômeros foi então realizado (Tabela 8).

Tabela 8 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Esterol 14-Desmetilase).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3F)	Pior (3M)	Melhor (3K)	Pior (3E)
MET105	CH	CH		
PHE109	CH	CH		
TYR102	CH	CH	PI	CH
TYR115	CH		CH	CH
LEU126	CH			
ILE423	CH	3.0	3.1	2.7
CYS422	CH			CH
MET459	CH	CH	CH	CH
PHE104	CH		PIT	CH
VAL356	2.9			
VAL461	CH			
MET357	3.1	3.3		
ALA290		CH	CH	
LEU355		CH		CH
ALA287			CH	
LEU133			CH	
GLY424			CH	
PRO209			CH	CH
MET359			CH	

ALA286			CH	
LEU129			CH	
PHE289		CH		
LEU358		CH		
<i>Score</i>	92,79	63,92	96,76	68,91

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. PI significa interação Pi-stacking e PIT significa interação T-stacking.

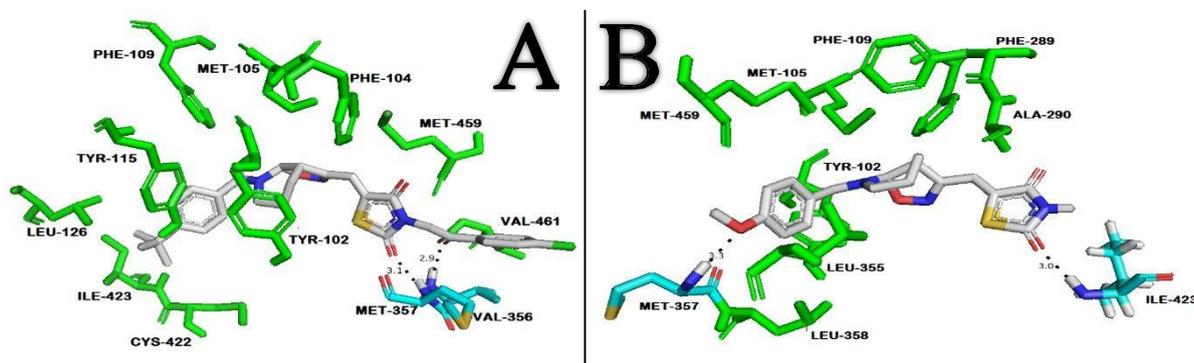
Os resíduos de TYR102, MET459, TYR115 e PHE104 interagiram hidrofobicamente com quase todos os ligantes. Os resíduos de ILE423, VAL356 e MET357 foram capazes de interagir com os ligantes através da ligação de hidrogênio e os resíduos de TYR102 e PHE104 formaram interações do tipo Pi-stacking e T-stacking, respectivamente.

Na configuração R, ambos os ligantes interagiram com o sítio de ligação através de ligação de hidrogênio e contato hidrofóbico, porém, o ligante 3F estabeleceu contatos hidrofóbicos com 10 diferentes resíduos de aminoácido enquanto o ligante 3M com 8 resíduos. Além disso, O ligante 3F formou duas ligações de hidrogênio a uma distância de 2.9Å e 3.1Å (entre o átomo aceitador e o doador), com os resíduos de VAL356 e MET357, respectivamente. Enquanto o ligante 3M estabeleceu ligações de hidrogênio a uma distância de 3.0 Å e 3.3 Å, com os resíduos de ILE423 e MET357, respectivamente. A menor distância entre os átomos participantes da ligação de hidrogênio e um maior número de contatos hidrofóbicos garantiram ao complexo formado entre o ligante 3F e o alvo uma maior estabilidade *in silico*.

A diferença estrutural entre esses dois ligantes está na presença do grupo T-butil no ligante 3F na posição do substituinte R1, enquanto nesta mesma posição o ligante 3M apresenta o grupo metoxi. Já no substituinte R2 o ligante 3F apresenta um grupo volumoso (1-(4-clorofenil) etanona), enquanto nesta mesma posição o ligante 3M apresenta um átomo de hidrogênio. Essas diferenças estruturais em relação ao volume e presença de grupamentos mais hidrofóbicos parecem ser as características que garantem ao ligante 3F possuir maior afinidade com o sítio de ligação do alvo biológico.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 20 abaixo:

Figura 20 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3F (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (CYP51).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

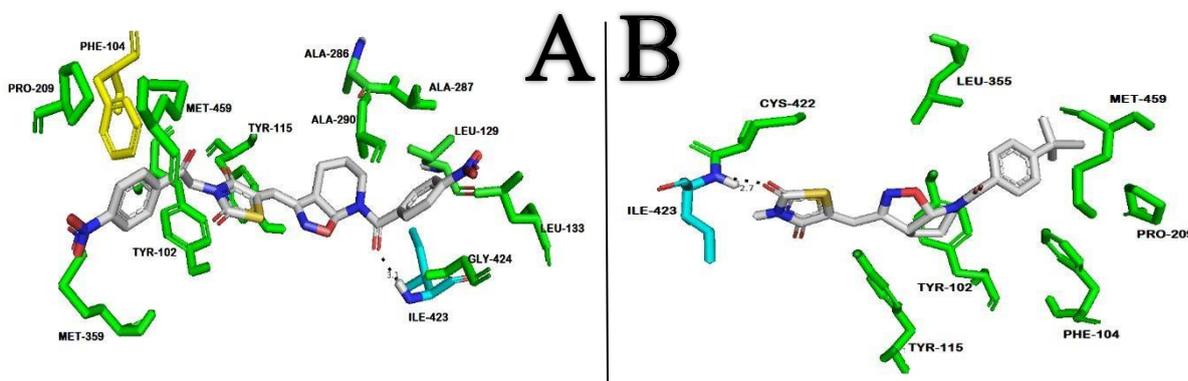
Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde e ligação de hidrogênio em cyan.

Já com relação ao estereoisômero S, o ligante 3K interage com o sítio de ligação da enzima de diferentes formas, como através da interação hidrofóbica com 12 diferentes resíduos, sendo 2 deles através da interação Pi-stacking (TYR102) e T-stacking (PHE104), além de também estabelecer uma ligação de hidrogênio com o resíduo de ILE423 (3.1Å - entre o átomo aceitador e o doador). Já o ligante 3E interage com 7 diferentes resíduos de aminoácido através de contato hidrofóbico e realiza uma ligação de hidrogênio com o resíduo de ILE423 a uma distância de 2.7Å. A maior variação de interações e um maior número de contato hidrofóbico estabelecido entre o ligante 3K e o alvo garantem uma maior estabilidade *in silico* com o alvo.

A diferença estrutural entre esses dois ligantes está na presença do grupo nitro como substituinte no R1 para o ligante 3K, enquanto o ligante 3E possui o grupo T-butil nesta mesma posição. Já no substituinte R2 o ligante 3K apresenta um grupo volumoso (1-(4-nitrofenil) etanona), enquanto nesta mesma posição o ligante 3E apresenta um átomo de hidrogênio. Novamente, essas alterações de volume e eletronegatividade parecem influenciar diretamente em uma maior afinidade com a enzima.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 21 abaixo:

Figura 21 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3K (Lado A) e 3E (Lado B) e o alvo (CYP51).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo e ligação de hidrogênio em ciano

4.1.3.1.3 Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase

O cálculo de *docking* para essa enzima foi realizado utilizando-se um modelo de homologia que se baseou na estrutura tridimensional da Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase de *L. major* para se obter o modelo tridimensional da mesma enzima para a espécie de *L. infantum* atingindo uma identidade de 96,64%. Ao se observar os valores de *score* das melhores soluções de *docking* encontradas para a Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase (tabela 9), nota-se que os estereoisômeros S apresentou uma maior afinidade com o sítio de ligação do alvo biológico.

Tabela 9 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase.

<u>Moléculas</u>	<u>R</u>	<u>S</u>
3A	55.41	56.29
3B	73.95	78.73
3C	76.68	71.01
3D	72.02	86.55
3E	56.49	59.48
3F	75.47	76.24
3G	77.51	88.89
3H	81.04	80.87
3I	71.35	81.21
3J	76.58	74.24

3K	79.89	78.36
3L	80.81	85.16
3M	53.13	56.62
3N	76.05	79.26
3O	75.14	82.91
3P	75.23	89.36
<u>Miltefosina</u>	<u>107.11</u>	

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Para esse alvo, o fármaco de referência analisado atingiu o *score* de 107.11, demonstrando uma alta afinidade *in silico* entre este ligante e a enzima. Na configuração R, o maior *score* foi de 81.04 do ligante 3H, já o menor valor de *score* foi de 53.13 do ligante 3M. Já na configuração S, o ligante que atingiu o maior *score* foi o 3P (89.36) e o que atingiu o *score* mais baixo foi o 3A (56.29). A diferença entre os valores de *score* variou de 27.91 e 33.07 para os estereoisômeros R e S, respectivamente. As razões intermoleculares que explicam essas diferenças podem ser vistas na tabela 10.

Tabela 10 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3H)	Pior (3M)	Melhor (3P)	Pior (3A)
PHE83	CH	CH	CH	CH
ARG186	Cat-pi	Cat-pi	Cat-pi	CH
TYR191	CH	PIT	CH	CH
ASN183	CH	CH		CH
ILE28	CH	CH	CH	CH
LYS192		CH		
LYS198	CH		CH	CH
GLU51	CH		CH	
LYS179		CH	CH	
HIS82	CH		CH	CH
ASP79	CH		CH	CH
GLU76	CH		CH	
ASN206				3.1
CA1	CH	CH	CH	
CA2	CH	CH	CH	
<i>Score</i>	81.04	53.13	89.36	56.29

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. Cat-pi significa interação cátion- π e PIT significa interação T-stacking.

Os resíduos de PHE83, TYR191, ASN183, ILE28 e os íons cálcio (presentes no sítio de ligação da enzima), interagem com quase todos os ligantes, demonstrando grande importância para a formação de um complexo ligante-alvo estável. Os resíduos de LYS179 e ARG186 interagem com os ligantes através de ligação de hidrogênio e interação do tipo Cátion- π ,

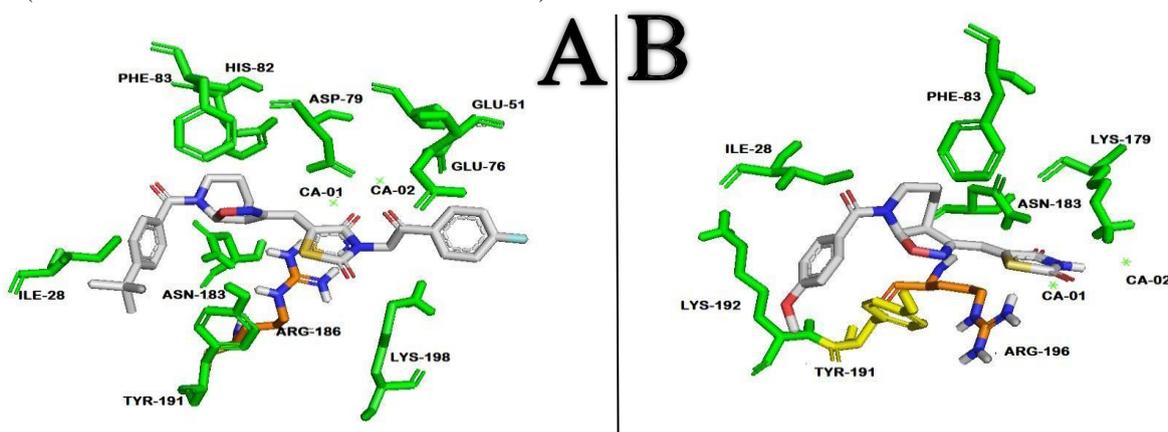
respectivamente. O resíduo de TYR191 foi o único capaz de estabelecer a interação do tipo T-stacking.

Na configuração R, o complexo ligante-alvo de maior estabilidade, ou seja, maior *score* (81.04) foi entre o ligante 3H e o alvo, onde houve a interação com 9 resíduos de aminoácido do sítio de ligação da enzima, além de estabelecer uma interação Cátion- π com o resíduo de ARG186 e interagir também com os íons de cálcio. Já o ligante 3M interagiu com o sítio de ligação da enzima através de contato hidrofóbico (com 6 diferentes resíduos de aminoácido), interação cátion- π com o resíduo de ARG186 e uma interação T-stacking com o resíduo de TYR191. Neste caso, os contatos hidrofóbicos formados entre o ligante 3H e o alvo tornaram o complexo final formado mais estável.

A diferença estrutural entre esses ligantes baseia-se no fato de que o ligante 3H possui o grupo T-butil ligado ao substituinte R1, enquanto nesta mesma posição o ligante 3M apresenta o grupo metoxi. O substituinte R2 do ligante 3M é composto por um átomo de hidrogênio, já o ligante 3H apresenta o grupo (1-(4-fluorofenil) etanona) nesta posição. A presença de grupamentos mais volumosos, eletronegativos e lipofílicos garantem ao ligante 3H uma maior afinidade *in silico* com o alvo.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 22 abaixo:

Figura 22 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo, interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cyan

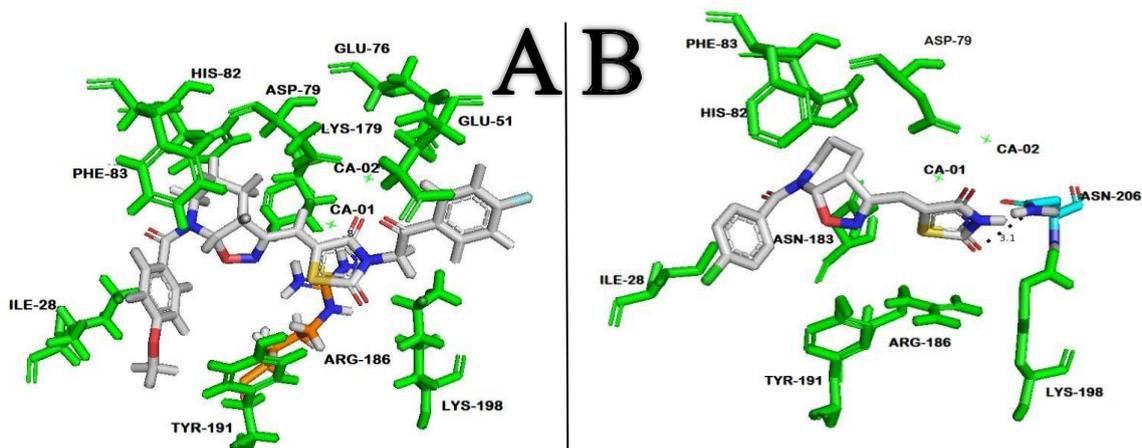
Já na configuração S, o ligante 3P interagiu hidrofobicamente com o alvo através de 11 contatos hidrofóbicos e uma interação cátion- π com o resíduo de ARG186. Já o ligante 3A

interagiu por contato hidrofóbico com 9 diferentes resíduos de aminoácido e estabeleceu uma ligação de hidrogênio com o resíduo de ASN206, a uma distância de 3.1Å (entre o átomo aceitador e o doador). Ambos os ligantes interagiram hidrofobicamente com os íons cálcio presentes no sítio de ligação da enzima. Apesar do ligante 3A interagir com o alvo de maneira significativa com o alvo, o maior número de contatos hidrofóbicos formados entre o ligante 3P e o sítio de ligação da enzima, garantiram uma maior estabilidade *in silico* do complexo final formado.

A diferença estrutural entre esses ligantes baseia-se no fato de que o ligante 3A possui o átomo de cloro ligado ao substituinte R1, enquanto esta posição é ocupada pelo grupo metoxi no ligante 3P. O substituinte R2 do ligante 3A é composto por um átomo de hidrogênio e o ligante 3P possui o grupo (1-(4-fluorofenil) etanona). A estrutura semelhante entre os ligantes 3H e 3P explicam a similaridade das interações formadas por estes e o sítio de ligação do alvo e sua maior afinidade *in silico* pelo alvo.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 23 abaixo:

Figura 23 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3P (Lado A) e 3A (Lado B) e o alvo (Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo, interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cyan.

4.1.3.1.4 Dihidroorotato desidrogenase

O cálculo de *docking* para essa enzima foi realizado utilizando-se um modelo de homologia que se baseou na estrutura tridimensional da Dihidroorotato desidrogenase de *L. major* para se obter o modelo tridimensional da mesma enzima para a espécie de *L. infantum* atingindo uma identidade de 96,15%. A partir da observação dos valores de *score* apresentados entre os compostos e a enzima dihidroorotato desidrogenase (tabela 11), nota-se que os ligantes no estereoisômero S apresentaram um maior valor de *score* quando comparados com o estereoisômero R.

Tabela 11 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Dihidroorotato desidrogenase.

<u>Moléculas</u>	<u>R</u>	<u>S</u>
3A	52.71	46.65
3B	61.54	68.35
3C	45.55	63.84
3D	59.99	61.34
3E	39.68	45.22
3F	57.21	57.55
3G	49.44	38.98
3H	62.46	62.00
3I	48.66	38.76
3J	56.33	54.04
3K	52.44	55.78
3L	56.12	63.33
3M	47.46	48.53
3N	58.15	60.28
3O	53.96	47.09
3P	61.41	62.34
<u>Miltefosina</u>	<u>62.84</u>	

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

O melhor resultado alcançado foi do ligante 3B (68.35) na configuração S e o pior *score* atingido foi do ligante 3I (38.76), na mesma configuração espacial. Na configuração R, para a estereoisômeria, o melhor *score* foi do ligante 3H (62.46), e o ligante que teve a menor afinidade pelo sítio de ligação da enzima foi o 3E (39.68). Para melhor compreender as razões intermoleculares que levaram a essas diferentes pontuações (22.78 e 29.59 para os estereoisômeros R e S, respectivamente) foi realizado o mapeamento das interações desses compostos com o alvo, exibido na tabela 12.

Tabela 12 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Dihidroorotato desidrogenase).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3H)	Pior (3E)	Melhor (3B)	Pior (3I)
VAL22	CH	CH	CH	CH
GLY21	CH	CH	CH	CH
ASN68	CH			2.6
MET70	CH		CH	CH
LYS44	CH			
GLY222	CH			CH
GLY250	CH		CH	
ALA19	CH	CH	CH	CH
GLY272	CH	CH	CH	CH
CYS249	CH			
HIS276	CH	CH	PIT/Cat-pi	CH
TYR59	PIT	CH	CH	CH
ARG58	CH		CH	
SER196			CH	CH
THR273			CH	
ASN195			CH	
LEU72				CH
SER45				CH
SER25		CH		
<i>Score</i>	62.46	39.68	68.35	38.76

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

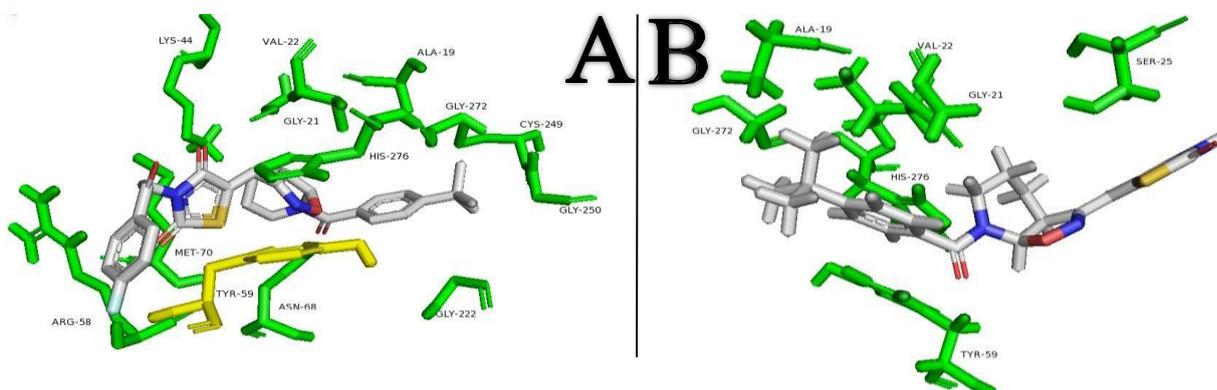
Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. Cat-pi significa interação cátion- π e PIT significa interação T-stacking.

Os resíduos de VAL22, GLY21, MET70, ALA19, GLY272, HIS276 e TYR59 interagiram hidrofobicamente com quase todos os ligantes. O resíduo de ASN68 foi o único capaz de estabelecer uma ligação de hidrogênio com o ligante S-3I.

Na configuração R, o ligante 3H interagiu hidrofobicamente com 12 diferentes resíduos de aminoácido, estabelecendo também uma interação do tipo T-stacking com o resíduo de TYR59. Já o ligante 3E interagiu hidrofobicamente com apenas 7 resíduos de aminoácido. O maior número de interações hidrofóbicas atingida pelo ligante 3H garantem uma maior estabilidade com o alvo. O ligante 3H difere estruturalmente do ligante 3E apenas na presença do grupo 1-(4-fluorofenil) etanona ligado ao substituinte R2, enquanto que o ligante 3E apresenta um átomo de hidrogênio nesta mesma posição. A presença de um grupo de maior volume e eletronegatividade favoreceu uma maior interação entre o ligante 3H e o sítio de ligação da enzima, formando um complexo ligante-alvo mais estável.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 24 abaixo:

Figura 24 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3E (Lado B) e o alvo (Dihidroorotato desidrogenase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

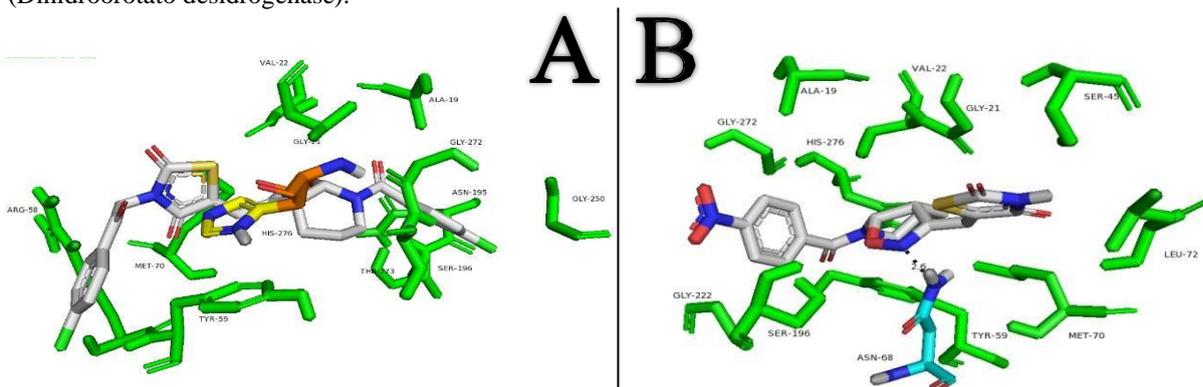
Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde e interação T-stacking em amarelo.

Já na configuração S, o ligante 3B interagiu hidrofobicamente com 12 diferentes resíduos de aminoácidos, além de estabelecer interações do tipo Cation- π e T-stacking com o resíduo de HIS276. O ligante 3I interagiu com 11 diferentes resíduos de aminoácido por contato hidrofóbico e formou uma ligação de hidrogênio com o resíduo de ASN68, a uma distância de 2.6Å (entre o átomo aceitador e o doador). Apesar do ligante 3I interagir com o sítio de ligação da enzima de maneira significativa, os tipos de interações formadas entre ligante 3B e o sítio de ligação da enzima levaram a formação de um complexo final ligante-alvo mais estável.

As diferenças estruturais entre esses dois ligantes baseiam-se na presença do átomo de cloro ligado ao substituinte R1 no ligante 3B e o grupo nitro nessa mesma posição no ligante 3I. Já no substituinte R2, o ligante 3B conta com a presença do grupamento 1-(4-clorofenil) etanona e o ligante 3I tem o átomo de hidrogênio nesta mesma posição. Novamente, um maior volume e eletronegatividade favorece a interação de maneira mais estável entre o ligante e o alvo.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 25 abaixo:

Figura 25 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3B (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Dihidroorotato desidrogenase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo, interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cyan.

4.1.3.1.5 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

O cálculo de *docking* para essa enzima foi realizado utilizando-se um modelo de homologia que se baseou na estrutura tridimensional da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *L. mexicana* para se obter o modelo tridimensional da mesma enzima para a espécie de *L. infantum* atingindo uma identidade de 62,12%. Ao se observar os valores de score obtidos entre os compostos e a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (tabela 13) nota-se que o estereoisômero S apresentou uma maior afinidade com o sítio de ligação da enzima, atingindo os maiores valores de *score*, na grande maioria dos ligantes.

Tabela 13 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

<u>Moléculas</u>	<u>R</u>	<u>S</u>
3A	53.77	59.59
3B	63.11	69.39
3C	65.25	75.24
3D	66.85	66.34
3E	55.32	56.34
3F	69.00	71.35
3G	67.65	69.56
3H	69.04	71.43
3I	52.39	50.24
3J	64.98	70.99
3K	65.95	62.99
3L	62.12	70.56

3M	53.30	51.11
3N	62.53	68.58
3O	66.03	67.48
3P	66.39	69.11
<u>Miltefosina</u>	<u>63.34</u>	

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

O maior valor de *score* atingido foi do ligante 3C na configuração S (75.24) e o menor valor de *score* também foi na configuração S do ligante 3I (50.24). Com relação aos estereoisômeros R, o maior valor de *score* foi do ligante 3H (69.04) e o menor valor de *score* foi do ligante 3I (52.39). Neste caso, o ligante que possuiu uma menor afinidade com o sítio de ligação da enzima, em ambas as configurações, foi o composto 3I. A diferença entre os valores de *score* variou de 16.65 e 25 para os estereoisômeros R e S, respectivamente. As razões intermoleculares que explicam essas diferenças no valor de *score* podem ser visualizadas na tabela 14.

Tabela 14 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3H)	Pior (3I)	Melhor (3C)	Pior (3I)
ARG11	3.2	3.1	CH	CH
ALA180			CH	CH
THR179		CH	3.1	
THR181			CH	
GLY10	CH		CH	
THR96	CH			
GLY8	CH			
CYS149	CH			
SER148	CH	CH		2.8
THR150				
ILE12	CH	CH	3.1	CH
GLY195			CH	
ASP192			CH	
GLY97	CH			
PRO121	CH			
GLY120	CH			
LEU34	CH			
ASP33	CH			
TYR317	PIT			
THR208		3.1		2.7
SER206			3.1	
ARG231			3.1	
THR119		3.1		
Score	69.04	52.39	75.24	50.24

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

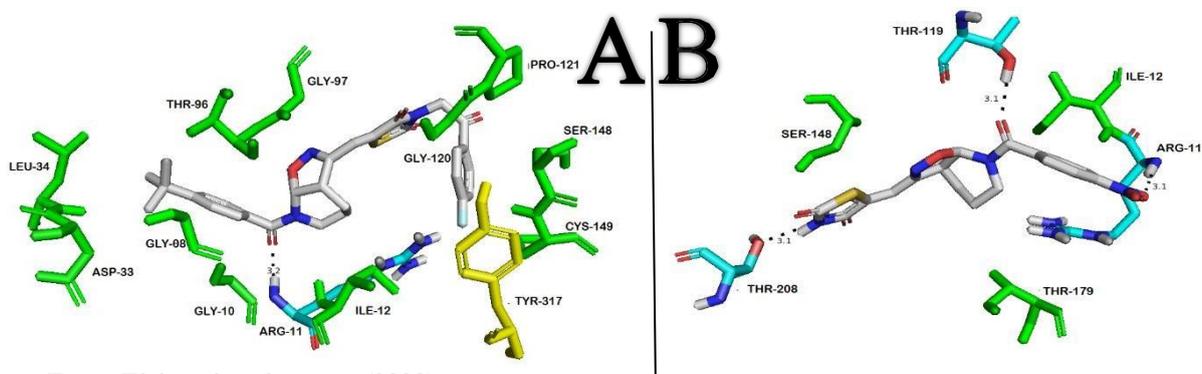
Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. PIT significa interação T-stacking.

A partir da análise dos dados da tabela 14 nota-se um grande número de ligações de hidrogênio entre os resíduos ARG11, THR179, SER148, ILE12, THR208, THR119, SER206 e ARG231 e os ligantes. O resíduo de TYR317 é o único capaz de interagir através de T-stacking.

Na configuração R, o ligante 3H interagiu hidrofobicamente com 12 diferentes resíduos de aminoácido, além de estabelecer uma interação do tipo T-stacking com o resíduo de TYR317 e de formar uma ligação de hidrogênio com o resíduo de ARG11, a uma distância de 3.2Å. Esta diversidade de interações garante ao ligante R-3H uma maior estabilidade com o sítio de ligação da enzima. O ligante 3I interagiu com o alvo através de ligação de hidrogênio com os resíduos de ARG11, THR119 e THR208, todos a uma distância de 3.1Å (entre o átomo aceitador e o doador) e hidrofobicamente com os resíduos de SER148 e ILE12. Apesar de formar 3 diferentes ligações de hidrogênio com o sítio de ligação da enzima, o complexo ligante-alvo final formado possuiu uma baixa estabilidade *in silico*.

A diferença estrutural entre esses dois compostos se baseia na presença do grupo nitro ligado no substituinte R1 no ligante 3I, enquanto que o ligante 3H possui o grupamento T-butil nesta mesma posição. Já no substituinte R1 o ligante 3H possui o grupo 1-(4-fluorfenil) etanona e o ligante 3I possui o átomo de hidrogênio nesta mesma posição. A presença de um grupamento mais hidrofóbico na posição R1 e do grupo mais volumoso e eletronegativo na posição R2 são características que favorecem a interação e maior afinidade entre o ligante 3H e o alvo. As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 26 abaixo:

Figura 26 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

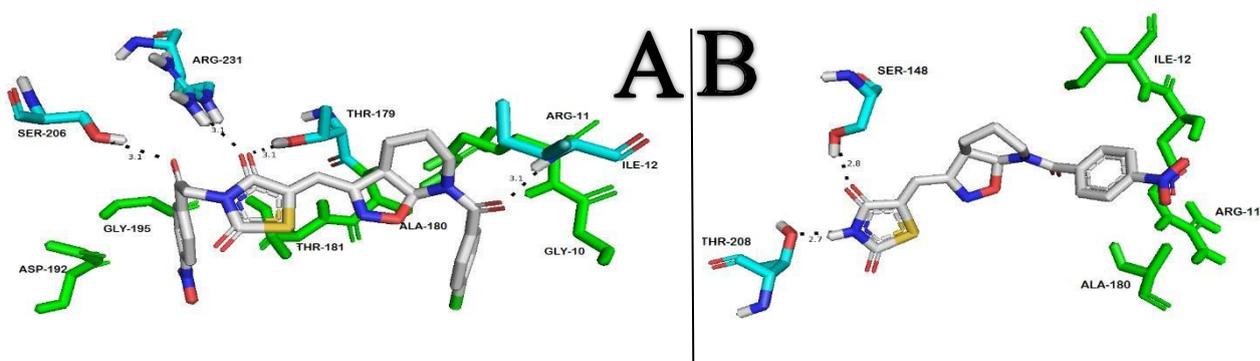
Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo e ligação de hidrogênio em cyan.

Na configuração S, o ligante 3C interagiu hidrofobicamente com 6 diferentes resíduos de aminoácido formando também 4 ligações de hidrogênio com os resíduos de THR179, ILE12, SER206 e ARG231, todos a uma distância de 3.1Å (entre o átomo aceitador e o doador), formando um complexo final de ligante-alvo bastante estável. Já o ligante 3I interagiu hidrofobicamente com 3 resíduos de aminoácido e formou duas ligações de hidrogênio com os resíduos de SER148 e THE208 a uma distância de 2.8Å e 2.7Å, respectivamente (entre o átomo aceitador e o doador). Essas diferenças de interações explicam a diferença de 25 pontos no *score* entre o melhor e o pior ligante.

Como falado anteriormente, o ligante 3I possui o grupo nitro ligado no substituinte R1 e o átomo de hidrogênio ligado ao substituinte R2, enquanto que o ligante 3C possui o átomo de cloro ligado ao substituinte R1 e o grupo 1-(4-nitrofenil) etanona ligado ao substituinte R2. A presença de um grupamento com maior volume e eletronegatividade na posição R2 favorece o maior número de contato entre o ligante e o alvo.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 27 abaixo:

Figura 27 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3C (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde e ligação de hidrogênio em cyan.

4.1.3.1.6 Glicerol-3-fosfato desidrogenase

O cálculo de *docking* para essa enzima foi realizado utilizando-se um modelo de homologia que se baseou na estrutura tridimensional da Glicerol-3-fosfato desidrogenase de *L.*

mexicana para se obter o modelo tridimensional da mesma enzima para a espécie de *L. infantum* atingindo uma identidade de 89,59%. Ao observar os valores de *score* obtidos entre os compostos e a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (tabela 15), nota-se que o estereoisômero S apresentou uma maior afinidade com o sítio de ligação da enzima para a maior parte dos ligantes.

Tabela 15 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Glicerol-3-fosfato desidrogenase.

<u>Moléculas</u>	<u>R</u>	<u>S</u>
3A	74.80	73.05
3B	86.79	97.23
3C	93.39	97.53
3D	90.04	97.56
3E	74.87	74.30
3F	90.95	101.49
3G	89.98	103.73
3H	93.64	91.79
3I	70.12	73.46
3J	90.00	98.26
3K	91.10	97.05
3L	91.51	98.81
3M	71.66	70.72
3N	88.96	97.18
3O	86.56	99.24
3P	90.22	96.78
<u>Miltefosina</u>		<u>87.42</u>

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Na configuração S, o ligante que atingiu o maior valor de *score* foi o 3G (103.73), sendo inclusive o valor mais alto de *score* obtido entre todos os resultados. Em contrapartida o menor valor de *score*, na configuração S, foi do ligante 3M (70.72), uma diferença de 33.01 pontos. Já na configuração R, o maior valor de *score* foi do ligante 3H (93.64) e o menor valor foi do ligante 3I (70.12), apresentando uma diferença de 23.52 pontos. As razões intermoleculares que explicam essas diferenças podem ser visualizadas na tabela 16.

Tabela 16 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Glicerol-3-fosfato desidrogenase).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3H)	Pior (3I)	Melhor (3G)	Pior (3M)
PHE98	PIT	CH	PI	CH
ILE47	CH	CH	CH	CH
GLY101	CH		CH	
PHE102	CH			CH
TRP45	CH	CH	CH	CH
GLN97	CH			
HIS46	CH		CH	

SER24	2.7	2.4 E 3.0	CH	
PRO95	CH	CH	CH	CH
GLY25	CH		CH	CH
TYR64	PIT		CH	CH
LYS48	Cat-pi			
ILE94		CH	CH	
LYS105		2.9		
SER106				2.5
<i>Score</i>	93.64	70.12	103.73	70.72

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. Cat-pi significa interação cátion- π , PI significa interação PI-stacking e PIT significa interação T-stacking.

Os resíduos de PHE98, ILE47, TRP45, SER24, PRO95, GLY25 e TYR64 interagiram com quase todos os ligantes, demonstrando grande importância para a formação de um complexo ligante-alvo estável. Os resíduos de SER106, LYS105 e SER24 interagiram com os ligantes através de ligação de hidrogênio. As interações T-stacking e PI-stacking foram realizadas através dos resíduos de PHE98 e TYR64. O único resíduo que interagiu através de Cátion- π foi a LYS48.

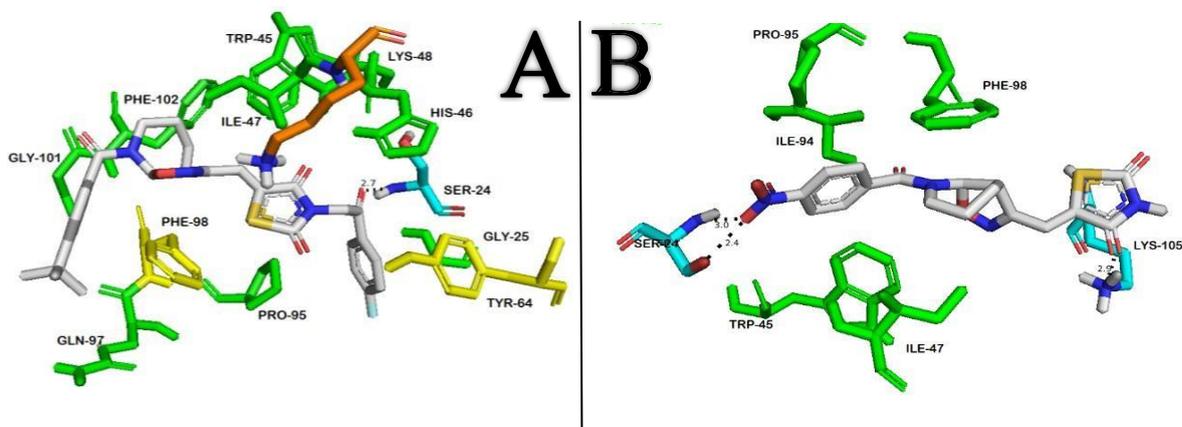
Na configuração R, o ligante 3H interagiu com o sítio de ligação da enzima através de contato hidrofóbico com 8 diferentes resíduos de aminoácidos, estabeleceu com os resíduos de PHE98 e TYR64 a interação do tipo T-stacking, com o resíduo de LYS48 interagiu através da ligação Cation- π e formou uma ligação de hidrogênio com o resíduo de SER24 a uma distância de 2.7Å (entre o átomo aceitador e o doador), o conjunto dessas interações levou a formação de um complexo ligante-alvo de alta estabilidade, refletida no valor de *score* de 93.64.

Já o ligante 3I interagiu com o alvo através de contatos hidrofóbicos com 5 diferentes resíduos de aminoácido, além da formação de 3 ligações de hidrogênio, a uma distância de 2.4Å e 3.0Å com o resíduo de SER24 e 2.9Å com o resíduo de LYS105. Neste caso, o mesmo resíduo de aminoácido (SER24) foi capaz de formar 2 ligações de hidrogênio em pontos diferentes de sua estrutura. Apesar dessas interações, a estabilidade do complexo ligante-alvo formada foi mais baixa quando comparada com o ligante R-3H.

A diferença estrutural entre esses compostos (detalhada no tópico anterior), garantem ao ligante 3H uma estrutura mais hidrofóbica, volumosa e eletronegativa, características essas que fornecem uma maior afinidade com os resíduos do sítio de ligação da enzima.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 28 abaixo:

Figura 28 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Glicerol-3-fosfato desidrogenase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

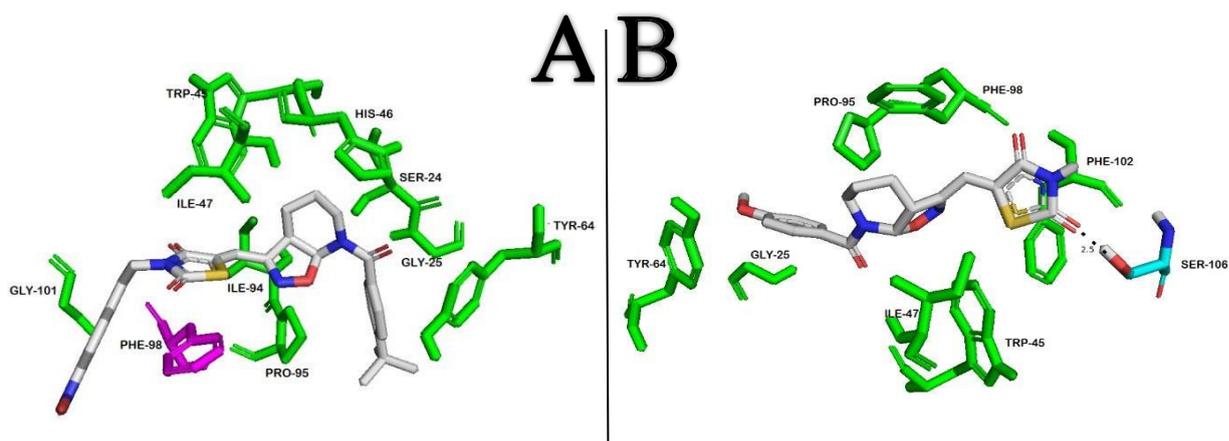
Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo, cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cyan.

Na configuração S, o ligante 3G interagiu com o sítio de ligação da enzima através do contato hidrofóbico com 9 diferentes resíduos de aminoácido, formando também uma interação do tipo PI-stacking com o resíduo de PHE98. Já o ligante 3M interagiu hidrofobicamente com 7 diferentes resíduos de aminoácido e com o resíduo de SER106, estabeleceu uma ligação de hidrogênio a uma distância de 2,5Å. Apesar dessa curta distância, portanto uma interação mais forte, formada entre o ligante 3M e o alvo, o maior número de contatos hidrofóbicos garantem ao complexo final ligante-alvo do composto 3G uma maior estabilidade e afinidade *in silico*.

O ligante 3G possui o grupo T-butil ligado no substituinte R1 e o grupamento ligado 1-(4-nitrofenil) etanona ao substituinte R2. Já o ligante 3M possui o grupo metoxi ligado ao substituinte R1 e átomo de hidrogênio ligado ao substituinte R2. Essas diferenças estruturais com a presença de um grupamento com maior volume e eletronegatividade na posição R2 favorecem a maior afinidade entre o ligante 3G e o alvo.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 29 abaixo:

Figura 29 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3G (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Glicerol-3-fosfato desidrogenase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação PI-stacking em rosa e ligação de hidrogênio em cian.

4.1.3.1.7 Fosfodiesterase 1

O cálculo de *docking* para essa enzima foi realizado utilizando-se um modelo de homologia que se baseou na estrutura tridimensional da Fosfodiesterase 1 de *L. major* para se obter o modelo tridimensional da mesma enzima para a espécie de *L. infantum* atingindo uma identidade de 97,21%. A partir da observação dos valores de *score* obtidos entre os compostos e a enzima Fosfodiesterase 1 (tabela 17), nota-se que o estereoisômero R foi o que atingiu uma maior afinidade com o alvo na maior parte dos ligantes.

Tabela 17 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Fosfodiesterase 1.

<u>Moléculas</u>	<u>R</u>	<u>S</u>
3A	64.98	62.35
3B	85.06	81.74
3C	82.86	84.36
3D	90.99	81.55
3E	69.67	66.88
3F	101.11	84.15
3G	93.08	75.60
3H	98.81	83.65
3I	68.46	64.59
3J	94.65	78.21
3K	91.99	72.02
3L	94.79	89.01
3M	68.27	63.04
3N	94.70	78.83
3O	88.91	80.34
3P	90.62	80.06

Miltefosina 71.57

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Na configuração R, o ligante que atingiu o maior *score* foi o 3F (101.11), sendo inclusive o valor mais alto de *score* obtido entre todos os resultados, já o ligante 3A foi o que obteve o menor *score* 64.98. Na configuração S, o ligante 3L foi o que obteve o maior *score*, atingindo 89.01 e o ligante 3A foi o que atingiu o menor valor de *score* da série (62.35). As diferenças entre esses valores de *score* variam entre 36.13 e 26.66, nos estereoisômeros R e S, respectivamente.

As razões intermoleculares que explicam essas diferenças podem ser visualizadas na tabela 18.

Tabela 18 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Fosfodiesterase 1).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3F)	Pior (3A)	Melhor (3L)	Pior (3A)
PHE857	CH	PIT		CH
VAL853	CH	CH	CH	CH
PHE890	CH	CH	CH	PI
TYR680	CH			
MET874	CH	CH		
GLY886	CH			
MET797	3.1	CH	CH	CH
ASN729	CH		CH	3.0
ALA798	CH			
ASN730	CH		CH	
VAL836			CH	
ASN838		2.6	CH	
HIS681			PIT/Cat-pi	CH
THR854			2.9	
GLN887				2.7
Score	101.11	64.98	89.01	62.35

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. Cat-pi significa interação cátion- π , PI significa interação PI-stacking e PIT significa interação T-stacking.

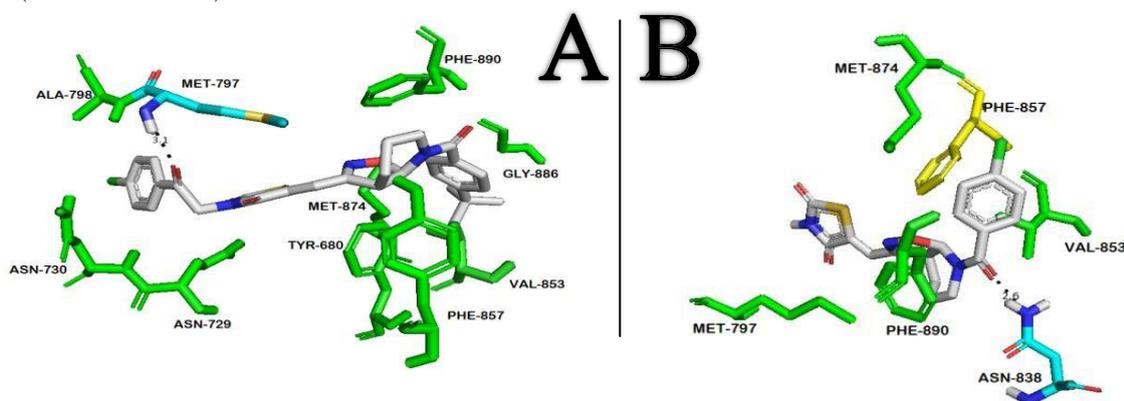
Os resíduos PHE857, VAL853, PHE890 e ASN729 interagem com a grande maioria dos ligantes. Já os resíduos de MET797, ASN729, ASN838, THR854 e GLN887 estabelecem ligação de hidrogênio com os compostos. O resíduo de HIS681 foi o único capaz de interagir através do contato T-stacking e ligação cátion- π .

Na configuração R, o ligante 3F interagiu hidrofobicamente com 9 diferentes resíduos de aminoácido, formando também uma ligação de hidrogênio com o resíduo de MET797 a uma distância de 3.1Å. Já o ligante 3A interagiu hidrofobicamente com 5 resíduos de aminoácido, sendo uma dessas através da interação T-stacking com o resíduo de PHE857. Formou também

uma ligação de hidrogênio com o resíduo de ASN838 a uma distância de 2.6Å (entre o átomo doador e o aceptor). O maior número de contatos hidrofóbicos entre o ligante 3F e os resíduos do sítio de ligação da enzima garantem uma maior estabilidade do complexo ligante-alvo formado.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 30.

Figura 30 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3F (Lado A) e 3A (Lado B) e o alvo (Fosfodiesterase 1).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo e ligação de hidrogênio em cian.

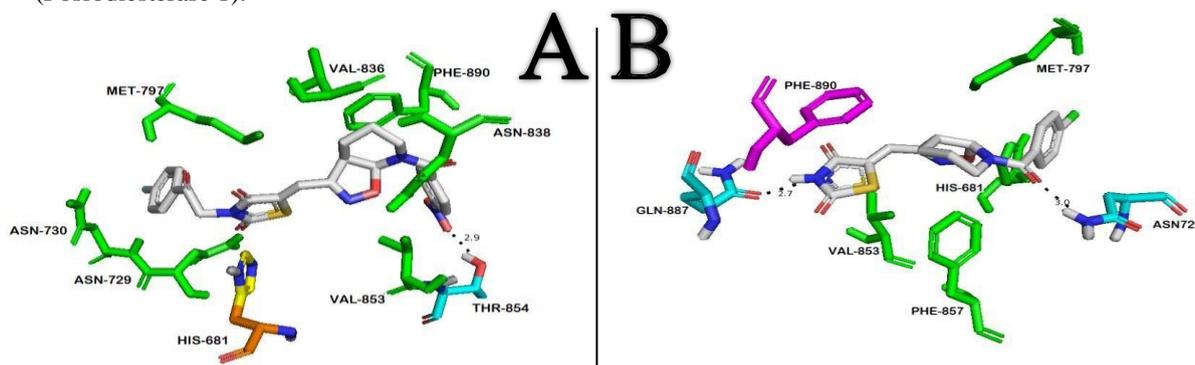
Na configuração S, o ligante 3L interagiu com 7 resíduos de aminoácido por contato hidrofóbico, formando inclusive uma interação do tipo T-stacking e cátion- π com o resíduo de HIS681 e estabeleceu uma ligação de hidrogênio com o resíduo de THR858 a uma distância de 2.9Å (entre o átomo doador e o aceptor). Já o ligante 3A interagiu com 4 diferentes resíduos por contato hidrofóbico, além de uma interação do tipo PI-stacking com o resíduo de PHE890 e duas ligações de hidrogênio com os resíduos de ASN729 e GLN887 a uma distância de 3.0Å e 2.7Å, respectivamente. Novamente, o maior número de contatos hidrofóbicos garante ao ligante 3L uma maior afinidade e estabilidade *in silico* com o receptor.

Esses compostos diferem estruturalmente nos substituintes R1 e R2, onde o ligante 3A é composto pelo átomo de cloro e hidrogênio, nos substituintes R1 e R2, respectivamente. O ligante 3F apresenta o grupo T-butil no substituinte R1 e o grupo 1-(4-clorofenil) etanona no substituinte R2. Já o ligante 3L apresenta o grupo nitro no substituinte R1 e o grupo 1-(4-fluorfenil) etanona no substituinte R2. A presença de grupos mais volumosos, hidrofóbicos e

eletronegativos garante uma maior interação com o sítio de ligação da enzima, levando a uma maior estabilidade *in silico* formada.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 31 abaixo:

Figura 31 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3L (Lado A) e 3A (Lado B) e o alvo (Fosfodiesterase 1).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo, interação PI-stacking em rosa, cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cyan.

4.1.3.1.8 Glioxalase II

A estrutura tridimensional desse alvo estava disponível para a espécie de *L. infantum*, logo, não houve necessidade de realizar uma modelagem por homologia. A tabela 19 contém os principais valores de *score* obtidos entre os compostos e a enzima Glioxalase II, onde é possível observar que a configuração S, na maior parte dos ligantes, apresentou um valor de *score* superior quando comparado a configuração R.

Tabela 19 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Glioxalase II.

<u>Moléculas</u>	<u>R</u>	<u>S</u>
3A	52.15	45.83
3B	66.83	88.75
3C	79.05	71.88
3D	66.10	75.38
3E	51.88	47.88
3F	66.91	74.58
3G	72.31	67.25

3H	72.34	73.25
3I	53.49	46.19
3J	61.45	76.11
3K	65.90	87.53
3L	61.99	75.86
3M	51.81	47.58
3N	68.82	74.15
3O	63.23	81.53
3P	70.04	76.07

Miltefosina 64.56

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

O maior *score* da série foi do ligante 3B, na configuração S, atingindo um valor de 88.75, já o valor de *score* mais baixo foi do ligante 3A, também na configuração S, que chegou a 45.83. Na configuração R, o ligante com mais afinidade pelo sítio de ligação, logo maior *score*, foi o R-3C (79.05), e o menor valor de *score* foi do ligante R-3M (51.81). A diferença entre esses valores de *score* varia entre 27.24 e 42.92, nos estereoisômeros R e S, respectivamente. A tabela 20 resume as principais razões intermoleculares que explicam essa diferença de *score*

Tabela 20 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Glioxalase II).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3C)	Pior (3M)	Melhor (3B)	Pior (3A)
HIS78	CH	CH	PI	
LYS77	CH			
HIS139	CH	Cat-pi/PIT	CH	PIT/Cat-pi
PHE175	CH	CH	CH	CH
TYR212	CH	CH	2.6	CH
PHE167	CH	CH	CH	CH
GLY172	CH	CH	CH	
ASP164	CH	CH		CH
TRP79	2.6			
ASP80			3.5	
PHE216			CH	
HIS210			Cat-pi	CH
ALA173		CH		
LYS22				3.1
Score	79.05	51.81	88.75	45.83

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

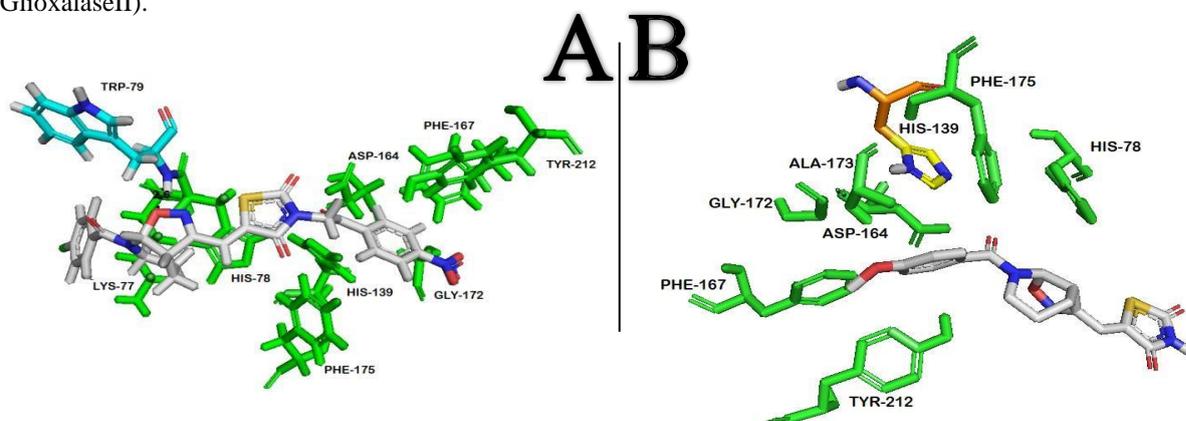
Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. Cat-pi significa interação cátion- π , PI significa interação PI-stacking e PIT significa interação T-stacking.

A partir da Análise dos dados da tabela 20, podemos notar que os resíduos de HIS78, HIS139, PHE175, TYR212, PHE167, GLY172 e ASP164 interagiram hidrofobicamente com quase, se não todos, os ligantes analisados. Os resíduos de TYR212, TRP79, ASP80 e LYS22 foram capazes de estabelecer ligação de hidrogênio com os compostos.

Na configuração R, o ligante 3C interagiu com o sítio de ligação da enzima através de contatos hidrofóbicos com 8 diferentes resíduos de aminoácido, além de estabelecer uma ligação de hidrogênio com o resíduo de TRP79 a uma distância de 2.6Å (entre o átomo doador e o átomo aceitador). Já o ligante 3M interagiu hidrofobicamente com o sítio de ligação da enzima através do contato com 7 diferentes resíduos de aminoácido, além de interagir também com o resíduo de HIS139 através da formação da ligação T-stacking e cátion- π . Neste caso, a presença da ligação de hidrogênio realizada entre o ligante 3C e o alvo, parece garantir uma maior estabilidade e afinidade *in silico*.

A diferença estrutural entre esses compostos se baseia na presença do átomo de cloro ligado ao substituinte R1 no ligante 3C, sendo essa mesma posição ocupada pelo grupo metoxi no ligante 3M. Já no substituinte R2, o ligante 3C apresenta o grupo 1-(4-nitrofenil) etanona, enquanto que o ligante 3M apresenta o átomo de hidrogênio nesta mesma posição. Essas diferenças de volume e eletronegatividade garantem ao ligante 3C características para obter uma maior afinidade com o sítio de ligação da enzima. As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 32 abaixo:

Figura 32 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3C (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (GlioalaseII).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

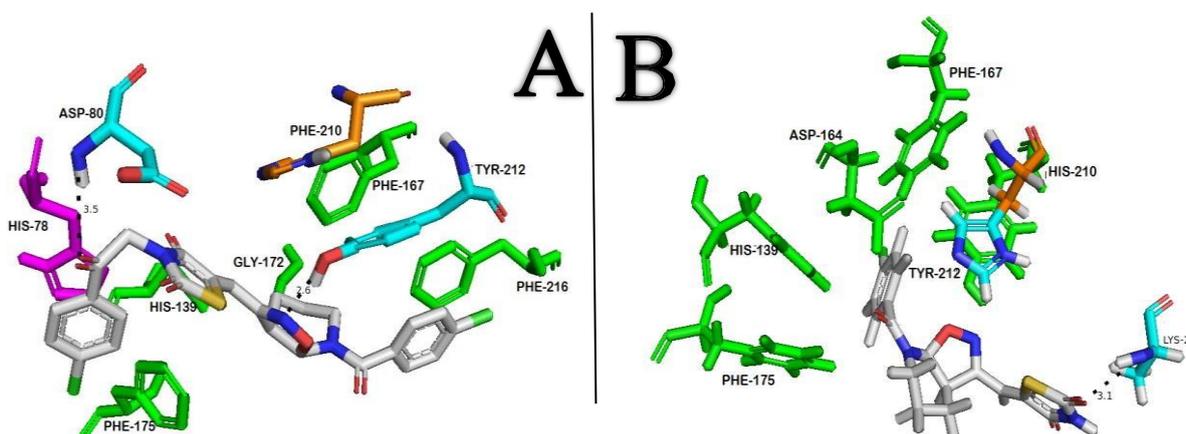
Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo, interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cian.

Já na configuração S, o ligante 3B interagiu com o sítio de ligação da enzima através de contato hidrofóbico (com 5 diferentes resíduos de aminoácido), interação pi-stacking com o resíduo HIS78, cátion- π com o resíduo HIS210 e uma ligação duas ligações de hidrogênio com o resíduo os resíduos ARG80 e TYR212, com distâncias a uma distância de 3.5Å e 2.6Å, respectivamente. Já o ligante 3A interagiu hidrofobicamente com 5 diferentes resíduos de

aminoácido, estabeleceu uma ligação de hidrogênio com o resíduo de LYS22 a uma distância de 3.1Å e interagiu com o resíduo de HIS139 através da ligação cátion- π e T-stacking. Neste caso, apesar dos dois ligantes interagirem de maneira semelhante com o alvo, o complexo final formado ligante-alvo do composto 3B apresentou uma maior estabilidade e afinidade *in silico*.

Esses dois compostos diferem estruturalmente apenas na presença do grupo 1-(4-clorofenil) etanona ligado ao substituinte R2 no ligante 3B, enquanto o ligante 3A apresenta o átomo de hidrogênio nesta mesma posição. A presença desse grupo substituinte mais volumoso e eletronegativo, parece garantir ao ligante 3B características para interagir de maneira mais intensa com o alvo, atingindo assim um maior valor de *score*. As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 33 abaixo:

Figura 33 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3C (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Glioxalase II).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação PI-stacking em rosa, interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cian.

4.1.3.1.9 Metionil-tRNA Sintetase

O cálculo de *docking* para essa enzima foi realizado utilizando-se um modelo de homologia que se baseou na estrutura tridimensional da Metionil-tRNA Sintetase de *L. major* para se obter o modelo tridimensional da mesma enzima para a espécie de *L. infantum* atingindo uma identidade de 97,42%. Ao observar os valores de *score* obtidos entre os compostos e a

enzima metionil-tRNA Sintetase (tabela 21), percebe-se que o estereoisômero S apresentou maior valor de *score* 9 dos 16 compostos testados.

Tabela 21 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Metionil-tRNA Sintetase.

<u>Moléculas</u>	<u>R</u>	<u>S</u>
3A	60.37	68.52
3B	70.53	69.61
3C	80.09	75.20
3D	75.84	77.60
3E	59.19	63.80
3F	63.68	60.53
3G	65.01	52.58
3H	42.70	61.02
3I	60.00	64.35
3J	57.59	57.25
3K	72.84	61.85
3L	53.07	67.30
3M	62.27	63.92
3N	58.50	64.48
3O	79.07	60.93
3P	64.15	82.57
<u>Miltefosina</u>	<u>93.47</u>	

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Neste alvo, a miltefosina atingiu um valor de *score* superior (93.47) aos demais ligantes analisados, demonstrando uma maior afinidade *in silico* pela enzima. O maior *score* atingido foi do ligante 3P na configuração S (82.57), seguido do ligante 3C na configuração R (80.09). O menor valor de *score* da série foi do ligante 3H na configuração R (42.70), já para a configuração S o menor valor de *score* foi do ligante 3G (52.58). As diferenças entre esses valores de *score* variam entre 37.39 e 29.99, nos estereoisômeros R e S, respectivamente e as principais razões intermoleculares que explicam essas diferenças podem ser vistas na tabela 22.

Tabela 22 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Metionil-tRNA Sintetase).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3C)	Pior (3H)	Melhor (3P)	Pior (3G)
TYR218	CH		CH	
PRO216	CH	CH	CH	CH
ILE487	CH	CH	CH	CH
TRP443	CH	CH	PI	CH
TYR219	CH	PIT e 2.7	PIT	CH
ALA446	CH	CH	CH	CH
ILE217	CH			CH
ASP256	CH		CH	CH
HIS491	CH	CH		CH
GLY484	CH			CH
TRP515	CH	CH	CH	CH

GLY227	CH		CH	
HIS225	CH			CH
LYS522	CH	Cat-pi		3.1
LYS525	2.6	CH		
LYS261		CH		
LEU447		CH		CH
PHE490		CH	PI	
LEU527		CH		
HIS513			CH	
TRP516			3.0	
ILE226			CH	
TYR450				CH
ASN449				CH
ASP486				CH
<i>Score</i>	80.09	42.70	82.57	52.58

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. Cat-pi significa interação cátion- π , PI significa interação PI-stacking e PIT significa interação T-stacking.

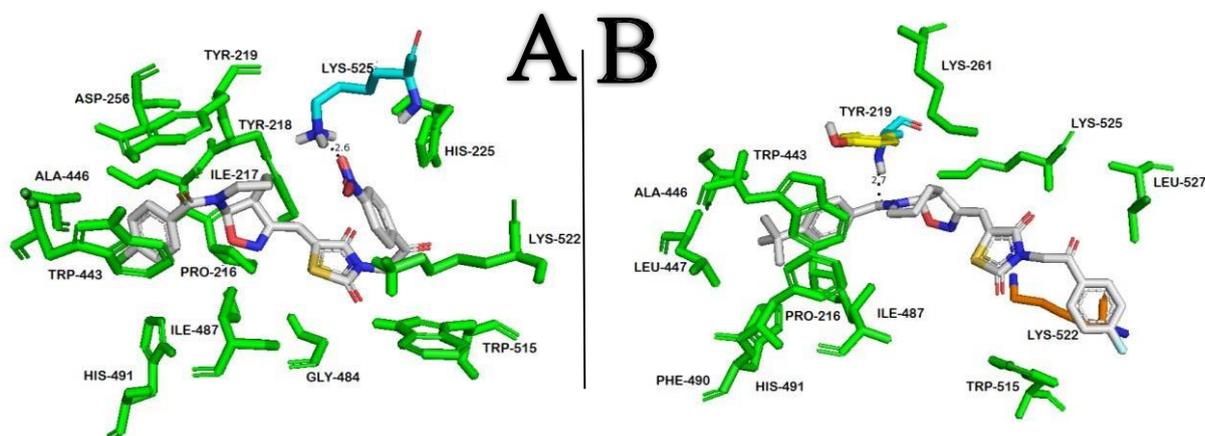
Os resíduos de PRO216, ILE487, TRP443, TYR219, ALA446, ASP256 e TRP515, interagem hidrofobicamente com quase, se não todos, os ligantes analisados. Já os resíduos de LYS525, TYR19, LYS522 e TRP516, interagem com os ligantes analisados através da formação de ligação de hidrogênio.

Na configuração R, o ligante 3C interage com o sítio de ligação da enzima hidrofobicamente com 14 diferentes resíduos de aminoácido e através de uma ligação de hidrogênio com o resíduo de LYS525 a uma distância de 2.6Å, entre o átomo doador e o aceptor. Já o ligante 3H interage com 13 diferentes resíduos de aminoácido por contato hidrofóbico, forma uma interação cátion- π com o resíduo de LYS522 e ainda uma interação T-stacking com o resíduo de TYR219 e uma ligação de hidrogênio com esse mesmo resíduo a uma distância de 2.7Å entre o átomo doador e o aceptor. Apesar de uma maior diversidade de interações entre o ligante 3H e o alvo, o maior número de contatos hidrofóbicos estabelecidos entre o ligante 3C e o sítio de ligação da enzima parece garantir uma maior estabilidade ao complexo ligante-alvo formado.

Esses compostos diferem estruturalmente na presença do átomo de cloro no ligante 3C substituído no R1 e o grupo T-butil no ligante 3H. Já no substituinte R2, o ligante 3C apresenta o grupo 1-(4-nitrofenil) etanona, enquanto que o composto 3H apresenta o grupo 1-(4-fluorfenil) etanona. Esses compostos apresentam semelhanças estruturais, pois ambos possuem grupos substituintes volumosos e eletronegativos, porém a posição de “encaixe” encontrada na solução de *docking* do ligante 3C favoreceu a uma maior afinidade e estabilidade *in silico* com

os resíduos de aminoácido do sítio de ligação do alvo. As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 34 abaixo:

Figura 34 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3C (Lado A) e 3H (Lado B) e o alvo (Metionil-tRNA Sintetase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

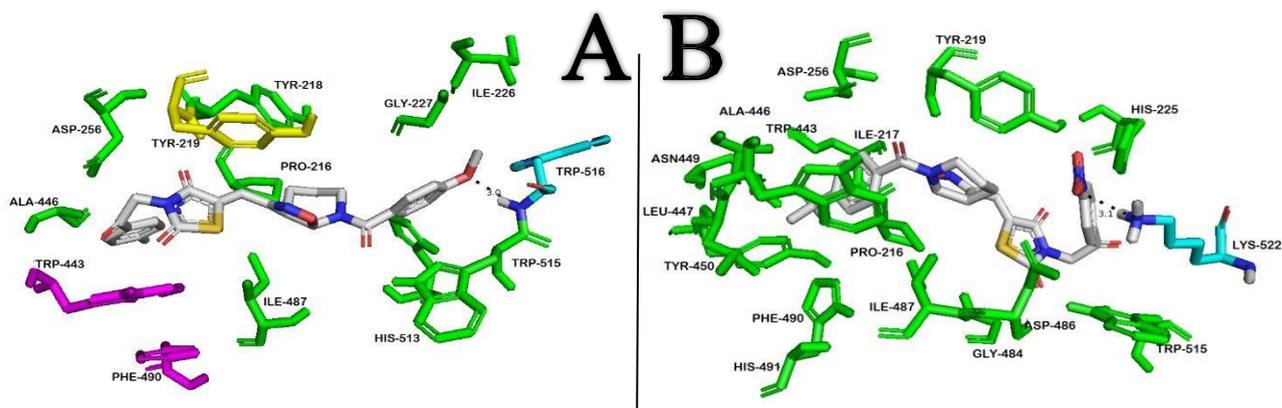
Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo, interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cian.

Na configuração S, o ligante 3P interagiu com o sítio de ligação da enzima através de contato hidrofóbico (com 12 diferentes resíduos de aminoácido), Interação PI-stacking com os resíduos de TRP443 e PHE490, interação T-stacking com o resíduo de TYR219 e estabeleceu uma ligação de hidrogênio com o resíduo de TRP517 a uma distância de 3.0Å, entre o átomo doador e o aceptor. Já o ligante 3G interagiu hidrofobicamente com 15 diferentes resíduos de aminoácido e estabeleceu uma ligação de hidrogênio com o resíduo de LYS523 a uma distância de 3.1Å, entre o átomo doador e o aceptor. Uma maior diversidade de interações garantiu ao ligante S-3P uma maior estabilidade *in silico* com o alvo.

Esses compostos diferem estruturalmente pela presença do grupo T-butil substituído no R1 do ligante 3G, já o ligante 3P possui grupo metoxi nesta posição. Para o substituinte R2, o ligante 3G apresenta o grupo 1-(4-nitrofenil) etanona, enquanto que o ligante 3P apresenta o grupo 1-(4-fluorfenil) etanona. A maior eletronegatividade do composto 3P parece ser a característica que garante uma maior afinidade com o sítio de ligação da enzima.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 35 abaixo:

Figura 35 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3P (Lado A) e 3G (Lado B) e o alvo (Metionil-tRNA Sintetase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo, interação PI-stacking em rosa e ligação de hidrogênio em cian.

4.1.3.1.10 Glicose-6-fosfato isomerase

O cálculo de *docking* para essa enzima foi realizado utilizando-se um modelo de homologia que se baseou na estrutura tridimensional da Glicose-6-fosfato isomerase de *L. mexicana* para se obter o modelo tridimensional da mesma enzima para a espécie de *L. infantum* atingindo uma identidade de 93,72%. Ao observar os valores de *score* obtidos entre os compostos e a enzima Glicose-6-fosfato isomerase (tabela 23), nota-se que os ligantes na estereoisômeria S atingiram uma maior afinidade com o alvo.

Tabela 23 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Glicose-6-fosfato isomerase.

Moléculas	R	S
3A	57.97	50.88
3B	61.55	69.40
3C	62.35	67.97
3D	61.75	71.90
3E	49.77	60.59
3F	66.95	66.67
3G	71.48	72.84
3H	68.54	63.77
3I	54.18	52.86
3J	62.90	64.16

3K	67.44	70.41
3L	63.31	69.31
3M	53.85	48.45
3N	60.17	59.64
3O	64.73	71.78
3P	63.18	66.22
<u>Miltefosina</u>	<u>68.64</u>	

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

O maior *score* da série foi do ligante 3G, na configuração S, atingindo um valor de 72.84 e o menor *score* foi do ligante 3M, também na configuração S, que chegou ao valor de 48.45. Para os ligantes na configuração R, o maior valor de *score* foi atingido, interessantemente, também pelo ligante 3G (71.48) e o menor valor foi ligante 3E (49.77). As diferenças entre esses valores de *score* variam entre 21.71 e 24.39, nos estereoisômeros R e S, respectivamente e as principais razões intermoleculares que explicam essas diferenças podem ser vistas na tabela 24.

Tabela 24 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Glicose-6-fosfato isomerase).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3G)	Pior (3E)	Melhor (3G)	Pior (3M)
LYS258	CH	CH	Cat-pi	CH
PHE318	CH	CH		
SER257	CH	CH	CH	CH
GLY324	CH	CH	CH	
GLY206	CH	CH	CH	
THR262	CH		CH	CH
GLN263	3.0		CH	
THR261	2.9		2.7	
THR259		3.1	CH	2.9 e 3.3
GLY205			CH	
GLN562		CH	CH	
GLN406			CH	
GLU410			CH	
SER207				CH
LYS569				2.8
<i>Score</i>	71.48	49.77	72.84	48.45

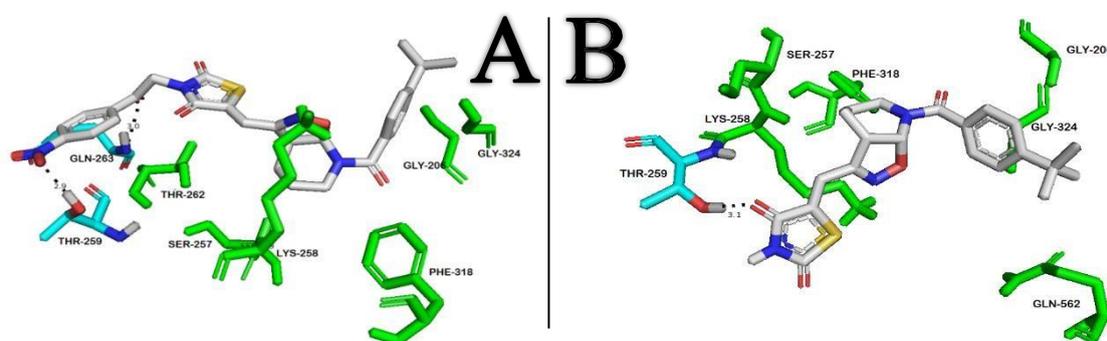
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. Cat-pi significa interação cátion- π .

Os resíduos de LYS258, SER257, GLY324 e GLY206 interagem com quase, se não todos, os ligantes analisados. Os resíduos de THR261, GLN263, THR259 e LYS269 interagem com os compostos por ligação de hidrogênio.

Na configuração R, o ligante 3G interagiu com o sítio de ligação da enzima através de contatos hidrofóbicos com 6 diferentes resíduos de aminoácido e formou 2 ligações de hidrogênio com os resíduos de GLN263 e THR261, a uma distância de 3.0Å e 2.9Å (entre átomo doador e o aceptor), respectivamente. O ligante 3E interagiu hidrofobicamente 6 diferentes resíduos de aminoácido e uma ligação de hidrogênio com o resíduo de THR259 a uma distância de 3.1Å (entre átomo doador e o aceptor). A presença das duas ligações de hidrogênio formadas entre o ligante R-3G e o alvo aumenta a estabilidade *in silico* do complexo ligante-alvo formado. As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 36 abaixo:

Figura 36 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3G (Lado A) e 3E (Lado B) e o alvo (Glicose-6-fosfato isomerase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

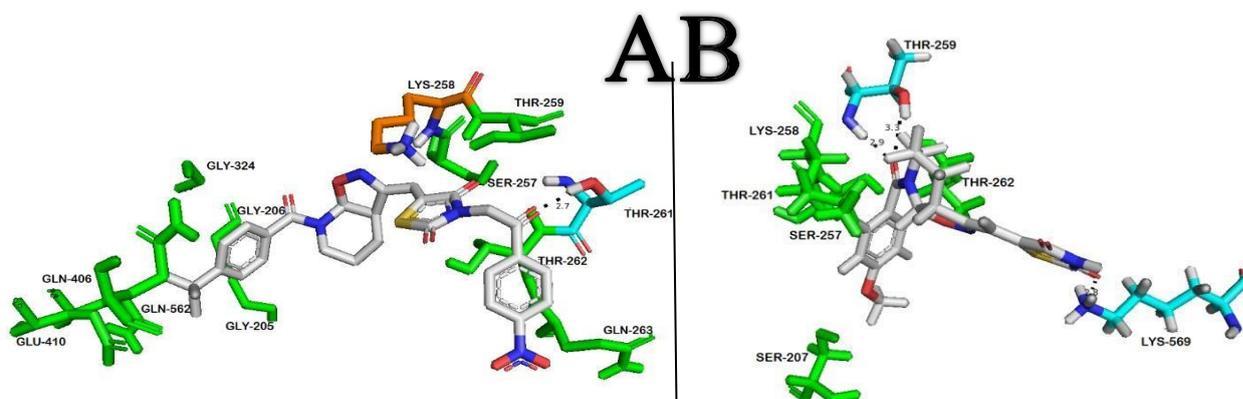
Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde e ligação de hidrogênio em cyan

Na configuração S, o ligante 3G interagiu com 10 diferentes resíduos de aminoácido através de contato hidrofóbico, além de formar uma interação cátion- π com o resíduo de LYS258 e uma ligação de hidrogênio com o resíduo de THR261 a uma distância de 2.7Å (entre átomo doador e o aceptor). Já o ligante 3M interagiu hidrofobicamente com 4 resíduos de aminoácido e estabeleceu 3 diferentes ligações de hidrogênio, sendo duas delas com o resíduo de THR259 a uma distância de 2.9Å e 3.3Å e uma delas com o resíduo de LYS569 a uma distância de 2.8Å (entre átomo doador e o aceptor). Neste caso, a presença de um maior número de contatos hidrofóbicos entre o ligante S-3G e o alvo levou a uma maior estabilidade *in silico* do complexo ligante-alvo formado.

A diferença estrutural entre esses compostos se baseia na presença do grupo T-butil presente no substituinte R1 nos ligantes 3E e 3G, enquanto que essa posição é ocupada pelo grupo metoxi no ligante 3M. A substituição do R2 no ligante 3E e 3M é composta por um átomo de hidrogênio, já o ligante 3G apresenta o grupo 1-(4-nitrofenil) etanona. A presença de substituintes volumosos, eletronegativo e hidrofóbicos garante ao ligante 3G a capacidade de interagir mais com o sítio de ligação da enzima.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 37 abaixo:

Figura 37 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3G (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Glicose-6-fosfato isomerase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cyan.

4.1.3.1.11 Pteridina Redutase 1 (PTR1)

O cálculo de *docking* para essa enzima foi realizado utilizando-se um modelo de homologia que se baseou na estrutura tridimensional da PTR1 de *L. major* para se obter o modelo tridimensional da mesma enzima para a espécie de *L. infantum* atingindo uma identidade de 90%. Ao observar os valores de score obtidos a partir da interação entre os compostos e a enzima PTR1 (tabela 25), nota-se que os ligantes na configuração R obtiveram uma maior afinidade (um maior valor de *score*) com o alvo.

Tabela 25 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Pteridina Redutase 1 (PTR1).

<u>Moléculas</u>	<u>R</u>	<u>S</u>
3A	70.97	65.81
3B	85.97	86.09
3C	88.68	93.68
3D	86.20	85.55
3E	68.33	65.92
3F	89.49	90.63

3G	94.61	94.29
3H	93.71	86.43
3I	75.20	60.07
3J	88.85	87.26
3K	90.72	85.77
3L	93.21	85.11
3M	72.01	60.79
3N	86.00	89.33
3O	89.21	90.83
3P	86.15	87.79
<u>Miltefosina</u>	<u>76.82</u>	

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Os maiores valores de *score* da série foi do ligante 3G, nas configurações R e S, atingindo 94.61 e 94.29, respectivamente. Já os piores valores de *score* foram dos ligantes 3E na configuração R que atingiu 68.33 e do ligante 3I, na configuração S chegando a 60.07. A diferença entre esses valores de *score* variam entre 26.28 e 34.22, nos estereoisômeros R e S, respectivamente e as principais razões intermoleculares que explicam essas diferenças podem ser vistas na tabela 26.

Tabela 26 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Pteridina Redutase 1).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3G)	Pior (3E)	Melhor (3G)	Pior (3I)
LEU226	CH	CH	CH	
TYR283	CH		CH	
LEU188	CH	CH	CH	
MET183	CH	CH	CH	
ASP181	CH			
TYR241	CH		PI	
PRO187	CH			
LEU189	CH			
PHE113	PI	CH	PI	PI
LEU18	CH		CH	CH
ARG17	CH	Cat-pi	CH	CH
GLY19	2.8	2.7	3.0	2.6
LEU229			CH	
SER227				CH
SER111		CH	CH	
ASN109		3.0	2.9	2.9
TYR194		3.1		2.6
<i>Score</i>	94.61	68.33	94.29	60.07

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

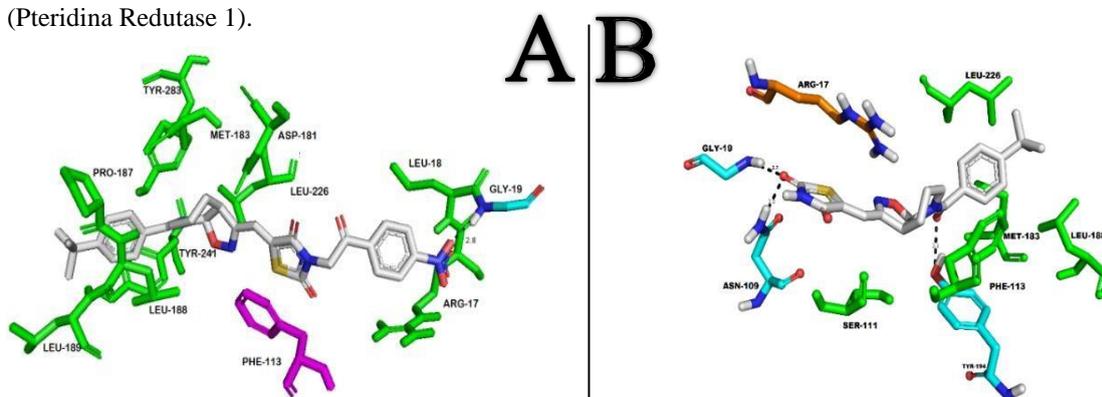
Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. Cat-pi significa interação cátion- π e PI significa interação PI-stacking.

Os resíduos de LEU226, LEU188, MET183 e ARG17 interagem hidrofobicamente com quase, se não todos, os ligantes analisados. O resíduo de GLY19 é capaz de estabelecer ligação

de hidrogênio todos os ligantes analisados, além deste, os resíduos de ASN109 e TYR194 também formam ligação de hidrogênio com os compostos. O resíduo de PHE113 interagiu hidrofobicamente com todos os ligantes testados, interagindo através de ligação PI-stacking com 3 dos 4 ligantes analisados.

Na configuração R, o ligante 3G interagiu hidrofobicamente com 11 diferentes resíduos de aminoácido, formou uma ligação PI-stacking com o resíduo de PHE113, além de estabelecer uma ligação de hidrogênio com o resíduo de GLY19 a uma distância de 2.8Å (ente o átomo doador e o aceptor). Já o ligante 3E interagiu com 5 resíduos de aminoácido por contato hidrofóbico, formou uma interação cátion- π com o resíduo de ARG17 e estabeleceu três ligações de hidrogênio com os resíduos de GLY19, ASN109 e TYR194 a uma distância de 2.7Å, 3.0Å e 3.1Å (entre o átomo doador e o aceptor), respectivamente. Um maior número de contatos hidrofóbicos realizados pelo ligante R-3G e o sítio de ligação da enzima garantiram uma maior estabilidade *in silico* do complexo ligante-alvo formado. As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 38 abaixo:

Figura 38 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3G (Lado A) e 3E (Lado B) e o alvo (Pteridina Redutase 1).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação PI-stacking em rosa, interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cyan

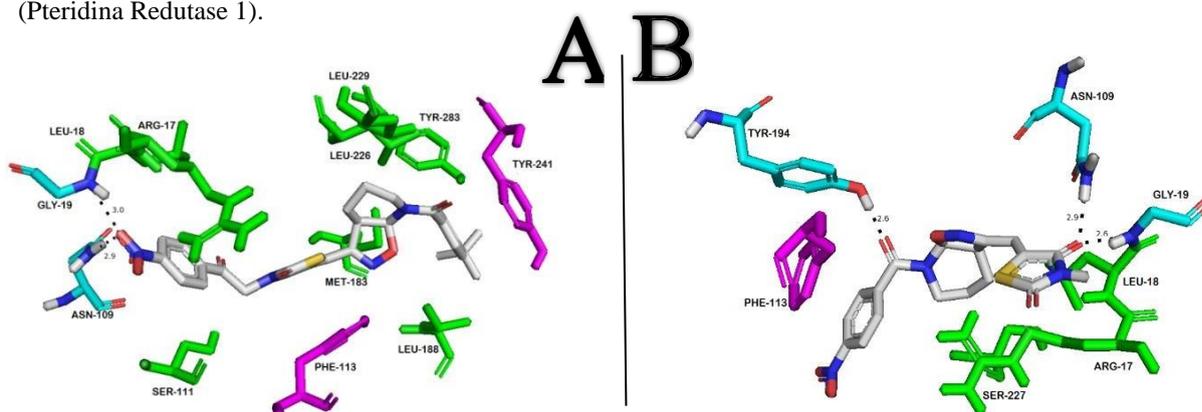
Na configuração S, o ligante 3G interagiu com o sítio de ligação da enzima através de contato hidrofóbico (com 8 diferentes resíduos de aminoácido), ligação PI-stacking com os resíduos de TYR241 e PHE113, além também de formar 2 ligações de hidrogênio com os resíduos de GLY19 e ASN109 a uma distância de 3.0Å e 2.9Å (ente o átomo doador e o aceptor). Enquanto o ligante 3I interagiu hidrofobicamente com 3 resíduos de aminoácido, formou uma interação do tipo PI- stacking com o resíduo de PHE113 e 3 ligações de hidrogênio com os resíduos de GLY19, ASN109, TYR194 a uma distância de 2.6Å, 2.9Å e 2.6Å (ente o

átomo doador e o receptor). Apesar do ligante S-3I interagir com o alvo através de ligações fortes, o maior número de contatos hidrofóbicos formados entre o ligante S-3G e o sítio de ligação da enzima garantiram uma maior estabilidade *in silico* do complexo ligante-alvo formado.

A diferença estrutural entre esses ligantes consiste na presença do grupo T-butil substituído no R1 nos ligantes 3E e 3G e o grupo nitro no ligante 3I. Já na substituição R2, os ligantes 3E e 3I apresentam o átomo de hidrogênio nessa posição, enquanto que o ligante 3G apresenta o grupo 1-(4-nitrofenil) etanona. Novamente, a presença de grupos mais volumosos, eletronegativos e hidrofóbicos garante ao ligante 3G uma maior interação com o sítio de ligação da enzima.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 39 abaixo:

Figura 39 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3G (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Pteridina Redutase 1).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação PI-stacking em rosa e ligação de hidrogênio em cyan.

4.1.3.1.12 Piruvato quinase

O cálculo de *docking* para essa enzima foi realizado utilizando-se um modelo de homologia que se baseou na estrutura tridimensional da Piruvato quinase de *L. mexicana* para se obter o modelo tridimensional da mesma enzima para a espécie de *L. infantum* atingindo

uma identidade de 94,98%. Ao observar os valores de *score* obtidos entre os compostos testados frente a enzima piruvato quinase (tabela 27), nota-se que os ligantes na configuração S obtiveram valores de *score* superiores em todos os compostos analisados.

Tabela 27 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Piruvato quinase.

<u>Moléculas</u>	<u>R</u>	<u>S</u>
3A	60.41	69.88
3B	81.22	86.79
3C	79.43	89.15
3D	78.70	83.19
3E	61.69	72.24
3F	81.98	91.86
3G	78.21	95.37
3H	78.89	90.81
3I	63.25	70.35
3J	83.87	85.92
3K	80.47	89.55
3L	81.52	87.31
3M	66.89	67.03
3N	79.26	84.99
3O	76.27	88.25
3P	79.58	86.40
<u>Miltefosina</u>	<u>69.67</u>	

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

O maior valor de *score* foi atingido pelo ligante 3G, na configuração S, chegando a um valor de 95.37 e o valor de *score* mais baixo dos ligantes, nesta mesma configuração, foi do composto 3M (67.03). Na configuração R, o ligante que atingiu o maior valor de *score* foi o 3J (83.87) e o menor valor de *score* foi do ligante 3A (60.41). As diferenças entre esses valores de *score* variam entre 23.46 e 28.34, nos estereoisômeros R e S, respectivamente e as principais razões intermoleculares que explicam essas diferenças podem ser vistas na tabela 28.

Tabela 28 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Piruvato quinase.).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3J)	Pior (3A)	Melhor (3G)	Pior (3M)
GLY340	CH	CH	CH	
LYS344	Cat-pi	CH	Cat-pi	Cat-pi
SER339	CH	CH		
THR35	CH	CH		
ALA343	CH	CH		
ASN60	CH	CH	CH	CH
HIS63	CH	Cat-pi	2.7	CH
GLY64	CH			CH

TYR68	PI	CH	CH	PI
GLN41	CH		CH	CH
GLY37		CH	CH	CH
PRO38		CH	CH	CH
HIS69			CH	
THR312			2.7	
THR305		CH		
ARG58		3.1		
<i>Score</i>	83.87	60.41	95.37	67.03

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

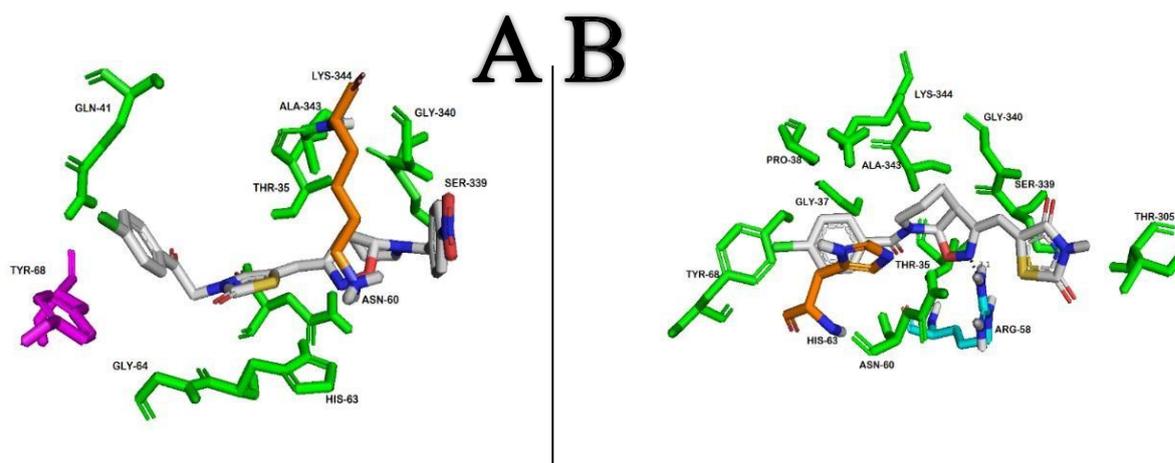
Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. Cat-pi significa interação cátion- π e PI significa interação PI-stacking.

Os resíduos de GLY340, ASN60, TYR68, GLN41, GLY37 e PRO38 interagiram através de contato com quase, se não todos os compostos analisados. O resíduo de LYS344 interagiu através da ligação Cátion- π com 3 dos 4 ligantes analisados. Os resíduos de HIS63, HIS69 e ARG58 interagiram com os ligantes através de ligação de hidrogênio.

Na configuração R, o ligante 3J interagiu hidrofobicamente com o alvo através de 8 diferentes resíduos de aminoácido, estabeleceu uma ligação do tipo PI-stacking com o resíduo de TYR68 e uma interação cátion- π com o resíduo de LYS344. Já o ligante 3A interagiu com os aminoácidos do sítio de ligação da enzima através de contato hidrofóbico (com 10 diferentes resíduos de aminoácido), uma interação cátion- π com o resíduo de HIS63 e uma ligação de hidrogênio com o resíduo de ARG58 a uma distância de 3.1Å (entre o átomo doador e o aceptor). Apesar do alto número de interações que o ligante R-3A estabeleceu com o alvo, as interações realizadas pelo ligante R-3J forneceram uma maior estabilidade *in silico* ao complexo ligante-alvo formado.

A diferença estrutural entre esses compostos consiste na presença do átomo de cloro no substituinte R1 no ligante 3A, enquanto essa mesma posição é ocupada pelo grupo nitro no ligante 3J. Já no substituinte R2, o ligante 3A apresenta o átomo de hidrogênio e o ligante 3J possui o grupo 1-(4-clorofenil) etanona. Um maior volume e eletronegatividade garante ao ligante 3J as características necessárias para uma interação mais forte com o alvo analisado. As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 40 abaixo:

Figura 40 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3J (Lado A) e 3A (Lado B) e o alvo (Piruvato quinase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

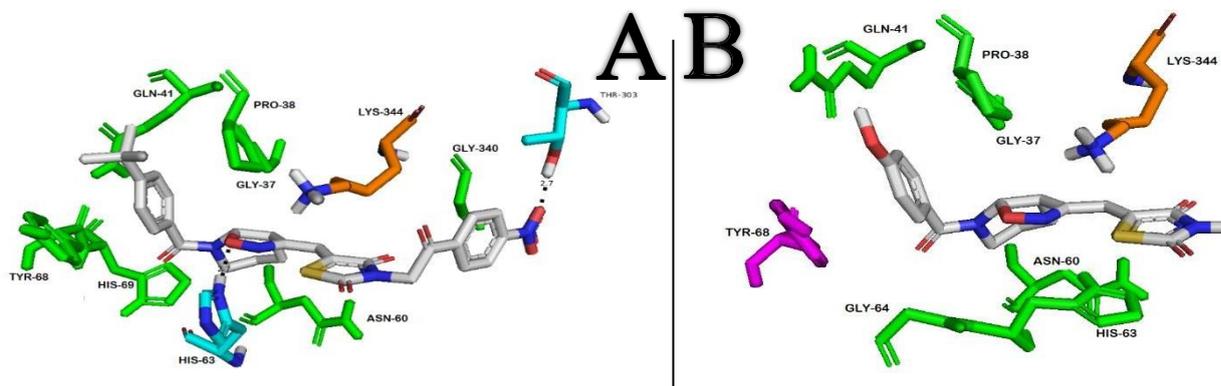
Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação PI-stacking em rosa, interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cian.

Na configuração S, o ligante 3G interagiu com o alvo através de contato hidrofóbico (com 7 diferentes resíduos de aminoácido), uma interação cátion- π com o resíduo de LYS344, e estabeleceu ligações de hidrogênio com o resíduo de HIS63 a uma distância de 2.7Å (entre o átomo doador e o aceptor) e com o resíduo de THR312 a uma distância de 2.7Å. Já o ligante 3M interagiu com o sítio de ligação da enzima através de contato hidrofóbico (com 5 diferentes resíduos de aminoácido), uma interação cátion- π com os resíduos de LYS344 e uma interação PI-stacking com os resíduos de TYR68. Apesar de ambos os ligantes interagirem com o alvo através de diversos tipos de interações, o complexo ligante-alvo formado com o composto S-3G foi mais estável quando comparado com o composto S-3M.

A diferença estrutural entre esses compostos consiste na presença do grupo T-butil no substituinte R1 no ligante 3G, enquanto que o ligante 3M apresenta o grupo metoxi nesta mesma posição. Já no substituinte R2, o ligante 3G apresenta o grupo 1-(4-nitrofenil) etanona e o ligante 3M apresenta o átomo de hidrogênio. Novamente, um maior volume, hidrofobicidade e eletronegatividade garantem ao ligante 3G características para interagir mais fortemente com o sítio de ligação da enzima.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 41 abaixo:

Figura 41 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3G (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Piruvato quinase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação PI-stacking em rosa, interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em ciano.

4.1.3.1.13 Triose-fosfato isomerase

O cálculo de *docking* para essa enzima foi realizado utilizando-se um modelo de homologia que se baseou na estrutura tridimensional da triose-fosfato isomerase de *L. mexicana* para se obter o modelo tridimensional da mesma enzima para a espécie de *L. infantum* atingindo uma identidade de 90,04%. Ao observar os valores de *score* obtidos entre os compostos testados frente a enzima triose-fosfato isomerase (tabela 29), nota-se que 9 das 16 moléculas analisadas, obtiveram maior valor de *score* na configuração S.

Tabela 29 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Triose-fosfato isomerase.

<u>Moléculas</u>	<u>R</u>	<u>S</u>
3A	60.09	59.58
3B	74.34	70.38
3C	70.57	69.90
3D	79.57	74.13
3E	59.46	59.07
3F	70.14	78.98
3G	72.87	79.86
3H	72.44	80.20
3I	54.74	55.86
3J	77.84	70.26
3K	67.61	74.07
3L	76.82	75.43
3M	54.50	64.06

3N	69.19	72.71
3O	69.46	78.27
3P	63.69	77.23
<u>Miltefosina</u>	<u>76.83</u>	

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

O maior valor de *score* da série foi do ligante 3H, na configuração S, atingindo um valor de 80.20 e o menor valor de *score* dessa configuração foi do ligante 3I (55.86). Na configuração R, o maior valor de *score* atingido foi do ligante 3D (79.57) e o menor valor foi do ligante 3M (54.50), sendo assim o menor valor de *score* da série analisada. As diferenças entre esses valores de *score* variam entre 25.07 e 24.34, nos estereoisômeros R e S, respectivamente e as principais razões intermoleculares que explicam essas diferenças podem ser vistas na tabela 30.

Tabela 30 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Triose-fosfato isomerase).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3D)	Pior (3M)	Melhor (3H)	Pior (3I)
GLY236	CH		CH	3.1
LEU239	CH			
GLY235	CH	CH	CH	CH
LYS14	CH	CH		3.1
LYS240	CH			
ILE173	CH	CH	CH	CH
GLU168	CH	CH	CH	
HIS96	Cat-pi	CH	CH	CH
LEU233	CH	CH	CH	
ASN12	3.4	CH	CH	
ILE93	CH	CH	CH	
CYS127	CH			
VAL234		CH	CH	
GLY174		CH	CH	CH
GLY213			CH	CH
ILE125			CH	
GLY176			CH	
SER214			3.3	
ASN16				CH
<i>Score</i>	79.57	54.50	80.20	55.86

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. Cat-pi significa interação cátion- π .

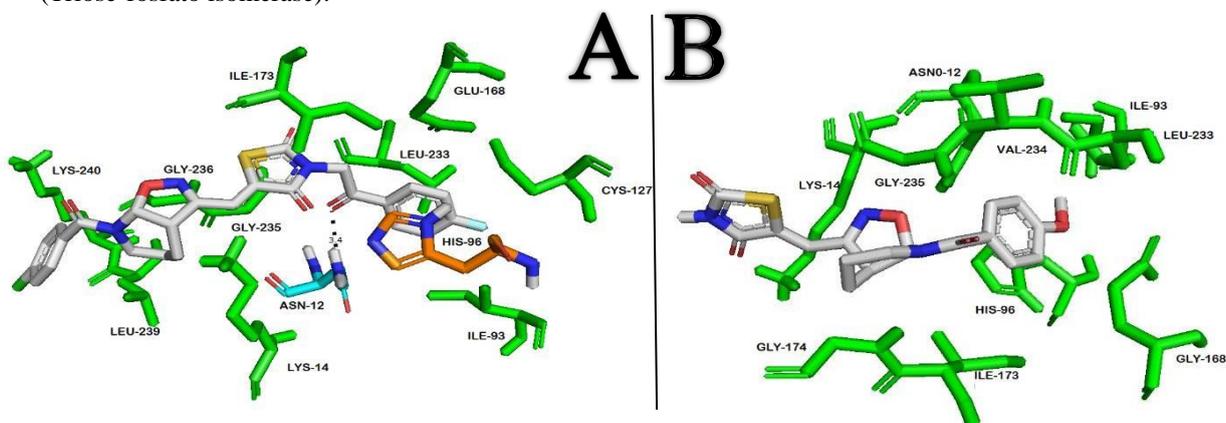
Os resíduos de GLY235, ILE173, GLU168, HIS96, LEU233 e ILE93 interagiram hidrofobicamente com quase, se não todos, os ligantes analisados da série. Os resíduos de GLY236, LYS14, ASN12 e SER214, interagiram com os ligantes através de ligação de hidrogênio.

Na configuração R, o ligante 3D interagiu com os resíduos do sítio de ligação através de contato hidrofóbico (com 10 diferentes resíduos), uma interação cátion- π com o resíduo de HIS93 e uma ligação de hidrogênio com o resíduo de ASN12 a uma distância de 3.4Å (entre o átomo doador e o aceptor). O ligante 3M interagiu com o alvo através de contatos hidrofóbicos com 10 diferentes resíduos. A maior variação de interação entre o composto 3D e o alvo garantiu uma maior estabilidade *in silico* ao complexo ligante-alvo formado.

Esses compostos diferem estruturalmente pela presença do átomo de cloro no substituinte R1 para o ligante 3D e o grupo metoxi no ligante 3M. Em relação ao substituinte R2, o ligante 3D apresenta o grupo 1-(4-nitrofenil) etanona, enquanto que o ligante 3M apresenta o átomo de hidrogênio nesta posição. As características estruturais que favorecem uma maior interação do ligante 3D e o alvo, quando comparado ao ligante 3M, é um maior volume espacial e eletronegatividade.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 42 abaixo:

Figura 42 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3D (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Triose-fosfato isomerase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cyan.

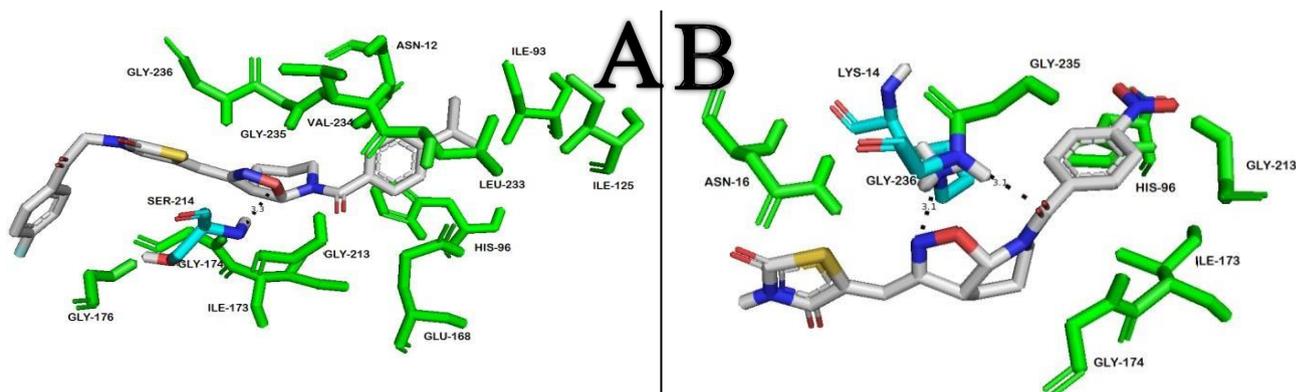
Na configuração S, o ligante 3H interage hidrofobicamente com 13 diferentes resíduos de aminoácido e forma uma ligação de hidrogênio com o resíduo de SER214 a uma distância de 3.3Å (entre o átomo doador e o aceptor). Já o ligante 3I, interage com o sítio de ligação da enzima através do contato hidrofóbico (com 6 diferentes resíduos de aminoácido) e forma duas ligações de hidrogênio com os resíduos de GLY236 e LYS14 ambos a uma distância de 3.1Å.

Um maior número de contatos hidrofóbicos garante ao ligante 3H uma maior interação com a enzima, formando um complexo ligante-alvo de alta estabilidade *in silico*.

Esses ligantes diferem estruturalmente pela presença do grupo T-butil no substituinte R1 no ligante 3H, enquanto o ligante 3I apresenta o grupo nitro nessa posição. Já no substituinte R2, o ligante 3H apresenta o grupo 1-(4-fluorfenil) etanona, enquanto que o ligante 3I apresenta o átomo de hidrogênio. A presença de grupos mais volumosos, hidrofóbicos e eletronegativos garante ao ligante 3H uma maior afinidade pelo sítio de ligação da enzima.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 43 abaixo:

Figura 43 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Triose-fosfato isomerase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde e ligação de hidrogênio em cian.

4.1.3.1.14 Tripanotiona Redutase

A estrutura tridimensional desse alvo estava disponível para a espécie de *L. infantum*, logo, não houve necessidade de realizar uma modelagem por homologia. Ao observar os valores de *score* obtidos entre os compostos testados frente à enzima Tripanotiona Redutase (tabela 31), nota-se que 9 das 16 moléculas analisadas, o maior *score* foi na configuração R.

Tabela 31 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Tripanotiona Redutase.

Moléculas	R	S
3A	61.09	60.75
3B	68.52	73.28
3C	74.47	67.13
3D	75.01	76.93
3E	56.67	59.34
3F	75.86	74.95
3G	79.25	72.10
3H	77.78	68.73
3I	58.07	65.07
3J	72.62	72.05
3K	70.76	67.43
3L	68.11	75.47
3M	53.85	58.92
3N	70.55	70.64
3O	70.54	69.56
3P	71.18	68.26
<u>Miltefosina</u>	<u>67.32</u>	

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

O maior valor de *score* da série foi do ligante 3G (79.25), na configuração R e o menor valor atingido nessa configuração foi do ligante 3M (53.82), sendo também o menor *score* da série analisada. Na configuração S, o maior *score* foi do ligante 3D (76.93) e o menor valor, também foi do ligante 3M (58.92). As diferenças entre esses valores de *score* variam entre 25.43 e 18.01, nos estereoisômeros R e S, respectivamente e as principais razões intermoleculares que explicam essas diferenças podem ser vistas na tabela 32.

Tabela 32 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Tripanotiona Redutase).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3G)	Pior (3M)	Melhor (3D)	Pior (3M)
LEU17	CH	CH	CH	CH
ILE339	CH		CH	
TRP21	CH	CH	CH	CH
TYR110	CH	CH	CH	CH
MET113	CH	CH	CH	CH
SER14	CH	CH		2.7
VAL58			CH	
CYS57			CH	
VAL53		CH		CH
THR335	CH		CH	
ASP116	CH			
THR117	3.0			
PRO336	CH			
GLY49				3.0

Score	79.25	53.85	76.93	58.92
-------	-------	-------	-------	-------

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

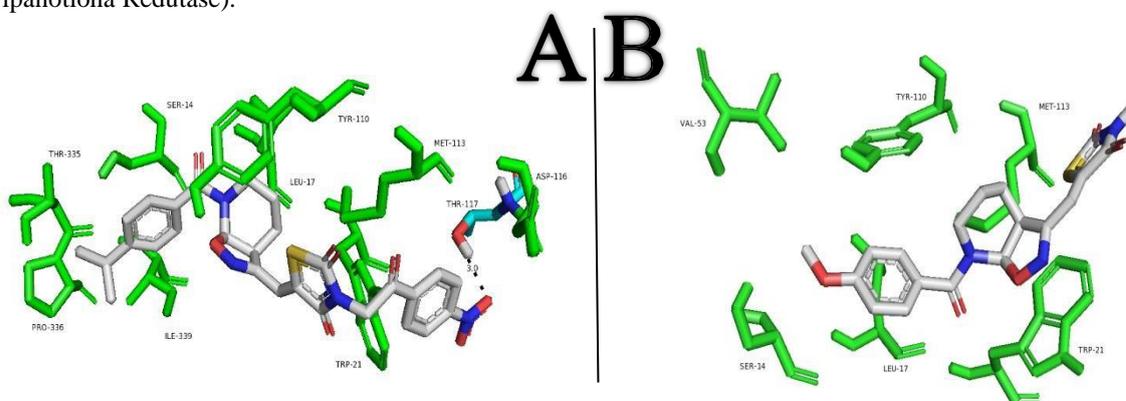
Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio.

Os resíduos de LEU17, TRP21, TYR110 e MET113 interagem hidrofobicamente com quase, se não todos os ligantes analisados. Os resíduos de SER14, TR117 e GLY49, são os únicos capazes de estabelecer ligações de hidrogênio com os compostos.

Na configuração R, o ligante 3G interagiu hidrofobicamente com o alvo pelo contato com 9 diferentes resíduos de aminoácido e uma ligação de hidrogênio com o resíduo de THR117 a uma distância de 3.0Å (entre o átomo doador e o aceptor). O ligante 3M interagiu com o alvo através do contato hidrofóbico com 6 diferentes resíduos de aminoácido. Um maior número de contatos hidrofóbicos e a capacidade de formar uma ligação de hidrogênio garantiram ao ligante 3G uma maior estabilidade do complexo ligante-alvo formado.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 44 abaixo:

Figura 44 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3G (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Tripanotona Redutase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

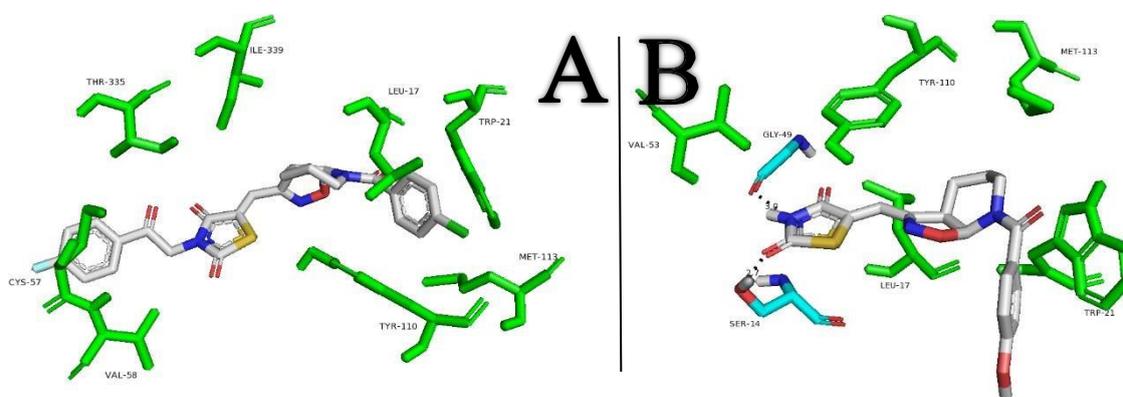
Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde e ligação de hidrogênio em cyan

Na configuração S, o ligante 3D interagiu com o sítio de ligação da enzima através de contato hidrofóbico com 6 diferentes resíduos de aminoácido. O ligante 3M interagiu com o alvo através do contato hidrofóbico com 5 resíduos de aminoácido, além de formar duas ligações de hidrogênio com os resíduos de SER14 e GLY49, a uma distância de 2.7Å e 3.0Å (entre o átomo doador e o aceptor). Apesar do ligante 3M interagir de maneira significativa com o alvo, os contatos hidrofóbicos estabelecidos entre o ligante 3D e a enzima garantiram uma maior estabilidade ao complexo ligante-alvo final.

Esses compostos diferem estruturalmente pela presença do átomo de cloro ligado no substituinte R1 no composto 3D, o grupo T-butil no ligante 3G e o grupo metoxi no ligante 3M. No substituinte R2, o ligante 3D apresenta o grupo 1-(4-fluorfenil) etanona, o ligante 3G apresenta o grupo 1-(4-nitrofenil) etanona e o ligante 3M apresenta o átomo cloro nesta posição. O maior volume espacial, eletronegatividade e hidrofobicidade garantem aos ligantes 3D e 3G uma maior afinidade pelo sítio de ligação da enzima.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 45 abaixo:

Figura 45 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3D (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Tripanotona Redutase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde e ligação de hidrogênio em cian.

4.1.3.1.15 Arginase

O *docking* por homologia foi realizado para este alvo biológico utilizando-se a estrutura tridimensional da enzima na espécie de *L. Mexicana* para construir o modelo tridimensional da espécie de *L. infantum* atingindo uma identidade de 95,58%. Ao observar os valores de *score* obtidos entre os compostos testados frente à enzima Arginase (tabela 33), nota-se que de modo geral, os estereoisômeros R apresentaram maiores valores de *score* quando comparados aos estereoisômeros S, logo, uma maior afinidade pelo sítio de ligação da enzima.

Tabela 33 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a Arginase.

Moléculas	R	S
3A	31.58	33.09
3B	37.02	31.11
3C	64.70	74.16
3D	44.33	42.01
3E	29.22	30.75
3F	37.27	43.36
3G	34.18	37.33
3H	36.68	41.26
3I	58.39	57.64
3J	67.12	67.32
3K	67.34	66.33
3L	66.67	65.96
3M	31.24	30.45
3N	39.14	36.92
3O	78.45	34.03
3P	33.67	41.87
Miltefosina	41.05	

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Ao observar os valores de *score* obtidos percebe-se que o estereoisômero R atingiu o maior valor de *score* (78,45) com o ligante 3O e o menor valor de *score* com o ligante 3E (29.22). Na configuração S, o maior valor de *score* foi do ligante 3C (74.16) e o menor valor de *score* para esse estereoisômero foi o ligante 3M (30.45). As diferenças entre esses valores de *score* variam entre 49.23 e 43.71, nos estereoisômeros R e S, respectivamente e as principais razões intermoleculares que explicam essas diferenças podem ser vistas na tabela 34.

Tabela 34 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Arginase).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3O)	Pior (3E)	Melhor (3C)	Pior (3M)
VAL149		3.0		
GLY155	CH	CH	CH	
HIS139	Cat-pi		Cat-pi	PIT
ASP141	CH			
HIS154	CH	CH	CH	CH
ASP194		CH		
THR257	CH	CH	CH	CH
SER150		CH	3.0	CH
GLU196				
ASN152	3.0	CH	2.9	CH
GLN26		CH		
ALA192		CH		CH

THR148		2.8		
VAL259	CH			CH
PRO258	CH		CH	CH
HIS28	CH			
LEU293	CH			
<i>Score</i>	78,45	29.22	74.16	30.45

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. Cat- π significa interação cátion- π e PIT significa interação T-stacking.

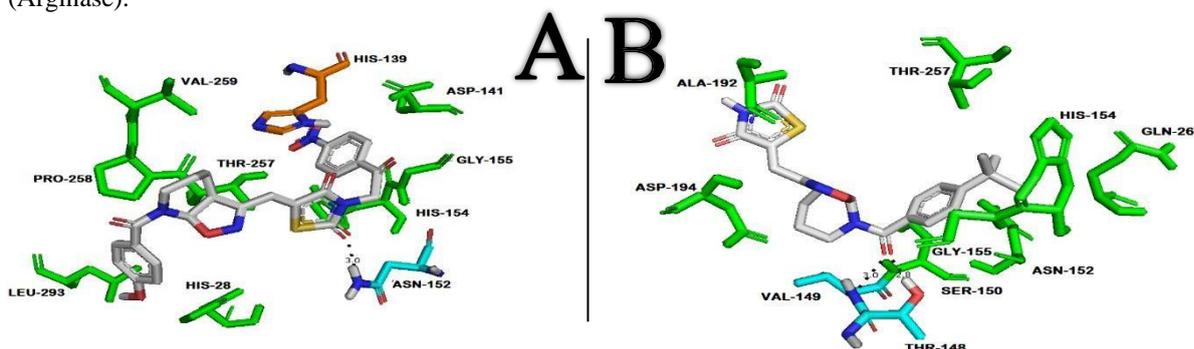
Os resíduos de GLY155, HIS139, HIS154, THR257 e ASN152 interagem hidrofobicamente com quase, se não todos os compostos analisados. Os resíduos de ASN152, VAL149, SER150, ASN152 e THR148 interagem com os compostos através de ligação de hidrogênio.

Na configuração R, o ligante 3O interagiu com o sítio de ligação da enzima através de contato hidrofóbico com 8 diferentes resíduos de aminoácido, uma interação do tipo cátion- π com o resíduo de HIS139 e uma ligação de hidrogênio com o resíduo de ASN152 a uma distância de 3.0Å (entre o átomo doador e o aceptor). Já o ligante 3E interagiu hidrofobicamente com 8 diferentes resíduos de aminoácido, além de estabelecer duas ligações de hidrogênio com os resíduos de VAL149 e THR148 a uma distância de 3.0Å e 2.8Å, respectivamente. Apesar do ligante 3E interagir com o sítio de ligação de maneira significativa, a interação estabelecida entre o ligante 3O e o alvo resultou em uma maior estabilidade *in silico* ao complexo final formado.

A diferença estrutural entre esses ligantes consiste na presença do grupo T-butil no substituinte R1 no ligante 3E e o grupo metoxi no ligante 3O. Já no substituinte R2, o ligante 3E apresenta o átomo de hidrogênio enquanto que o ligante 3O apresenta o grupo 1-(4-nitrofenil) etanona. A presença de substituintes mais hidrofóbicos e eletronegativos garantem ao ligante 3O características estruturais para obter uma maior afinidade *in silico* com o alvo.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 46 abaixo:

Figura 46 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3O (Lado A) e 3E (Lado B) e o alvo (Arginase).



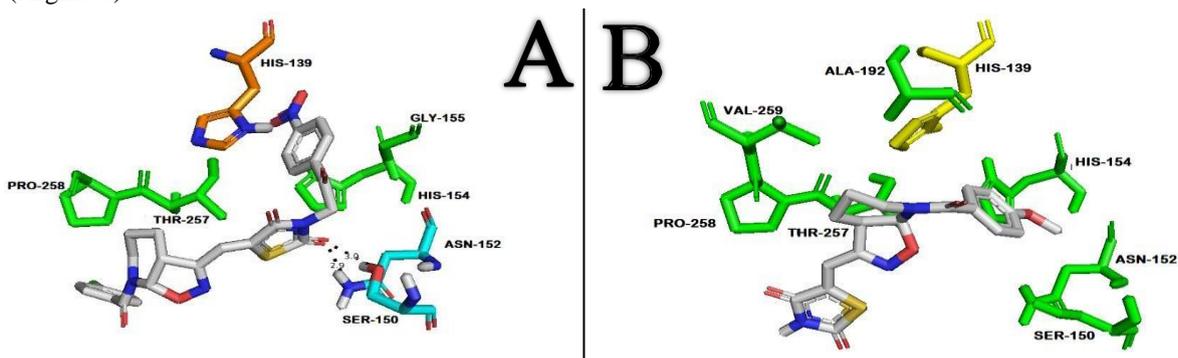
Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em ciano.

Na configuração S, o ligante 3C interage com o alvo através de contato hidrofóbico (com 6 diferentes resíduos de aminoácido), uma interação cátion- π com o resíduo de HIS139 e duas ligações de hidrogênio com os resíduos de SER150 e ASN152 a uma distância de 3.0Å e 2.9Å (entre o átomo doador e o aceptor), respectivamente. Já o ligante 3M interage com o alvo através do contato hidrofóbico com 7 diferentes resíduos de aminoácido, além de uma interação do tipo T-stacking com o resíduo de HIS139. A maior variedade de interações garante ao ligante 3C uma maior estabilidade *in silico* com o sítio de ligação da enzima.

A diferença estrutural entre esses compostos consiste na presença do átomo de cloro presente no substituinte R1 do ligante 3C, e o grupo metoxi no ligante 3M. Já no substituinte R2, o ligante 3C apresenta 1-(4-nitrofenil) etanona, enquanto que o ligante 3M apresenta o átomo de hidrogênio nessa posição. A maior eletronegatividade e volume presentes no ligante 3C garantem uma maior afinidade *in silico* pelo alvo. As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 47 abaixo:

Figura 47 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3C (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Arginase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo, interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cyan

4.1.3.2 *L. amazonensis*

4.1.3.2.1 Arginase

O *docking* por homologia foi realizado para este alvo biológico utilizando-se a estrutura tridimensional da enzima na espécie de *L. Mexicana* para construir o modelo tridimensional da espécie de *L. amazonensis* atingindo uma identidade de 99,37%. Ao observar os valores de *score* obtidos entre os compostos testados frente à enzima Arginase (tabela 35), nota-se que os ligantes na configuração S obtiveram maiores valores de *score*, ou seja, uma maior afinidade *in silico* pelo alvo.

Tabela 35 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Arginase.

Moléculas	R	S
3A	41.36	35.27
3B	41.13	42.94
3C	40.40	43.59
3D	37.63	45.29
3E	34.24	40.17
3F	39.04	52.14
3G	34.83	42.98
3H	41.29	46.64
3I	37.51	38.57
3J	37.06	44.43
3K	38.35	43.13
3L	34.66	44.18
3M	41.72	38.49
3N	39.63	43.44
3O	43.75	43.90
3P	36.83	44.33
<u>Miltefosina</u>		<u>52.31</u>

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

O maior valor de *score* da série foi do ligante 3F (52.14), na configuração S e o valor de *score* mais baixo, nesta mesma configuração, foi do ligante 3A (35.27). Na configuração R,

o maior valor de *score* foi do ligante 3O (43.75), já o ligante 3E apresentou o valor mais baixo (34.24). As diferenças entre esses valores de *score* variam entre 9.51 e 16.87, nos estereoisômeros R e S, respectivamente e as principais razões intermoleculares que explicam essas diferenças podem ser vistas na tabela 36.

Tabela 36 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Arginase).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3O)	Pior (3E)	Melhor (3F)	Pior (3A)
VAL259			CH	
HIS139	PIT	Cat-pi	PIT	Cat-pi
THR257	CH			
PRO258			CH	
SER150	3.0			
GLY155		CH	CH	CH
ASN152	CH		CH	
HIS154	CH	CH	CH	CH
VAL149		CH		
ALA192	CH		CH	CH
LEU293			CH	
ASP194		CH		CH
ARG191	CH			
THR148	2.7			
ASP141				CH
<i>Score</i>	43.75	34.24	52.14	35.27

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

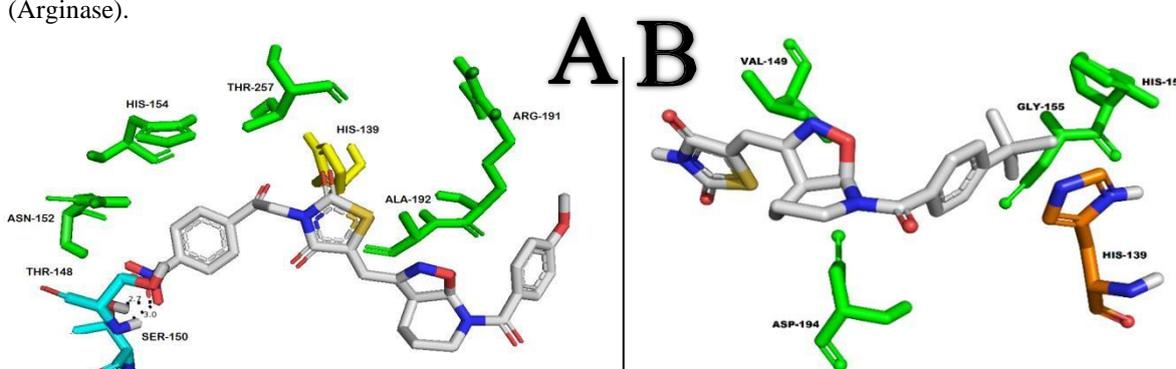
Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. Cat-pi significa interação cátion- π e PIT significa interação T-stacking.

Os resíduos de HIS139, GLY155, HIS154 e ALA192 interagem hidrofobicamente com quase, se não todos os ligantes analisados na série. Os resíduos de SER150 e THR148 interagem com o ligante 3O através de ligação de hidrogênio. Além disso, o resíduo de HIS139 é o único capaz de interagir com os ligantes através da ligação T-stacking e Cátion- π .

Na configuração R, o ligante 3O interage hidrofobicamente com 5 diferentes resíduos de aminoácido, interage com o resíduo de HIS139 através da interação T-stacking e forma 2 ligações de hidrogênio com os resíduos de SER150 e THR148 a uma distância de 3.0Å e 2.7Å (entre o átomo doador e o aceptor), respectivamente. Já o ligante 3E interage com o sítio de ligação da enzima através de 4 contatos hidrofóbicos e estabelece uma interação Cátion- π com o resíduo de HIS139. Um maior número de interações hidrofóbicas e a formação de 2 ligações de hidrogênio entre o ligante 3O e o alvo garante uma maior estabilidade *in silico* ao complexo ligante-alvo formado.

Esses compostos diferem estruturalmente na presença do grupo T-butil ligado ao substituinte R1 no ligante 3E e grupo metoxi no ligante 3O. Já no substituinte R2, o ligante 3E possui átomo de hidrogênio, enquanto que o ligante 3O possui o grupo 1-(4-nitrofenil) etanona. As características estruturais presentes no ligante 3O, como grupos mais volumosos e eletronegativos, garante uma maior afinidade pelo sítio de ligação da enzima. As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo pode ser visualizada na figura 48 abaixo:

Figura 48 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3O (Lado A) e 3E (Lado B) e o alvo (Arginase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

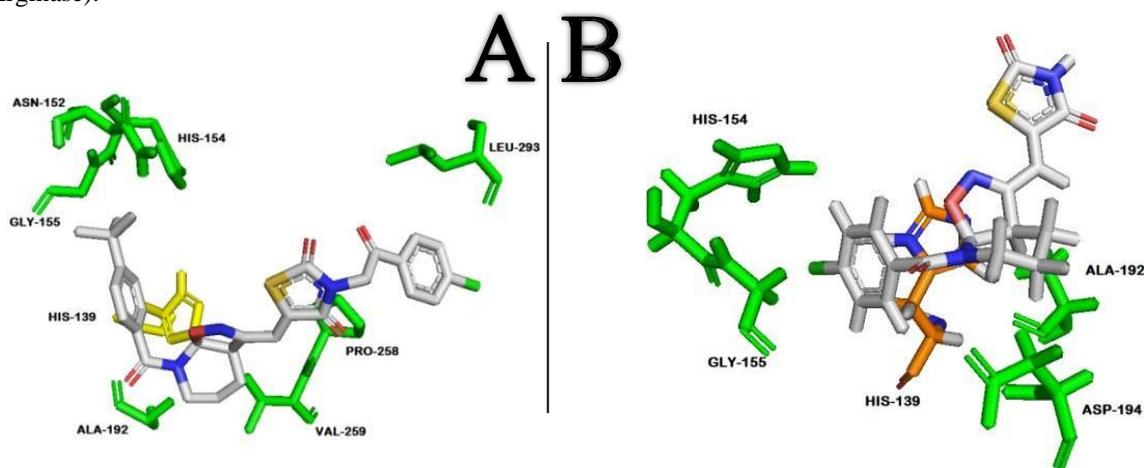
Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo, interação cátion- π em laranja e ligação de hidrogênio em cyan

Na configuração S, o ligante 3F interage com o alvo através de contatos hidrofóbicos com 7 diferentes resíduos de aminoácido e uma interação do tipo T-stacking com o resíduo de HIS139. Já o ligante 3A interage com o sítio de ligação da enzima através de contato hidrofóbico com 5 diferentes resíduos de aminoácido e uma interação cátion- π com o resíduo de HIS139. O maior número de contatos hidrofóbicos formados entre o ligante 3F e o alvo garante uma maior estabilidade *in silico* do complexo ligante-alvo formado.

Esses compostos diferem estruturalmente na presença do átomo de cloro ligado ao substituinte R1 no ligante 3A e a presença do grupo T-butil nessa no ligante 3F. Já no substituinte R2, o ligante 3A apresenta um átomo de hidrogênio enquanto que o ligante 3F apresente o grupo 1-(4-clorofenil) etanona. Por possuir substituintes mais hidrofóbicos, volumosos e eletronegativos, o ligante 3O possui uma maior afinidade *in silico* com o sítio de ligação da enzima.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo pode ser visualizada na figura 49 abaixo:

Figura 49 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3O (Lado A) e 3L (Lado B) e o alvo (Arginase).



Fonte:Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo e interação cátion- π em laranja

4.1.3.2.2 Dihidroorotato desidrogenase

O *docking* por homologia foi realizado para este alvo biológico utilizando-se a estrutura tridimensional da enzima na espécie de *L. donovani* para construir o modelo tridimensional da espécie de *L. amazonensis* atingindo uma identidade de 93,93%. Ao observar os valores de *score* obtidos entre os compostos testados frente à enzima dihidroorotato desidrogenase (tabela 37), nota-se o estereoisômero R apresentou maiores valores de *score* na maior parte dos ligantes analisados.

Tabela 37 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Dihidroorotato desidrogenase.

<u>Moléculas</u>	<u>R</u>	<u>S</u>
3A	52.18	57.86
3B	70.92	64.80
3C	69.85	70.09
3D	72.61	66.39
3E	59.77	51.31
3F	65.77	71.76
3G	66.08	72.01
3H	65.99	72.17
3I	55.58	51.28
3J	77.58	72.64

3K	76.04	60.14
3L	77.79	75.28
3M	59.26	55.79
3N	73.99	69.61
3O	70.17	67.98
3P	69.37	65.50
<u>Miltefosina</u>	<u>62.34</u>	

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

O maior valor de *score* da série foi do ligante 3L, em ambas as configurações espaciais, atingindo um valor de 77.79 e 75.28, nas configurações R e S, respectivamente. O ligante que apresentou o menor valor de *score*, na configuração R, foi o ligante 3A (52.18) e na configuração S, o menor valor de *score* foi do ligante 3I (51.28). As diferenças entre esses valores de *score* variam entre 25.61 e 24, nos estereoisômeros R e S, respectivamente e as principais razões intermoleculares que explicam essas diferenças podem ser vistas na tabela 38.

Tabela 38 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Dihidroorotato desidrogenase).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3L)	Pior (3A)	Melhor (3L)	Pior (3I)
VAL22	CH	CH	CH	CH
SER196	CH			2.5 E 3.1
ASN68	CH	2.8		CH
GLY21	CH	CH		
VAL22	CH			
GLY222	CH			
TYR59	PIT		CH	
MET70	CH	CH	CH	
ARG58	CH		CH	
THR273	3.0	3.1 E 2.8	CH	CH
GLY223	3.0			CH
GLY250				CH
ILE226		CH		
THR56				
GLY272			CH	2.9
PRO57				
ALA19		CH		CH
LYS44		CH		
GLN276				
ALA20				
SER45				
LEU72				2.7
ASN128				
CYS131				
VAL271				CH
ASN195			CH	
LYS165			2.8	
<i>Score</i>	77.79	52.18	75.28	51.28

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

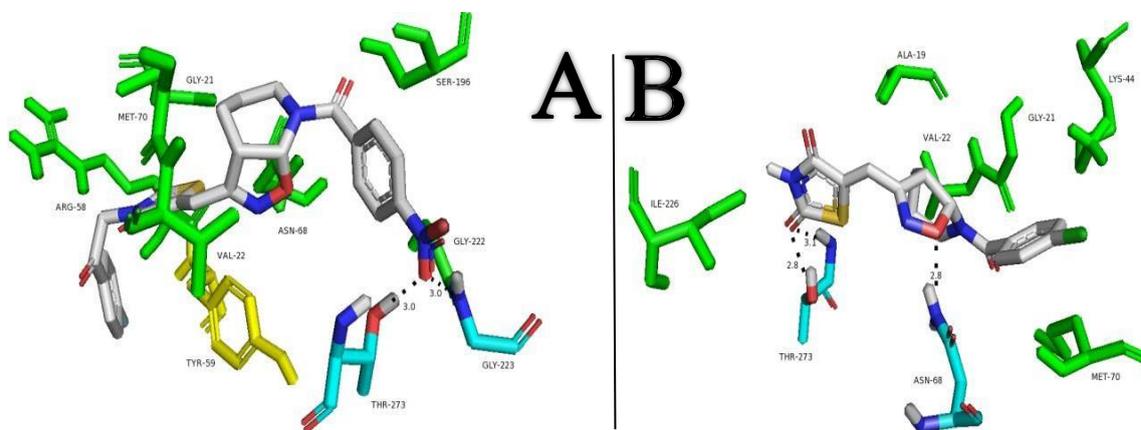
Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. PIT significa interação T-stacking.

Os resíduos de VAL22 e MET70 interagiram hidrofobicamente com quase, se não todos os ligantes analisados. Os resíduos de SER196, ASN68, THR273, GLY223, GLY272, LEU72 e LYS165 interagiram com os ligantes através de ligação de hidrogênio.

Na configuração R, o ligante 3L interagiu com o sítio de ligação da enzima através de contato hidrofóbico com 8 diferentes resíduos de aminoácido, uma interação T-stacking com o resíduo de TYR59 e estabeleceu 2 ligações de hidrogênio com os resíduos de THE273 e GLY223, ambos a uma distância de 3.0Å (entre o átomo doador e o aceptor). Já o ligante 3A interagiu com o alvo através de contato hidrofóbico (com 6 diferentes resíduos de aminoácido) e três ligações de hidrogênio com os resíduos de ASN67 (2.8Å) e THR273 (3.1Å e 2.8Å). Apesar do ligante 3A de interagir com o alvo de maneira significativa, o maior número de interações realizados entre o ligante 3L e o alvo garantiram uma maior estabilidade do complexo ligante-alvo formado.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 50 abaixo:

Figura 50 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3L (Lado A) e 3A (Lado B) e o alvo (Dihidroorotato desidrogenase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

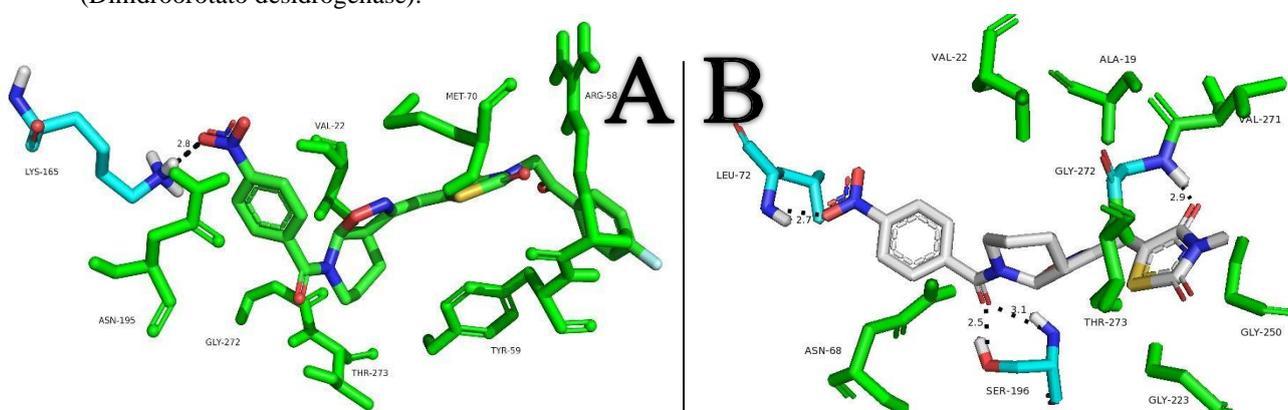
Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo e ligação de hidrogênio em cyan.

Na configuração S, o ligante 3L interage hidrofobicamente com 7 diferentes resíduos de aminoácido e estabelece uma ligação de hidrogênio com o resíduo de LYS165 a uma distância de 2.8Å. O ligante 3I interage com 7 resíduos de aminoácido por contato hidrofóbico e forma 4 ligações de hidrogênio com os resíduos de SER196 (2.5Å e 3.1Å), GLY272 (2.9Å) e LEU72 (2.7Å). Apesar do ligante 3I formar um número maior de ligações de hidrogênio com o alvo, a posição e conformação de interação entre o ligante 3L e o alvo garante uma maior estabilidade *in silico* do complexo ligante-alvo formado.

Esses compostos diferem estruturalmente na presença do átomo de cloro, substituído no R1 no ligante 3A e o grupo nitro nessa mesma posição para os ligantes 3I e 3L. Já no substituinte R2, o ligante 3L possui o grupo 1-(4-fluorfenil) etanona enquanto que o ligante 3^a e 3I possui um átomo de hidrogênio nesta posição. Um maior volume e eletronegatividade garantem ao ligante 3L uma maior afinidade *in silico* pelo sítio de ligação da enzima

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 51 abaixo:

Figura 51 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Dihidroorotato desidrogenase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo e ligação de hidrogênio em cyan

4.1.3.2.3 Pteridina Redutase 1 (PTR1)

O *docking* por homologia foi realizado para este alvo biológico utilizando-se a estrutura tridimensional da enzima na espécie de *L. major* para construir o modelo tridimensional da espécie de *L. amazonensis* atingindo uma identidade de 91,64%. Ao observar os valores de *score* obtidos entre os compostos testados frente à enzima PTR1 (tabela 39), nota-se que 50% dos ligantes obtiveram maior valor de *score* na configuração R e os outros 50% na configuração S.

Tabela 39 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Pteridina Redutase 1 (PTR1).

Moléculas	R	S
3A	62.63	61.13
3B	90.01	81.91
3C	93.22	81.80
3D	85.48	86.60
3E	64.58	73.39
3F	81.93	85.07
3G	89.54	87.65
3H	84.82	88.12
3I	65.47	66.23
3J	83.25	81.13
3K	86.21	78.50
3L	85.35	82.15
3M	61.70	64.45
3N	85.96	77.76
3O	80.94	82.80
3P	75.27	82.01
Miltefosina	72.02	

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

O maior valor de *score* atingido na série foi do ligante 3C (93.22) na configuração R e o menor valor de *score* nesse estereoisômero foi do ligante 3M (61.70). Já no estereoisômero S, o maior valor de *score* foi atingido pelo ligante 3H (88.12) já o ligante 3A obteve o menor valor de *score*, atingindo 61.13. A diferença entre esses valores de *score* varia entre 31.52 e 26.99, nos estereoisômeros R e S, respectivamente e as principais razões intermoleculares que explicam essas diferenças podem ser vistas na tabela 40.

Tabela 40 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Pteridina Redutase 1).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3C)	Pior (3M)	Melhor (3H)	Pior (3A)
ASP180	CH	CH	CH	
LEU225	CH	CH	CH	CH
TYR282	2.9			
LEU187	CH	CH	CH	CH
MET182	CH		CH	CH
PHE113	PI	PIT	CH	
ARG17	Cat-pi e 2.8			3.1 E 3.1
LEU18	CH	CH	CH	CH
GLY19	2.7			

ASN109	3.1	CH		3.1
TYR240			3.0	
SER226		2.9		
MET232		CH	CH	
LEU228		CH		
PRO186				
ASP231				
TYR114				
PRO223		CH	CH	CH
TYR190			CH	CH
MET178			CH	CH
TYR193				3.1
<i>Score</i>	93.22	61.70	88.12	61.13

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. Cat- π significa interação cátion- π e PIT significa interação T-stacking.

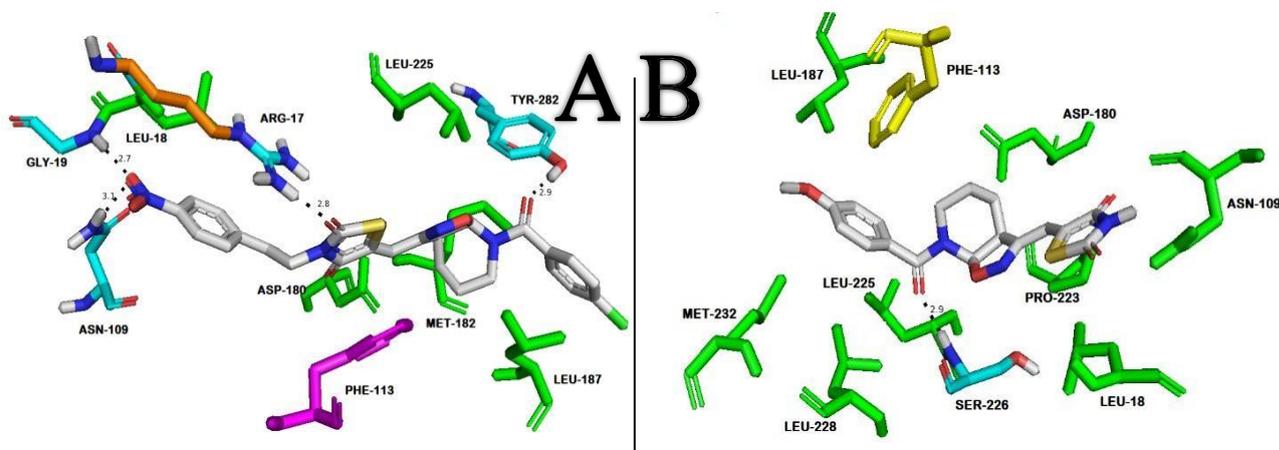
Os resíduos de ASP180, LEU225, LEU187, MET182, LEU18 e PRO223 interagiram hidrofobicamente com quase, se não todos os ligantes analisados. Além desses, o resíduo de PHE113 foi o único capaz de estabelecer interações do tipo PI-stacking e T-stacking com os ligantes. Os resíduos de TYR282, ARG17, GLY19, ASN109, SER226 e TYR193 interagiram com os ligantes através de ligação de hidrogênio.

Na configuração R, o ligante 3C interagiu hidrofobicamente com 5 diferentes resíduos de aminoácido, estabeleceu uma interação do tipo PI-stacking com o resíduo de PHE113 e uma interação cátion- π com o resíduo de ARG17. Além dessas interações, esse ligante formou 4 diferentes ligações de hidrogênio com os resíduos de TYR282, ARG17, GLY19 e ASN109 a uma distância de 2.9Å, 2.8Å, 2.7Å e 3.1Å (entre o átomo doador e o aceptor). Já o ligante 3M interagiu por contato hidrofóbico com 8 diferentes resíduos de aminoácido, além de estabelecer uma interação T-stacking com os resíduos de PHE113 e uma ligação de hidrogênio com o resíduo de SER226 a uma distância de 2.9Å. Apesar do ligante 3M interagir com o alvo através de mais contatos hidrofóbicos, a formação de 4 ligações de hidrogênio entre o ligante 3C e o alvo, somadas as outras interações, garantem a este ligante uma maior estabilidade *in silico* com a enzima analisada.

Esses compostos diferem estruturalmente na presença do átomo de cloro no substituinte R1 no ligante 3C, e o grupo metoxi nessa posição no ligante 3M. Já no substituinte R2, o ligante 3C possui o grupo 1-(4-nitrofenil) etanona enquanto que o ligante 3M possui o átomo de hidrogênio nessa posição. O maior volume espacial e eletronegatividade garantem ao ligante 3C uma maior afinidade *in silico* pela enzima.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 52 abaixo:

Figura 52 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3C (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Pteridina Redutase 1).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

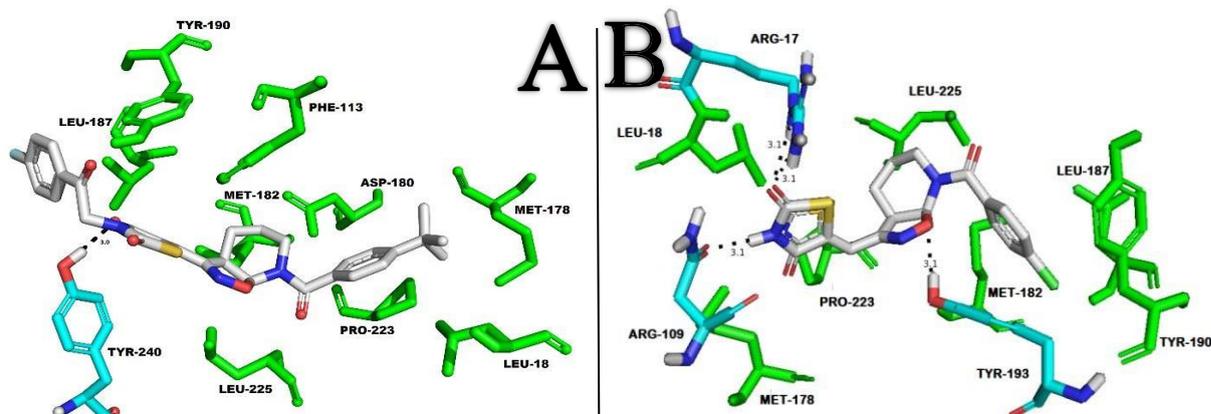
Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação T-stacking em amarelo, interação PI-stacking em rosa, interação cátion-pi em laranja e ligação de hidrogênio em cyan

Na configuração S, o ligante 3H interagiu com o alvo através de contatos hidrofóbicos com 10 diferentes resíduos de aminoácido além de formar uma ligação de hidrogênio com o resíduo de TYR240 a uma distância de 3.0Å (entre o átomo doador e o aceptor). Já o ligante 3A interagiu hidrofobicamente com 7 diferentes resíduos de aminoácido e estabeleceu 4 ligações de hidrogênio, sendo 2 delas com o resíduo de ARG17, ambas a uma distância de 3.1Å (entre o átomo doador e o aceptor), e as outras com os resíduos de ASN109 e TYR193 ambas a uma distância de 3.1Å. Apesar do alto número de ligações de hidrogênio formadas entre o ligante 3A e o alvo, o maior número de contatos hidrofóbicos formados entre o ligante 3H e o sítio de ligação da enzima garantem uma maior estabilidade *in silico*.

As diferenças estruturais entre esses compostos se baseiam na presença do átomo de cloro no substituinte R1 no ligante 3A, enquanto que essa posição é ocupada pelo grupo T-butil no ligante 3G. Já no substituinte R2, o ligante 3A apresenta o átomo de hidrogênio, já o ligante 3G apresenta o grupo 1-(4-nitrofenil) etanona. Novamente, um maior volume, hidrofobicidade e eletronegatividade garantem ao ligante 3G uma maior afinidade *in silico* com o alvo.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 53 abaixo:

Figura 53 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3A (Lado B) e o alvo (Pteridina Redutase 1).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde e ligação de hidrogênio em cyan.

4.1.3.2.4 *Tripanotiona Redutase*

O *docking* por homologia foi realizado para este alvo biológico utilizando-se a estrutura tridimensional da enzima na espécie de *L. infantum* para construir o modelo tridimensional da espécie de *L. amazonensis* atingindo uma identidade de 95,32%. Ao observar os valores de *score* obtidos entre os compostos analisados e a enzima tripanotiona redutase (tabela 41), nota-se que os compostos no estereoisômero R apresentaram valores de *score* superiores.

Tabela 41 – Valores de *score* (ChemPLP) para as principais soluções de *docking* dos compostos em seus estereoisômeros para a enzima Tripanotiona Redutase.

<u>Moléculas</u>	<u>R</u>	<u>S</u>
3A	73.81	65.61
3B	88.58	70.59
3C	70.37	70.59
3D	88.75	71.85
3E	70.34	65.26
3F	70.58	67.59
3G	76.33	68.47
3H	89.57	69.89
3I	62.63	66.89
3J	73.34	68.59
3K	76.16	71.89
3L	79.80	76.98

3M	68.05	60.12
3N	86.83	72.22
3O	80.75	71.34
3P	76.83	73.88
<u>Miltefosina</u>	<u>73.49</u>	

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

O maior valor de *score* da série foi do ligante 3H, na configuração R, chegando a 87.57 e o menor valor de *score* dessa configuração foi do ligante 3I (62.63). Já para os compostos na configuração S, o maior valor de *score* foi atingido pelo ligante 3L (76.98) e o menor valor de *score* foi do ligante 3M (60.12), sendo assim o menor valor de *score* da série. As diferenças entre esses valores de *score* variam entre 24.94 e 16.86, nos estereoisômeros R e S, respectivamente e as principais razões intermoleculares que explicam essas diferenças podem ser vistas na tabela 42.

Tabela 42 – Mapeamento das principais interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo (Tripanotona Redutase).

Resíduos	R		S	
	Melhor (3H)	Pior (3I)	Melhor (3L)	Pior (3M)
TRP21	PI	PI	PI	CH
LEU17	CH	CH	CH	CH
TYR110	CH			CH
MET113	CH		CH	CH
SER14	CH	2.7	CH	
ILE339	CH	CH	CH	
VAL53	CH		CH	
THR335	CH		2.6	
CYS52	CH			
SER112	CH			
ASP116	CH			
GLU18		CH	CH	CH
PHE114				CH
LEU120				CH
<i>Score</i>	89.57	62.63	76.98	60.12

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: CH significa contato hidrofóbico, a numeração diz respeito à distância (Å) entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio. PI significa interação PI-stacking.

O resíduo de LEU17, MET113, SER14, ILE339, GLU18 e TRP21 interagiram hidrofobicamente com quase, se não todos os ligantes analisados, sendo esse último o único capaz de interagir com os compostos através da interação PI-stacking. Os resíduos de MET113 e VAL53 foram os únicos capazes de estabelecer ligação de hidrogênio com os compostos.

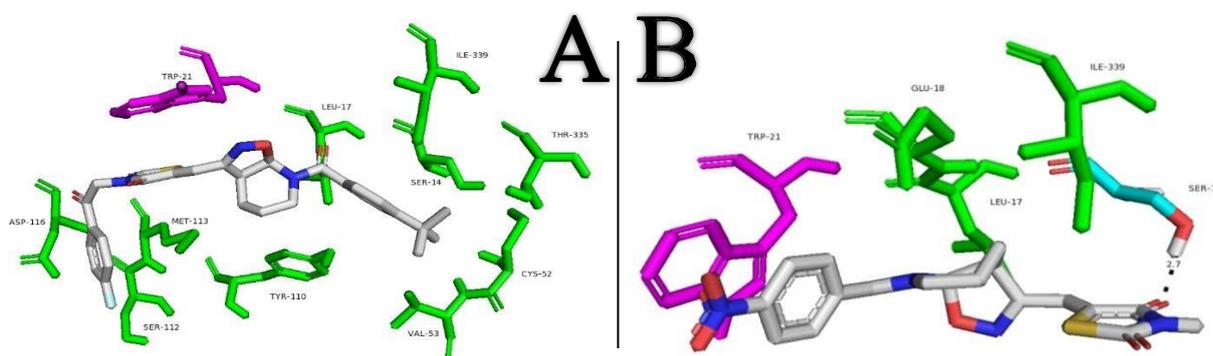
Na configuração R, o ligante 3H interagiu com o sítio de ligação da enzima através do contato hidrofóbico com 10 diferentes resíduos de aminoácido e uma interação do tipo PI-stacking com o resíduo de TRP21. Já o ligante 3I interagiu com o alvo por contato hidrofóbico

(com 4 diferentes resíduos de aminoácido), uma interação do tipo PI-stacking com o resíduo de TRP21 e estabeleceu uma ligação de hidrogênio com o resíduo de SER14 a uma distância de 2.7Å (entre o átomo doador e o aceptor). O maior número de contatos hidrofóbicos realizados entre o ligante 3H e o alvo, garantiram uma maior estabilidade *in silico* do complexo ligante-alvo formado.

As diferenças estruturais entre esses ligantes consistem na presença do grupo T-butil no substituinte R1 no ligante 3H, enquanto que o ligante 3I possui o grupo nitro nesta posição. Já no substituinte R2, o ligante 3H possui o grupo 1-(4-fluorfenil) etanona, já o ligante 3I apresenta o átomo de hidrogênio. A presença de grupamentos mais hidrofóbicos, eletronegativos e volumosos garante ao ligante 3H uma maior afinidade *in silico* pelo alvo.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 54 abaixo:

Figura 54 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3H (Lado A) e 3I (Lado B) e o alvo (Tripanotona Redutase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

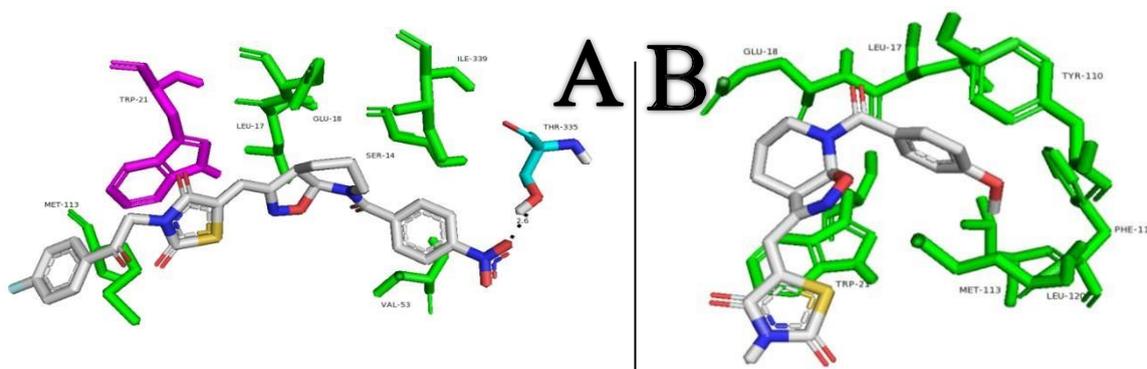
Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação PI-stacking em rosa e ligação de hidrogênio em cyan.

Na configuração S, o ligante 3L interagiu com o alvo através de contato hidrofóbico (com 6 diferentes resíduos de aminoácido), uma interação do tipo PI-stacking com o resíduo de TRP21 e uma ligação de hidrogênio realizada com o resíduo de THR335 a uma distância de 2.6Å (entre o átomo doador e o aceptor). Já o ligante 3M interagiu com o alvo através de contato hidrofóbico com 7 diferentes resíduos de aminoácido. A maior variação de interação realizadas entre o ligante 3L e o alvo garante a formação de um complexo ligante-alvo de mais estabilidade.

Esses ligantes diferem estruturalmente pela presença do grupo nitro no substituinte R1 no ligante 3L, enquanto que o ligante 3M apresenta o grupo metoxi nesta posição. No substituinte R2, o ligante 3L apresenta o grupo 1-(4-fluorfenil) etanona, já o ligante 3M apresenta o átomo de hidrogênio. Novamente, a presença de grupamentos mais eletronegativos e volumosos garante ao ligante 3L uma maior afinidade *in silico* pela enzima analisada.

As diferenças estruturais e o modo de ligação desses compostos com o alvo podem ser visualizadas na figura 55 abaixo:

Figura 55 – Detalhamento das interações intermoleculares entre os ligantes 3L (Lado A) e 3M (Lado B) e o alvo (Tripanotona Redutase).



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Os contatos hidrofóbicos são mostrados em verde, interação PI-stacking em rosa e ligação de hidrogênio em cyan.

4.1.4 Análise Modelo de QSAR através de Análise de correlação canônica

A aplicação do método estatístico de correlação canônica, para obtenção do modelo de QSAR, partiu da utilização de 3 variáveis ditas como dependentes, sendo elas a pIC50 para as espécies de *L. amazonensis* e *L. infantum*, e DL50 em células de macrófago e 3 variáveis independentes, formadas pelos seguintes descritores químicos: LogP, energia do orbital molecular não ocupado mais baixo (LUMO) e número de aceitadores da ligação de hidrogênio. A tabela 43 abaixo resume as principais informações utilizadas e os principais elementos para a análise canônica.

Tabela 43 – Correlação canônica de resposta biológica ou variável dependente (pIC_{50} *L. amazonensis*, pIC_{50} *L. infantum* DL₅₀ Macrófagos) com descritores químicos ou variável independente (LogP, LUMO e aceitadores de ligação de Hidrogênio).

Variáveis da pesquisa	
Resposta biológica	Descritores químicos
<ul style="list-style-type: none"> • pIC_{50} <i>L. amazonensis</i> • pIC_{50} <i>L. infantum</i> • DL₅₀ Macrófagos 	<ul style="list-style-type: none"> • LogP • LUMO • Aceitadores de ligação de Hidrogênio

Elementos de análise canônica

Composição de variáveis dependentes	Correlação canônica	Composição de variáveis independentes
Variável estatística canônica dependente	R_c	Variável estatística canônica independente

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

A análise de correlação canônica foi restrita à determinação de três funções canônicas porque o conjunto de variáveis dependentes contém três variáveis. A tabela 44 resume os principais resultados de significância estatística e a apresentação dos resultados dos testes multivariados das funções (lambda de Wilks, o critério de Pillai, o traço de Hotelling e o gcr de Roy).

Tabela 44 – Análise de correlação canônica.

Medidas de ajuste geral do modelo para análise de correlação canônica				
Função canônica	Correlação canônica	R ² canônico	Estatística F	Probabilidade
1	0,948177	0,899040	4,61	0,0012
2	0,304162	0,092515	0,34	0,8497
3	0,147620	0,021792	0,27	0,6145
Testes multivariados de significância				
Estatística	Valor	Estatística F aproximada	Probabilidade	
Lambda de Wilks	0,08962342	4,61	0,0012	
Traço de Pillai	1,01334622	2,04	0,0629	
Traço de Hotelling	9,02910674	9,50	0,0002	
gcr de Roy	8,90488322	35,62	<,0001	

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Nota-se que a primeira função canônica obteve um R² canônico (semelhante ao R² em uma função linear) de 0,89, considerado alto em modelos de QSAR e uma probabilidade de 0,0012. Outra análise importante é o valor do teste de lambda de Wilks, que significa o quão correlacionados são os dois conjuntos de dados, onde quanto mais próximo de zero maior esta correlação, este teste atingiu um valor de 0,089 para a função 1 demonstrando uma alta correlação entre as variáveis dependentes e independentes.

Salt e colaboradores (2004), em seu trabalho que buscou obter modelos de QSAR para prever a afinidade e seletividade de derivados arylpiperazinyl para adrenoceptores α_1 e α_2 (ARs), encontraram um R^2 de 0,73 e foi considerado um modelo satisfatório. Ospino e colaboradores (2005), obtiveram um R^2 de 0,816 em seu modelo de QSAR para predição do tempo de meia-vida de bifenilos policlorados em humanos, também considerado satisfatório de com alto poder de predição. O R^2 canônico desse estudo foi superior a estes dois exemplos encontrados na literatura.

Cálculou-se então o índice de redundância para as variáveis estatísticas independente e dependente da primeira função canônica e foi feita a Análise desses índices (tabelas 45 e 46). O índice de redundância encontrado foi de 0,4514 para as variáveis dependentes e 0,5628 para as variáveis independentes. Esse baixo valor encontrado deve-se a variância compartilhada (tabela 46) relativamente baixa na variável estatística dependente (0,5021) e independente (0,6260) e não do R^2 canônico. As funções canônicas 2 e 3 não foram consideradas por apresentarem um baixo valor de R^2 canônico (0,0925 e 0,0218, respectivamente).

Tabela 45 – Cálculo dos índices de redundância para a primeira função canônica.

Variável estatística/variáveis	Carga canônica	Carga canônica quadrada	Carga canônica quadrada média	R^2 Canônico	Índice de redundância
Variáveis Dependentes					
pIC_{50} <i>L. amazonensis</i>	0,9659	0,93296281			
pIC_{50} <i>L. infantum</i>	0,5233	0,27384289			
DL_{50} Macrófagos	-0,5472	0,29942784	0,502078	0,899040	0,451388
Variáveis independentes					
LogP	0,9793	0,959028			
Aceitadores de ligação de Hidrogênio	-0,5716	0,326727			
LUMO	0,7696	0,592284	0,626013	0,899040	0,562811

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Tabela 46 – Análise de redundância de variáveis estatísticas dependentes e independentes para ambas as funções canônicas

Variância padronizada das variáveis dependentes explicada					
Função canônica	Por sua própria variável estatística canônica (variância compartilhada)			Pela variável estatística canônica oposta (redundância)	
	Proporção	Proporção cumulativo	R^2 canônico	Proporção	Proporção cumulativo
1	0,5021	0,5021	0,8990	0,4514	0,4514
2	0,2642	0,7663	0,0925	0,0244	0,4758
3	0,2337	1,000	0,0218	0,0051	0,4809

Variância padronizada das variáveis independentes explicada					
Função canônica	Por sua própria variável estatística canônica (variância compartilhada)			Pela variável estatística canônica oposta (redundância)	
	Proporção	Proporção cumulativo	R ² canônico	Proporção	Proporção cumulativo
1	0,6260	0,6260	0,8990	0,5628	0,5628
2	0,2983	0,9244	0,0925	0,0276	0,5904
3	0,0756	1,000	0,0218	0,0016	0,5921

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

A tabela 47 resume os pesos canônicos padronizados encontrados para a função 1 das variáveis independentes e dependentes. A magnitude dos pesos representa sua contribuição relativa para com a variável estatística, baseado nisso, nota-se que a ordem de contribuição para a variável dependente na função 1 é pIC₅₀ *L. amazonensis*, DL₅₀ Macrófagos e pIC₅₀ *L. infantum*, já para a variável independente a ordem de contribuição na primeira variável estatística é LogP, Aceitadores de ligação de hidrogênio e energia do orbital LUMO. A função 2 segue essa mesma tendência, porém a função 3 possui sua própria ordem de contribuição e isso pode ser explicado pela alta variação dos pesos canônicos em casos de multicolinearidade.

Tabela 47 – Pesos canônicos para as funções canônicas.

	Pesos canônicos		
	Função 1	Função 2	Função 3
Coeficientes canônicos padronizados para as variáveis dependentes			
pIC ₅₀ <i>L. amazonensis</i>	0,9244	0,5664	-0,6973
pIC ₅₀ <i>L. infantum</i>	-0,0729	0,0216	1,2397
DL ₅₀ Macrófagos	-0,2655	1,0203	-0,0453
Coeficientes canônicos padronizados para as variáveis independentes			
LogP	0,8995	0,8073	-0,7241
Aceitadores de ligação de Hidrogênio	-0,2280	0,8014	1,2554
LUMO	-0,0145	-0,4320	1,8538

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

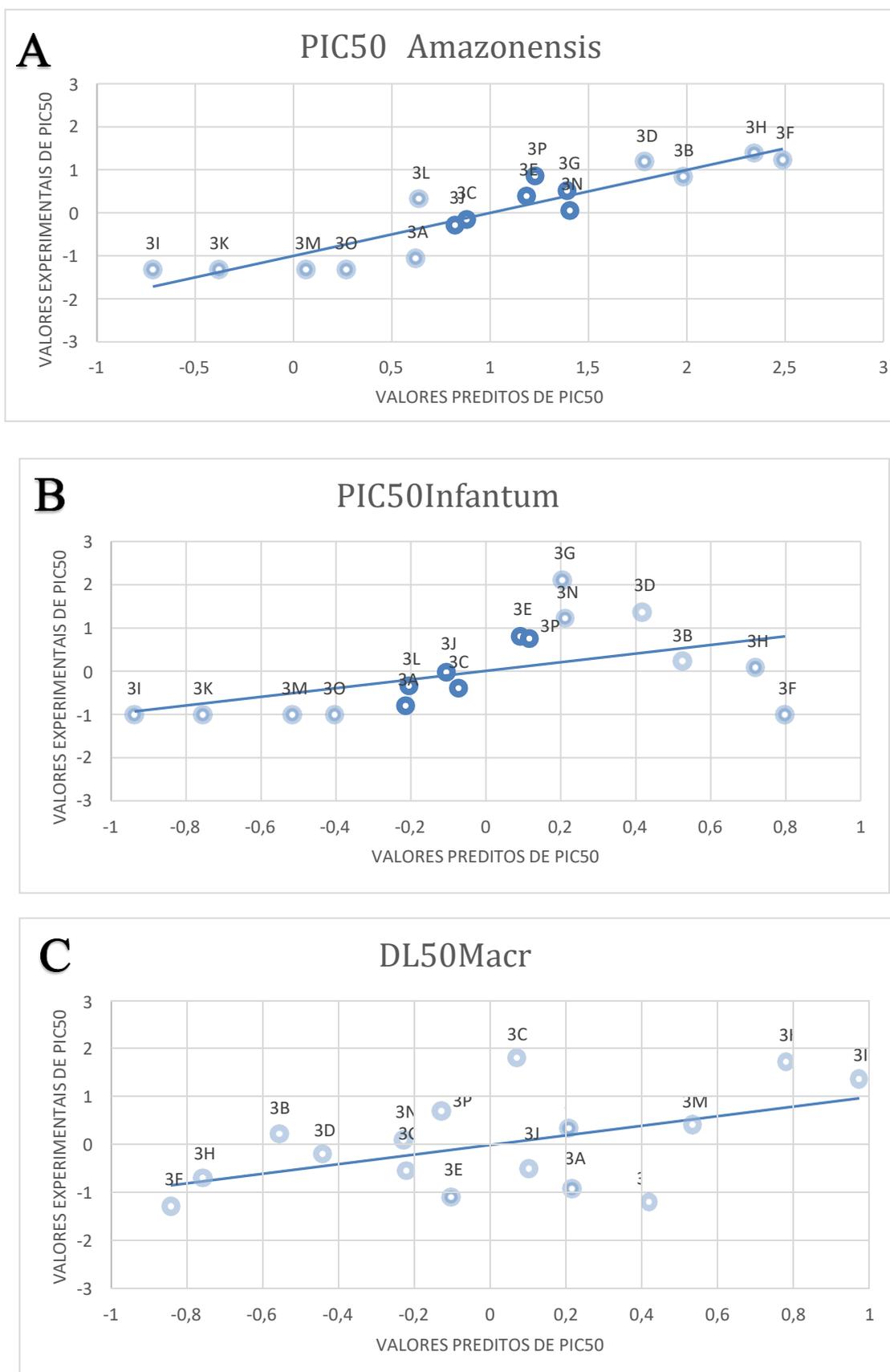
O par para a primeira função das variáveis canônica gerou o seguinte modelo:

$$Y1 = 0,9244pIC_{50} \text{ Amaz} - 0,0729pIC_{50} \text{ Infa} - 0,2655DL_{50} \text{ Macr}$$

$$X1 = 0,8995LogP - 0,2280 \text{ Aceitador} - 0,0145LUMO$$

A combinação desse modelo é capaz de gerar gráficos entre a atividade biológica observada (valores experimentais) e atividade biológica predita (valores preditos a partir da aplicação do modelo) de cada variável dependente (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Gráfico de correlação dos valores de atividade biológica prevista e experimentais para os 16 novos derivados sintéticos híbridos.



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Legenda: Gráfico A) Representa os valores previstos e observados da variável de pIC₅₀ de *L. amazonensis*.

Gráfico B) Representa os valores previstos e observados da variável de pIC₅₀ de *L. infantum*. Gráfico C)

Representa os valores previstos e observados da variável de DL₅₀ em células de macrófago.

A tabela 48 contém as cargas canônicas e cargas canônicas cruzadas. Quanto mais alta a carga canônica maior é a importância dessa variável dentro do grupo, nota-se então que no grupo das variáveis dependentes (função 1) a variável de pIC₅₀ em *L. amazonensis* é a que possui maior importância dentro de seu grupo, já para o grupo das variáveis independentes o LogP é o que possui maior importância. Como falado anteriormente, a correlação canônica busca maximizar os objetivos preditivos através das suas variáveis estatísticas, logo, supõe-se que a variável de pIC₅₀ em *L. amazonensis* é a que é principalmente prevista pelo conjunto de variáveis estatísticas independentes, sendo o LogP a variável que mais influência nessa predição.

Tabela 48 – Estrutura canônica

	Cargas canônicas		
	Função 1	Função 2	Função 3
Correlações entre as variáveis dependentes e suas variáveis estatísticas canônicas			
pIC ₅₀ <i>L. amazonensis</i>	0,9659	0,2536	0,0524
pIC ₅₀ <i>L. infantum</i>	0,5233	0,1732	0,8344
DL ₅₀ Macrófagos	-0,5472	0,8357	-0,0467
Correlações entre as variáveis independentes e suas variáveis estatísticas canônicas			
LogP	0,9793	0,1953	0,0532
Aceitadores de ligação de Hidrogênio	-0,5716	0,8001	0,1820
LUMO	0,7696	-0,4655	0,4370
	Cargas canônicas Cruzadas		
	Função 1	Função 2	Função 3
Correlações entre as variáveis dependentes e variáveis estatísticas canônicas independentes			
pIC ₅₀ <i>L. amazonensis</i>	0,9158	0,0771	0,0077
pIC ₅₀ <i>L. infantum</i>	0,4961	0,0527	0,1232
DL ₅₀ Macrófagos	-0,5189	0,2542	-0,0069
Correlações entre as variáveis independentes e variáveis estatísticas canônicas dependentes			
LogP	0,9285	0,0595	0,0079
Aceitadores de ligação de Hidrogênio	-0,5420	0,2434	0,0269
LUMO	0,7297	-0,1416	0,0645

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

A lipofilicidade é uma das características físico-químicas mais importantes a ser levada em consideração no design de novas drogas antiparasitárias, pois garante que a droga vai interagir com os lipídeos da membrana citoplasmática, permitindo assim sua penetração no citoplasma e sua ação no metabolismo do parasita (DEL OLMO et al., 2002; BASSELIN; ROBERT-GERO, 1997). Luque-ortega e colaboradores (2010) sintetizaram uma série de sais de benzofeno e demonstraram que a presença de substituintes mais lipofílicos contribuíram para o aumento da atividade leishmanicida. Maciel-rezende e colaboradores (2013) sintetizaram e avaliaram a atividade biológica contra *L. amazonensis* de uma série de novos derivados sintéticos de benzofenonas, ficando evidenciado que o aumento da lipofilicidade resultou em um aumento da potência leishmanicida. Esses resultados corroboram com os achados do modelo de QSAR obtido.

Uma outra forma de analisar os dados é a observação dos ‘canonical cross-loadings’ ou cargas canônicas cruzadas, onde é possível observar a correlação de cada uma das variáveis com o índice do grupo oposto, ou seja, as variáveis dependentes são correlacionadas com o índice independente e vice-versa. Para a função 1, a variável dependente de maior correlação com o grupo de variáveis independentes é a $pIC_{50} L. amazonensis$ (0,9158), elevando-se esse termo ao quadrado descobrimos o percentual da variância dessa variável explicada pela função 1. Os resultados mostram que 83,87% da variância do valor de $pIC_{50} L. amazonensis$ pode ser explicada pela função 1. Olhando para as cargas cruzadas das variáveis independentes, percebe-se que a variável de LogP (0,9285) é a que mais se correlaciona com as variáveis dependentes. Aproximadamente 86,21% da variância do valor de LogP é explicada pelas variáveis dependentes.

Observando-se agora os sinais das cargas, percebe-se que as variáveis dependentes de $pIC_{50} L. amazonensis$ e $pIC_{50} L. infantum$ possuem uma relação positiva, ou seja, direta, já a variável de DL_{50} em macrófagos possui uma relação indireta. Já para as variáveis independentes nota-se que as variáveis de LogP e energia do orbital LUMO possuem relação positiva, enquanto que a variável de aceitadores de ligação de hidrogênio possui uma relação negativa, ou seja, indireta. A ordem de contribuição seguida pelos pesos canônicos se mantém a mesma se tratando das cargas canônicas cruzadas para as variáveis dependentes. No caso das variáveis independentes, a ordem de contribuição é LogP, energia no orbital LUMO e aceitadores de ligação de hidrogênio.

Desta maneira, seguindo a predição do modelo de QSAR obtido, um aumento tanto da lipofilicidade (LogP) quanto da energia no orbital LUMO, e uma redução do número de aceitadores de ligação de hidrogênio resultaria em um aumento nos valores de $pIC_{50} L.$

amazonensis e pIC_{50} *L. infantum*. Porém, essas alterações também contribuiriam para uma redução do valor da DL_{50} em macrófagos, ou seja, aumento da citotoxicidade, sendo necessárias então alterações estruturais para que houvesse uma potencialização da atividade leishmanicida sem causar a toxicidade em células do hospedeiro.

Por fim, foi realizada a validação das análises de correlação canônica, retirando-se as variáveis independentes de LUMO e Aceitador de Ligações de Hidrogênio (LH). A tabela 49 apresenta o resultado de tal análise de sensibilidade, na qual as cargas canônicas são examinadas quanto a estabilidade quando variáveis individuais independentes são eliminadas da análise. Percebe-se a estabilidade das cargas canônicas com a retirada de uma das variáveis independentes, havendo uma baixa variação. Os valores de correlação canônica (R) e raiz canônica (R^2) também não sofreram grandes alterações. Demonstrando-se assim a estabilidade do modelo obtido.

Tabela 49 – Análise de sensibilidade dos resultados de correlação canônica consequentes da remoção de uma variável independente.

	Variável estatística completa	Resultado após eliminação de	
		LUMO	Aceitador LH
Correlação canônica (R)	0,948177	0,948150	0,937788
Raiz canônica (R^2)	0,899040	0,898989	0,879446
VARIÁVEIS ESTATÍSTICAS DEPENDENTES			
<i>Cargas canônicas</i>			
pIC_{50} <i>L. amazonensis</i>	0,9659	0,9658	0,9735
pIC_{50} <i>L. infantum</i>	0,5233	0,5241	0,5441
DL_{50} Macrófagos	-0,5472	-0,5478	-0,5244
Variância compartilhada	0,5021	0,5025	0,5062
Redundância	0,4514	0,4517	0,4452
VARIÁVEIS ESTATÍSTICAS INDEPENDENTES			
<i>Cargas canônicas</i>			
LogP	0,9793	0,9157	0,9915
Aceitadores de ligação de Hidrogênio	-0,5716	-0,5717	Omitido
LUMO	0,7696	Omitido	0,7748
Variância compartilhada	0,6260	0,6430	0,7917
Redundância	0,5628	0,5780	0,6963

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

4.2 ESTUDOS *IN VITRO*

4.2.1 Atividade citotóxica

Para verificar a citotoxicidade dos novos derivados híbridos frente a macrófagos, foram utilizadas células da linhagem RAW 264.7. A tabela 50 exibe os principais resultados desse ensaio, e percebe-se que a citotoxicidade frente a esse tipo de célula imune variou de 32,91 μ M (Ligante 3F) a 232,96 μ M (Ligante 3I).

Tabela 50 – Atividade citotóxica (CC₅₀ μ M) dos compostos frente a macrófagos (Raw 264.7).

Compostos	CC ₅₀ (μ M)
3A	76,18
3B	114,45
3C	189,02
3D	92,13
3E	60,39
3F	32,91
3G	69,01
3H	64,52
3I	232,96
3J	75,25
3K	183,73
3L	121,89
3M	172,89
3N	108,91
3O	37,78
3P	144,15
Miltefosina	68,55

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Os ensaios de citotoxicidade constituem uma fase importante no processo de desenvolvimento de novos fármacos, pois são capazes de antecipar os riscos inerentes a esses compostos reduzindo assim a probabilidade de um novo fármaco promissor causar risco a saúde do paciente (HORNBERG et al., 2014; DORATO; BUCKLEY, 2006; CUNNINGHAM, 2000).

A maioria dos compostos testados apresentaram menos toxicidade que a miltefosina, droga de referência que apresentou CC₅₀ de 68,55 μ M. A exceção a isso foram os compostos 3E (60,39), 3F (32,91 μ M), 3H (64,52 μ M) e 3O (37,78 μ M). O composto que apresentou a menor toxicidade foi o ligante 3I (232,96 μ M), chegando a ser mais de três vezes menos tóxico que a droga de referência. Os resultados obtidos com a ferramenta online Pro-Tox II de imunotoxicidade corroboram com os resultados obtidos experimentalmente, onde o método *in*

silico previu a atoxicidade dos compostos 3A, 3B, 3I e 3K (todos com CC₅₀ maior que 76,18µM) e imunotoxicidade do composto 3O (37,78 µM).

4.2.2 Atividade leishmanicida

Os compostos foram testados frente às formas evolutivas amastigota (intracelular) e promastigota (extracelular) das espécies de *L. infantum* e *L. amazonensis*, visando avaliar a sua atividade leishmanicida.

4.2.2.1 *L. infantum*

Para a forma evolutiva amastigota os compostos testados não apresentaram atividade. Já para a forma evolutiva de promastigota os ligantes 3D, 3G e 3N apresentaram um IC₅₀ menor que a droga de referência (tabela 51).

Tabela 51 – Atividade leishmanicida (IC₅₀ em µM) dos compostos frente as formas evolutivas amastigota e promastigota de *L. infantum*.

Compostos	Amastigota	Promastigota
	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)
3A	>510,43	414,21
3B	96,60	100,24
3C	120,57	189,02
3D	111,30	30,93
3E	140,75	71,61
3F	>353,31	>353,31
3G	>346,85	13,06
3H	>363,89	114,93
3I	>497,04	>497,04
3J	>360,39	128,48
3K	>353,66	>353,66
3L	>371,40	184,73

3M	>516,25	>516,25
3N	>370,38	35,13
3O	>363,28	>363,28
3P	>382,02	59,84
Miltefosina	1,72	38,20

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

O composto 3G foi o que obteve o menor valor de IC_{50} ($13,06\mu M$), esse valor chegou a ser quase três vezes menor que a droga de referência utilizada para os ensaios ($38,20\mu M$). Esse composto apresenta o grupo T-butil substituído no R1 e o grupo 1-(4-nitrofenil) etanona substituído no R2, características essas que aumentam seu caráter hidrofóbico. Compostos mais lipofílicos são capazes de penetrar na membrana dos parasitas mais facilmente, resultando numa maior concentração desses compostos no seu local de ação. Essa relação entre atividade leishmanicida e lipofilia já foi descrita na literatura por alguns autores (JORDA et al., 2011; MUSONDA et al., 2009; VALDERRAMA et al., 2005). Loiseau e colaboradores (2011) realizaram a síntese de quinolinas e estirilquinolinas e um dos derivados desta classe de compostos contendo um grupo 3-nitrofenilmetanona, substituinte semelhante ao presente no composto 3G, apresentou 10 vezes mais atividade que a miltefosina para *L. donovani*.

Visando avaliar a capacidade dos compostos de serem ativos contra o parasita sem causar danos as células do hospedeiro, o índice de seletividade (ISe) foi calculado. O ISe é obtido pela razão entre CC_{50} e IC_{50} , e quanto maior esta razão, mais seletiva é a droga para o parasita e, conseqüentemente, menor seu efeito sobre as células do hospedeiro. Quando a CC_{50} apresente um valor menor do que a IC_{50} , significa que o composto não possui seletividade para aquela forma evolutiva (NS). A tabela 52 resume os principais resultados.

Tabela 52 – Índices de seletividade (ISe) de novos compostos relativos às formas amastigota e promastigota de *L. infantum*. NS significa que não houve seletividade.

Compostos	Amastigota	Promastigota
3A	NS	NS
3B	1,18	1,14
3C	1,56	1,00
3D	NS	2,98
3E	NS	NS
3F	NS	NS
3G	NS	5,28
3H	NS	NS
3I	NS	NS

3J	NS	NS
3K	NS	NS
3L	NS	NS
3M	NS	NS
3N	NS	3,10
3O	NS	NS
3P	NS	2,40
Miltefosina	38,94	1,79

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

A partir da análise dos resultados nota-se que a maioria dos compostos não apresentaram seletividade para o parasita nas duas formas evolutivas. O composto 3G foi o que demonstrou maior capacidade de seletividade para a forma promastigota, chegando a ser aproximadamente 5 vezes maior que a droga de referência.

4.2.2.2 *L. amazonensis*

Frente a forma evolutiva amastigota os compostos não apresentaram atividade. Já para as formas promastigota os compostos 3B, 3D, 3F, 3H e 3P obtiveram valores de IC₅₀ que chegaram a ser duas vezes menores que a droga de referência (tabela 53).

Tabela 53 – Atividade leishmanicida (IC₅₀ em µM) dos compostos frente as formas evolutivas amastigota e promastigota de *L. infantum*.

Compostos	Amastigota	Promastigota
	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)
3A	>510,43	360,62
3B	>367,37	21,07
3C	>360,39	77,46
3D	>378,82	13,81
3E	>483,69	51,03
3F	>353,31	12,20
3G	>346,85	30,92
3H	>363,89	10,25
3I	>497,04	>497,04
3J	>360,39	92,13
3K	>353,66	>353,66

3L	>371,40	42,36
3M	>516,25	>516,25
3N	>60,48	60,48
3O	>363,28	>363,28
3P	>21,70	21,70
Miltefosina	7,07	26,94

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

O menor valor de IC₅₀ foi do composto 3H (10,25 µM), esse composto apresenta as mesmas características do composto 3G (ligante que obteve o menor valor de IC₅₀ frente a promastigota em *L. infantum*) em relação a lipofilia, corroborando ainda mais com a correlação existente entre atividade leishmanicida e lipofilia.

Novamente, visando avaliar a capacidade dos compostos de serem ativos contra o parasita sem causar danos as células do hospedeiro, o índice de seletividade (ISe) foi calculado (Tabela 54). A maioria dos compostos não apresentaram seletividade frente a forma evolutiva de amastigota.

Tabela 54 – Índices de seletividade (ISe) de novos compostos relativos às formas amastigota e promastigota de *L. amazonensis*. NS significa que não houve seletividade.

Compostos	Amastigota	Promastigota
3A	NS	NS
3B	NS	5,43
3C	NS	2,44
3D	NS	6,67
3E	NS	1,18
3F	NS	2,70
3G	NS	2,23
3H	NS	6,29
3I	NS	NS
3J	NS	NS
3K	NS	NS
3L	NS	2,88
3M	NS	NS
3N	>1,80	1,80
3O	NS	NS
3P	>6,64	6,64
Miltefosina	9,70	2,54

Fonte: Elaborado pela autora (2020)

Já para forma evolutiva de promastigota o índice de seletividade foi variado, sendo os compostos 3D, 3H e 3P os que obtiveram maiores valores, chegando a ser mais de três vezes maiores do que o valor da droga de referência e seis vezes mais seletivos para o parasita do que para as células de macrófago.

4.2.3 Atividade imunomoduladora

Após serem feitos os estímulos dos esplenócitos com a concentração de 10µg/mL dos compostos 3G e 3H foi feita a dosagem das citocinas IL-2, -4, -6, -10, -17, IFN-γ e TNF nos diferentes tempos de incubação (24 h, 48 h, 72 h e 96 h). Dentre as citocinas e tempos avaliados, foi observado que o composto 3H induziu uma diminuição significativa de IL-10 no tempo de 24h, em comparação ao sem tratamento (tabela 55). Por outro lado, com a incubação por 48h, tanto o composto 3G, como o 3H, foram capazes de aumentar significativamente a produção de IL-10. A Miltefosina, droga utilizada como composto de referência, não induziu significativamente a produção de IL-10. Esta é uma citocina imunoregulatória, logo a diminuição e posterior aumento da mesma reforça seu papel na homeostase celular (KOBAYASHI et al., 2012; BANZ et al., 2003; BOYMAN et al., 2007).

O aumento dos níveis de IL-10 está associado com a gravidade da progressão da leishmaniose visceral e com a progressão da lesão em pacientes com leishmaniose cutânea (KARP et al., 1993; KAYE; CURRY; BLACKWELL, 1991; GHALIB et al., 1993; LOUZIR et al., 1998; GAMA et al., 2013). Originalmente a IL-10 era descrita como uma citocina produzida por células T CD4⁺ no perfil Th2, porém estudos posteriores demonstraram que essa citocina é produzida também pelo perfil Th1 buscando limitar a inflamação exacerbada ocasionada pelas citocinas pró inflamatórias deste perfil. Porém, este tipo de controle limita também a eficiência da resposta imunológica do hospedeiro, auxiliando na redução de danos teciduais que podem ser gerados durante a resposta imune do hospedeiro. O ideal é a existência de uma resposta equilibrada entre o perfil Th1 x Th2. (TRINCHIERI, 2007; REIS et al., 2006).

Tabela 55 – Quantificação de IL-10 em sobrenadantes esplenócitos tratados por 24h e 48h com os compostos 3G e 3H.

IL-10	24h	48h
Sem tto	9,38	0,00
3G	9,38	14,72 *

3H	0,00 *	14,22 *
Miltefosina	5,73	6,19

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Legenda: Droga de referência (miltefosina) e controle sem tratamento (Sem tto).

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle, ANOVA teste de Dunnett. $p < 0.05$.

Os compostos também mostraram ação na produção de IL-6 (tabela 56). Ambos foram capazes de diminuir a produção dessa citocina, em comparação ao controle sem tratamento, no tempo de 24h. Após 48h de incubação, ambos os compostos também induziram a produção de IL-6, porém, apenas o 3G de modo significativo. A Miltefosina também foi capaz de reduzir significativamente a produção de IL-6 no tempo de 24h. Esta citocina está positivamente correlacionada com IL-10 (RAMOS et al., 2016). Logo, o perfil de indução dos compostos 3G e 3H foi semelhante para ambas as citocinas.

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina multifuncional envolvida em numerosos processos biológicos. Na leishmaniose essa citocina desempenha um papel anti e pró-inflamatório, além do envolvimento na diferenciação do perfil Th17 a partir de linfócitos T CD4⁺ *naïve* na presença também de TGF- β (KAUFMANN; KUCHROO, 2009; SOFI et al., 2009). Este perfil pode levar à exacerbação da leishmaniose ou à proteção contra a doença. Em um estudo de Kostka et al. (2009) camundongos BALB/c deficientes em IL-17, desenvolveram lesões menores (causadas por *L. major*) e com menos parasitos do que os do tipo selvagem. Por outro lado, PITTA et al (2009) demonstraram que a IL-17 tem um efeito protetor na leishmaniose visceral causada por *L. donovani*. Devido a correlação positiva com a IL-10, a indução desta citocina poderia auxiliar no contrabalanço entre os perfis Th1 x Th2.

Os tempos de incubação de 72 e 96h não causaram alterações no padrão de produção das citocinas avaliadas. As demais citocinas possíveis de serem quantificadas pelo método não obtiveram níveis de detecção significativa em nenhuma das amostras analisadas.

Tabela 56 – Quantificação de IL-6 em sobrenadantes esplenócitos tratados por 24h e 48h com os compostos 3G e 3H.

IL-6	24h	48h
Sem tto	14,41	0,00
3G	0,00 *	10,14 *
3H	0,00 *	5,95
Miltefosina	0,00	2,63

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Legenda: Droga de referência (miltefosina) e controle sem tratamento (Sem tto).

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle, ANOVA teste de Dunnett.
 $p < 0.05$.

5 CONCLUSÃO

Dezesseis novos derivados de isoxazolina/tiazolidina-2,4-diona híbridos de seis membros foram investigados como compostos leishmanicidas. As propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas destes compostos foram avaliadas através de metodologias *in silico* identificando que a solubilidade predita para esses ligantes variou de pouco solúvel a solúvel, apresentando valores de LogP entre 1,08 (Ligante 3I) e 4,59 (Ligante 3F), essas são características importantes de avaliação para o design de novos fármacos passíveis de administração via oral. O composto 3O foi classificado como imunotóxico segundo a ferramenta online PROTOX-II e esse resultado corrobora com o ensaio *in vitro* de citotoxicidade realizado frente a macrófagos, onde este composto apresentou uma CC_{50} de 37,78 μ M.

O estudo de *docking* molecular foi realizado para os ligantes, frente a quinze diferentes alvos de interesse biológico contra a leishmaniose. As análises de interações intermoleculares entre os alvos usados nos cálculos e as moléculas localizadas nos respectivos sítios de ligação, demonstraram que esses ligantes podem interagir com essas enzimas através de contato hidrofóbico, ligação de hidrogênio, interação PI-stacking, T-stacking e interação cátion- π .

Os compostos 3G e 3H foram os que obtiveram os maiores valores de *score* na maior parte dos alvos analisados, e esses resultados corroboram com os ensaios *in vitro* de atividade leishmanicida contra promastigota, onde o composto 3G apresentou um IC_{50} de 13,06 μ M frente a *L. infantum*, enquanto a molécula 3H apresentou um IC_{50} de 10,25 μ M frente a *L. amazonensis*, sendo estes valores inferiores (portanto, melhores) do que o IC_{50} do fármaco de referência utilizado (Miltefosina). Os substituintes R1 e R2 dos compostos 3G e 3H possuem características físico-químicas que aumentam o caráter lipofílico das moléculas. Este aspecto parece potencializar a atividade leishmanicida desses ligantes, conforme demonstrado no modelo QSAR obtido e corroborado na literatura.

Os ligantes 3G e 3H foram testados quanto a sua atividade imunomodulatória e foram observadas suas respectivas capacidades de indução da produção da IL-6 e IL-10. Estas são citocinas regulatórias essenciais para um controle do processo inflamatório decorrente da resposta imunológica do hospedeiro frente à *Leishmania*.

Por fim, os resultados permitem concluir que estas moléculas híbridas são prováveis protótipos para o desenvolvimento de compostos leishmanicidas. Mais investigações são

necessárias para apoiar a aplicabilidade de tais substâncias na produção de novos medicamentos mais eficazes e menos tóxicos para a população.

6 PERSPECTIVAS

- Analisar em macrófagos o efeito dos compostos sobre a produção de óxido nítrico;
- Identificar através de citometria de fluxo, possíveis alvos de ação dos compostos, nas diferentes formas evolutivas das espécies de *Leishmania*.

REFERÊNCIAS

- ABREU-SILVA, A. L. et al. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 68, n. 6, p. 661-665, jun. 2003.
- AGGARWAL, R.; BANSAL, A.; MITTAL, A. Synthesis and antimicrobial activity of 3-(2-thienyl)-4-aryloxy-5-hydroxy-5-trifluoromethyl- Δ^2 -isoxazolines and 3-(2-thienyl)-4-aryloxy-5-trifluoromethylisoxazoles. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 145, p. 95-101, jan. 2013.
- AGUIAR, D. C.; CAMÊLO, E. L. S.; SÁNCHEZ, R. G. Uma aplicação de correlação canônica não linear em dados de tuberculose. **RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 20, n. 2, p. 136-144, dez. 2018.
- AJMANI, S.; JADHAV, K.; KULKARNI, S. A. Group-based QSAR (G-QSAR): mitigating interpretation challenges in QSAR. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 28, n. 1, p. 36-51, jan. 2009.
- ALBRECHT, H. et al. Visceral leishmaniasis emerging as an important opportunistic infection in HIV-infected persons living in areas nonendemic for *Leishmania donovani*. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 120, n. 2, p. 189-198, jan. 1996.
- ALBUQUERQUE, M. G. et al. Multidimensional-QSAR: Beyond the third-dimension in drug design. In: TAFT, C. A.; SILVA, C. H. T. P. (Eds.). Current methods in medicinal chemistry and biological physics. **Kerala: Research signpost**, v. 1 p. 91-100 2007.
- ALI, J. et al. Revisiting the general solubility equation: in silico prediction of aqueous solubility incorporating the effect of topographical polar surface area. **Journal of chemical information and modeling**, v. 52, n. 2, p. 420-428, dez. 2012;
- ALVES, B. M. et al. Correlações canônicas entre caracteres agronômicos e nutricionais proteicos e energéticos em genótipos de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 2, p. 171-185, 2016.
- ALVING, C. R. Delivery of liposome-encapsulated drugs to macrophages. **Pharmacology & therapeutics**, v. 22, n. 3, p. 407-424, Nov. 1983.

AMATO, V. S., ANDRADE J. H. F., DUARTE, M. I. S. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 85, p. 39-49, Jan. 2003.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, Nova Iorque, v. 35, n. 7, p. 699-705, set. 2010.

ANDRICOPULO, A. D.; GUIDO, R. VC; OLIVA, G.. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 1, p. 37-46, ja. 2008.

ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L. B.; ABRAHAM, D. J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 9, n. 9, p. 771-790, jun. 2009.

ANVISA. Glucantime (antimoniato de meglumina). Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=991282015&pIdAnexo=2435258> Acesso em 07 de janeiro de 2020.

ARAKAKI, T. L. et al. Characterization of Trypanosoma brucei dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies. **Molecular microbiology**, v. 68, n. 1, p. 37-50, fev. 2008.

ASENSI, V. et al. Visceral leishmaniasis and other severe infections in an adult patient with p47-phox-deficient chronic granulomatous disease. **Infection**, v. 28, n. 3, p. 171-174, maio. 2000.

ASSIS, T. S. M. de et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 2, p. 107-116, jun. 2008.

AUNGST, B. J. Absorption enhancers: applications and advances. **The AAPS journal**, v. 14, n. 1, p. 10-18, mar. 2012.

BACELLAR, O., et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, Dec. 2002.

BAHRAMI, F.; HARANDI, A. M.; RAFATI, S. Biomarkers of cutaneous leishmaniasis.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 8, p. 222, jun. 2018.

BAIOCCO, P. et al. Trypanothione reductase from *Leishmania infantum*: cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray data analysis. **Protein and peptide letters**, v. 16, n. 2, p. 196-200, fev. 2009.

BALANÑA-FOUCE, R. et al. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 181, n. 2, p. 85-93, fev. 2012

BANDINELLI, M. G. et al. Correlação de caracteres de planta e tubérculo nas primeiras gerações de seleção de batata. **Horticultura Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 82-88, mar. 2017.

BANERJEE, P. et al. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic acids research*, v. 46, n. W1, p. W257-W263, jul. 2018.

BANZ, A. et al. A unique subpopulation of CD4+ regulatory T cells controls wasting disease, IL-10 secretion and T cell homeostasis. **European journal of immunology**, v. 33, n. 9, p. 2419-2428, ago. 2003.

BASANO, S. D. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico , epidemiologia e perspectivas de controle American cutaneous leishmaniasis. **Revista brasileira de epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, set. 2004.

BASSELIN, M.; ROBERT-GERO, M. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. **Parasitology research**, v. 84, n. 1, p. 78-83, nov. 1997.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, ago. 2007.

BELKAID, Y. et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502-507, dez. 2002.

BELO HORIZONTE (Estado). Secretaria municipal de saúde. Recomendações para o Manejo Clínico da Leishmaniose Tegumentar e Visceral. Belo Horizonte. 2007.

- BENDER, A. et al. Similarity searching of chemical databases using atom environment descriptors (MOLPRINT 2D): evaluation of performance. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 44, n. 5, p. 1708-1718, ago. 2004.
- BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, jan. 2000.
- BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic acids research**, v. 42, n. W1, p. W252-W258, abr. 2014.
- BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v.28, n.1, p.121-134, Jan., 1998.
- BOYMAN, O. et al. Cytokines and T-cell homeostasis. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 3, p. 320-326, jun. 2007.
- BOZDAĞ-DÜNDAR, O. et al. Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazolyl thiazolidine-2, 4-dione derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 18, p. 6012-6017, set. 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Editora do Ministério da Saúde, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Editora do Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. Bol Epidemiol [Internet]. 2019 set; p.1-154. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Acesso em: 09 de janeiro de 2020.

- BREMSER, W. HOSE—a novel substructure code. **Analytica Chimica Acta**, v. 103, n. 4, p. 355-365, dez. 1978.
- BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 32, n. 1, p. 335-373, jun. 2003.
- CÁCERES-DITTMAR, G. et al. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 91, n. 3, p. 500-505, mar. 1993.
- CAMACHO, A. et al. Properties of *Leishmania major* dUTP nucleotidohydrolase, a distinct nucleotide-hydrolysing enzyme in kinetoplastids. **Biochemical Journal**, v. 346, n. 1, p. 163-168, fev. 2000.
- CARTER, N. S. et al. Purine and pyrimidine metabolism in *Leishmania*. **In: Drug targets in kinetoplastid parasites**. Springer, New York, NY, p. 141-154, 2008.
- CASAÑOLA-MARTIN, G. M. et al. Bond-Based 2D Quadratic Fingerprints in QSAR Studies: Virtual and In vitro Tyrosinase Inhibitory Activity Elucidation. **Chemical biology & drug design**, v. 76, n. 6, p. 538-545, out. 2010.
- CAVAZZUTI, A. et al. Discovery of potent pteridine reductase inhibitors to guide antiparasite drug development. **PNAS**, v. 105, n. 5, p. 1448-1453, fev. 2008
- CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in *Leishmania*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 34, n. 1, p. 1-13, out. 2010.
- CHENG, T. et al. Computation of octanol– water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge. **Journal of chemical information and modeling**, v. 47, n. 6, p. 2140-2148, nov. 2007.
- CHERKASOV, A. et al. QSAR modeling: where have you been? Where are you going to?. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 12, p. 4977-5010, dez. 2014.
- CLEM, A. A current perspective on leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 124, abr. 2010.
- COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. **Amino acids**, v. 40, n. 2, p. 269-285, maio. 2011.

CONCEPCION, J. L.; CHATAING, B.; DUBOURDIEU, M. Purification and properties of phosphoglucose isomerases of *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, n. 2, p. 211-222, fev. 1999.

CORDEIRO, A. T. et al. Crystal structure of dihydroorotate dehydrogenase from *Leishmania major*. **Biochimie**, v. 94, n. 8, p. 1739-1748, ago. 2012.

CUNNINGHAM, M. J. Genomics and proteomics: the new millennium of drug discovery and development. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 44, n. 1, p. 291-300, ago. 2000.

DA SILVA, M. F. L. et al. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e34022, mar. 2012.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, p. 42717, mar. 2017.

DAVIES, C. R. et al. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cadernos de saude publica**, v. 16, n. 4, p. 925-950, dez. 2000.

DE CAMPOS R. L. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 35, n. 2, p. 103-116, out. 2006.

DE NEGRI, F. Novos caminhos para a inovação no Brasil. Washington, DC. Wilson Center 2018.

de OLIVEIRA GUERRA, J. A. et al. Clinical and diagnostic aspects of American tegumentary leishmaniasis in soldiers simultaneously exposed to the infection in the Amazon Region. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 587-90, set/out2003.

de OLIVEIRA P. I.; SACRAMENTO, I. V. S.; MARQUES, M. J. LEISHMANIOSES: “ESTADO DA ARTE. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 1, p. 220-238, jan/jul. 2011.

DE SOUZA, M. L. et al. Lipid Nanoparticles As A Skin Wound Healing Drug Delivery System: Discoveries And Advances. **Current Pharmaceutical Design**, out. 2020.

DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, ago. 2009.

DEL OLMO, E. et al. Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and amino-alcohols. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 12, n. 4, p. 659-662, fev. 2002.

DELANEY, J. S. ESOL: estimating aqueous solubility directly from molecular structure. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 44, n. 3, p. 1000-1005, mar. 2004;

DESMET, J. et al. The dead-end elimination theorem and its use in protein side-chain positioning. **Nature**, v. 356, n. 6369, p. 539, abr. 1992.

DEVINE, W. G. et al. From cells to mice to target: characterization of NEU-1053 (SB-443342) and its analogues for treatment of human African trypanosomiasis. **ACS infectious diseases**, v. 3, n. 3, p. 225-236, jan. 2017.

DEVINYAK, O. et al. Computational Search for Possible Mechanisms of 4-Thiazolidinones Anticancer Activity: The Power of Visualization. **Molecular informatics**, v. 33, n. 3, p. 216-229, mar. 2014.

DEY, A. et al. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. **Indian journal of medical microbiology**, v. 24, n. 3, p. 165, 2006.

DILLON, W. R.; GOLDSTEIN, M. Multivariate analysis methods and applications. 1984.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs. **Journal of health economics**, v. 47, p. 20-33, maio. 2016.

DNDi. Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas. Leishmanioses. Disponível em <<https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/>> Acessado em 06 de janeiro de 2020.

DORATO, M. A.; BUCKLEY, L. A. Toxicology in the drug discovery and development process. **Current protocols in pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 10.3. 1-10.3. 35, abr. 2006.

DORLO, T. PC et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, jul. 2012.

DUDEK, A. Z.; ARODZ, T.; GÁLVEZ, J. Computational methods in developing quantitative structure-activity relationships (QSAR): a review. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 9, n. 3, p. 213–228, mar. 2006.

DURANT, J. L. et al. Reoptimization of MDL keys for use in drug discovery. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 42, n. 6, p. 1273-1280, set. 2002.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A.. BINANA: a novel algorithm for ligand-binding characterization. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 6, p. 888-893, abr. 2011.

EDWARDS, P. A.; ERICSSON, J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. **Annual review of biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 157-185, jul. 1999.

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

EL KOUNI, M. H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. **Pharmacology & therapeutics**, v. 99, n. 3, p. 283-309, set. 2003.

EL-FEKY, S. A. Synthesis and anticonvulsant properties of some novel quinazolinone thiazolidine and 4-thiazolidone derivatives. **Die Pharmazie**, v. 48, n. 12, p. 894-896, nov. 1993.

FAIRLAMB, A. H. et al. Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science**, v. 227, n. 4693, p. 1485-1487, mar. 1985.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **Annual review of microbiology**, v. 46, n. 1, p. 695-729, out. 1992.

FAN, W. Q.; KATRITZKY, A. R. Comprehensive heterocyclic chemistry II. **Elsevier Science**, Oxford, v. 4, p. 1-126, 1996.

FDA. US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION et al. Challenges and Opportunities on the Critical Path to New Medical Products. Silver Spring: US Food and Drug Administration, 2004.

FERREIRA, M. M. C. et al. Variable Selection In Qsar [seleção De Variáveis Em Qsar]. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 439-448, fev. 2002.

FRICKER, S. P. et al. Metal compounds for the treatment of parasitic diseases. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 102, n. 10, p. 1839-1845, out. 2008.

FUJII, S. et al. Unique anti-myeloma activity by thiazolidine-2, 4-dione compounds with Pim inhibiting activity. **British journal of haematology**, v. 180, n. 2, p. 246-258, jan. 2018.

GAMA, M. E. et al. Severe visceral leishmaniasis in children: the relationship between cytokine patterns and clinical features. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.46, n. 6, p. 741-5, nov/dez. 2013.

GAONKAR, S. L.; RAI, K.M. L.; PRABHUSWAMY, B. Synthesis of novel 3-[5-ethyl-2-(2-phenoxy-ethyl)-pyridin]-5-substituted isoxazoline libraries via 1, 3-dipolar cycloaddition and evaluation of antimicrobial activities. **Medicinal Chemistry Research**, v. 15, n. 7-8, p. 407-417, maio. 2007.

GELDENHUYS, W. J. et al. Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 3, p. 127-132, fev. 2006.

GHALIB, H. W. et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 1, p. 324-329, jul. 1993.

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

GOMES-SILVA, A. et al. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clinical and Experimental Immunology**, Malden, v. 149, p. 440–444, jul. 2007.

GÓMEZ-PUYOU, A. et al. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action—studies with triosephosphate isomerase. **Chemistry & biology**, v. 2, n. 12, p. 847-855, dez. 1995.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, set. 2004.

GOODSELL, D. S. et al. RCSB Protein Data Bank: Enabling biomedical research and drug discovery. **Protein Science**, v. 29, n. 1, p. 52-65, set. 2020.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 21, p. 70- 83, jan. 2008

GUIDO, R. V. C. Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de Trypanosoma cruzi: biologia estrutural e química medicinal. 2008. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008. doi:10.11606/T.76.2008.tde-09062008-110714. Acesso em: 2020-08-20.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T.-D. Innate immunity against Leishmania infections. **Cellular Microbiology**, ago. 2015.

HABEEB, A. G.; PRAVEEN RAO, P. N.; KNAUS, E. E. Design and synthesis of 4, 5-diphenyl-4-isoxazolines: novel inhibitors of cyclooxygenase-2 with analgesic and antiinflammatory activity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 18, p. 2921-2927, ago. 2001.

HAIR, J. F. et al. Análise multivariada de dados.5 ed. Porto Alegre: Bookman editora, 2005.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1-23, mar. 2011

HALPERIN, I. et al. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 47, n. 4, p. 409-443, abr. 2002.

HAMMER, Ø. et al. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, maio. 2001.

HARDY, L. W. et al. Biochemical and genetic tests for inhibitors of Leishmaniapteridine pathways. **Experimental parasitology**, v. 87, n. 3, p. 158-170, nov. 1997.

HART, T. N.; READ, R. J. A multiple-start Monte Carlo docking method. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 13, n. 3, p. 206-222, jul. 1992.

HEHRE, W.; OHLINGER, S. Spartan'08 Tutorial and user's guide. Wavefunction Inc. ISBN978-1-890661-41-4, 2008.

HEINZEL, F. P. et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **The Journal of experimental medicine**, v. 169, n. 1, p. 59-72, jan. 1989.

HEMSWORTH, G. R. et al. The crystal structure of the Leishmania major deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase in complex with nucleotide analogues, dUMP, and deoxyuridine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 18, p. 16470-16481, maio. 2011.

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 25, n. 5, p. 363-370, dez. 2000.

HIDALGO-ZARCO, F.; GONZALEZ-PACNOWSKA, D. Trypanosomal dUTPases as potential targets for drug design. **Current Protein and Peptide Science**, v. 2, n. 4, p. 389-397, nov. 2001.

HIMMELRICH, H. et al. In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with Leishmania major is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 9, p. 4819-4825, maio. 2000.

HOLZMULLER, P., BRAS-GONÇALVES, R., LEMESRE, J. R. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in Leishmania. **Parasitology**, London, v. 132, p. S19-S32, out. 2006.

HORNBERG, J J. et al. Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part I: Why and how. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 8, p. 1131-1136, ago. 2014.

HORTON, D. A.; BOURNE, G. T.; SMYTHE, M. L. The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures. **Chemical reviews**, v. 103, n. 3, p. 893-930, fev. 2003.

HOWARD, J. G.; HALE, C.; CHAN-LIEW, W. L. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tvopica* in mice. **Parasite immunology**, v. 2, n. 4, p. 303-314, dez. 1980.

INIESTA, V.; GÓMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N ω -hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 6, p. 777-784, mar. 2001.

JACKSON, K.; YOUNG, D.; PANT, S. Drug–excipient interactions and their affect on absorption. **Pharmaceutical science & technology today**, v. 3, n. 10, p. 336-345, out. 2000.

JIMENEZ-MARCO, T. et al. Transfusion-transmitted leishmaniasis: a practical review. **Transfusion**, v. 56, p. S45-S51, mar. 2016.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727–48, 4 abr. 1997.

JORDA, R. et al. Anti-leishmanial activity of disubstituted purines and related pyrazolo [4, 3-d] pyrimidines. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 21, n. 14, p. 4233-4237, jul. 2011.

JUNQUEIRA-PEDRAS, M., et al. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 47, p. 477-485, Nov. 2003.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 1141-1147, jan. 2001.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical reviews in microbiology**, v. 21, n. 2, p. 123-152, set. 1995.

KARP, C. L. et al. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. **The Journal of clinical investigation**, v. 91, n. 4, p. 1644-1648, abr. 1993.

KAUFMANN, S. H; KUCHROO, V. K. Th17 cells. **Microbes and Infection**, Paris, v. 11, n. 5, p.579-83, 2009.

- KAYE, P. M.; CURRY, A. J.; BLACKWELL, J. M. Differential production of Th1-and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. **The Journal of immunology**, v. 146, n. 8, p. 2763-2770, abr. 1991.
- KHADKA, P. et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, v. 9, n. 6, p. 304-316, dez. 2014.
- KHAZIR, J. et al. Synthesis and anticancer activity of novel spiro-isoxazoline and spiro-isoxazolidine derivatives of α -santonin. **European journal of medicinal chemistry**, v. 63, p. 279-289, maio. 2013.
- KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 11, p. 935, nov. 2004.
- KNEGTEL, R. M.A; KUNTZ, I. D.; OSHIRO, C. M. Molecular docking to ensembles of protein structures. **Journal of molecular biology**, v. 266, n. 2, p. 424-440, fev. 1997.
- KOBAYASHI, T. et al. IL-10 regulates Il12b expression via histone deacetylation: implications for intestinal macrophage homeostasis. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 4, p. 1792-1799, ago. 2012.
- KORB, O. ST, T.; EXNER, T. E. PLANTS : Application of Ant Colony Optimization to Structure-Based Drug Design. **Lecture Notes in Computer Science**, v. 4150, p. 247-258, 2006.
- KOSTKA, S. L. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 3039-3046, mar. 2009.
- KOYAMA, H. et al. 5-Aryl thiazolidine-2, 4-diones as selective PPAR γ agonists. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 13, n. 10, p. 1801-1804, maio. 2003.
- KROTH, D. C.; NEDUZIAK, L. C. R. As relações entre despesas públicas e indicadores de saúde: uma análise de correlação canônica para os estados brasileiros. **Revista de Economia**, v. 41, n. 74, 2020.
- KUBINYI, H. QSAR and 3D QSAR in drug design Part 1: methodology. **Drug discovery today**, v. 2, n. 11, p. 457-467, nov. 1997.

KULKARNI, M. M. et al. Design of protease-resistant pexiganan enhances antileishmanial activity. *Parasitology Research*, v. 113, n. 5, p. 1971–1976, mar. 2014.

KUMAR, P. et al. Leishmania donovani pteridine reductase 1: biochemical properties and structure-modeling studies. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 73–79, set. 2008.

KUSHAWAHA, P. K. et al. Leishmania donovani triose phosphate isomerase: a potential vaccine target against visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45766, set. 2012.

KUZ'MIN, V. E.; ARTEMENKO, A. G.; MURATOV, E. N. Hierarchical QSAR technology based on the Simplex representation of molecular structure. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 22, n. 6-7, p. 403-421, fev. 2008.

LAGUNIN, A. A. et al. A new approach to QSAR modelling of acute toxicity. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 18, n. 3-4, p. 285-298, maio/jul. 2007.

LAMBERT, Z. V.; DURAND, R. M. Some precautions in using canonical analysis. **Journal of Marketing Research**, v. 12, n. 4, p. 468-475, nov. 1975.

LATTIN, J. M.; CARROLL, J. D.; GREEN, P. E. Analyzing multivariate data. **Dryden Press**, 1978.

LEACH, A. R. Ligand docking to proteins with discrete side-chain flexibility. **Journal of molecular biology**, v. 235, n. 1, p. 345-356, jan. 1994.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. 5ª edição. São Paulo, BR, Sarvier, 2011.

LEITE, F. H. A. et al. Structure-guided discovery of thiazolidine-2, 4-dione derivatives as a novel class of Leishmania major pteridine reductase 1 inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 123, p. 639-648, nov. 2016.

LEPAGE, F.; HUBLLOT, B.. Novel isoxazole and isoxazoline compounds with anticonvulsant activity process for their preparation and therapeutic composition containing them. U.S. Patent n. 5,059,614, out. 1991.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1770, n. 3, p. 467-477, mar. 2007.

LEPESHEVA, G.; R WATERMAN, M. Sterol 14 α -demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2060-2071, ago. 2011.

LESYK, R. et al. Anticancer thiopyrano [2, 3-d][1, 3] thiazol-2-ones with norbornane moiety. Synthesis, cytotoxicity, physico-chemical properties, and computational studies. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 15, p. 5230-5240, ago. 2006.

LEWIS, D. H. Infection of tissue culture cells of low phagocytic by *Leishmania mexicana mexicana*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 68, p. 327-336, jan. 1974.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**. v. 23, n. 1-3, p. 3-25, jan. 1997.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M.; BREWSTER, M. E. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 93, n. 5, p. 1091-1099, maio. 2004;

LOISEAU, P. M. et al. In vitro activities of new 2-substituted quinolines against *Leishmania donovani*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1777-1780, abr. 2011.

LOOKER, D. L.; BERENS, R. L.; MARR, J. J. Purine metabolism in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 9, n. 1, p. 15-28, set. 1983.

LOUZIR, H. et al. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 6, p. 1687-1695, jun. 1998.

LUQUE-ORTEGA, J. R. et al. New benzophenone-derived bisphosphonium salts as leishmanicidal leads targeting mitochondria through inhibition of respiratory complex II. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1788-1798, fev. 2010.

MACCARI, R. et al. Evaluation of in vitro aldose reductase inhibitory activity of 5-arylidene-2, 4-thiazolidinediones. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 14, p. 3886-3893, jul. 2007.

MACIEL-REZENDE, C. M. et al. Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonensis* of a series of alkyl-substituted benzophenones. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 11, p. 3114-3119, jun. 2013.

MAGER, P. P. et al. QSAR, diagnostic statistics and molecular modelling of 1, 4-dihydropyridine calcium antagonists: a difficult road ahead. **Drug design and discovery**, v. 8, n. 4, p. 273, jun. 1992.

MAJUMDAR, K. C. et al. Metal-mediated Heterocyclization: Synthesis of heterocyclic compounds containing more than one heteroatom through carbon-heteroatom bond forming reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 846-887, maio. 2010.

MALKI-FELDMAN, L.; JAFFE, C. L. *Leishmania major*: effect of protein kinase A and phosphodiesterase activity on infectivity and proliferation of promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 123, n. 1, p. 39-44, set. 2009.

MARIA, G. A. S. M.; DE LIMA, D. *Leishmaniose: Do Diagnostico Ao Tratamento*. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p. 2556-2569, 2013.

MARVIN 4.0.6. ChemAxon. Budapest, Hungary. <http://www.chemaxon.com>.

MCCALL, L. I. et al. Targeting ergosterol biosynthesis in *Leishmania donovani*: essentiality of sterol 14 α -demethylase. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3, p. e0003588, mar. 2015.

MCGEE, P. Modeling success with in silico tools. **Drug Discov Devel**, v. 8, p. 24-28, 2005.

Mendonça, M. G., et al. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, n. 6, p. 1018-1023, mar. 2004.

MENG, L. et al. Parallel synthesis of bis-heterocyclic isoxazolylmethyl- and isoxazolylmethylpyrazoles. **Journal of combinatorial chemistry**, v. 12, n. 1, p. 129-136, dez. 2009.

MOITA-NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, jul/ago. 1998.

MONDAL, P. et al. Synthesis of some new isoxazoline derivatives of chalconised indoline 2-one as a potential analgesic, antibacterial and anthelmintic agents. **Journal of young pharmacists: JYP**, v. 4, n. 1, p. 38, jan/ mar. 2012.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. **Clinical infectious diseases**, v. 60, n. 9, p. 1398-1404, maio. 2015.

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**, v. 286, n. 36, p. 31232-31240, set. 2011.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (EDS.). Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. 1. ed. [s.l.] Livraria da Física, 2007. p. 539

MORIGUCHI, I et al. Comparison of reliability of log P values for drugs calculated by several methods. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 42, n. 4, p. 976-978, 1994;

MORIGUCHI, I. et al. Simple method of calculating octanol/water partition coefficient. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 40, n. 1, p. 127-130, jan. 1992

MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of computational chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, jan. 1998.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 12, p. 958-969, dez. 2008.

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

MUEGGE, I.; PODLOGAR, B. L. 3D-Quantitative Structure Activity Relationships of Biphenyl Carboxylic Acid MMP-3 Inhibitors: Exploring Automated Docking as Alignment Method. **Quantitative Structure-Activity Relationships**, v. 20, n. 3, p. 215-222, out. 2001.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, out. 2005.

MUSICK, W. D. L.; NYHAN, W. L. Structural Features of the Phosphoribosyl-Transferases and Their Relationship to the Human Deficiency Disorders of Purine and Pyrimidine Metabolis. **Critical Reviews in Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 1-34, set. 1981.

MUSONDA, C. C. et al. Synthesis and evaluation of 2-pyridyl pyrimidines with in vitro antiplasmodial and antileishmanial activity. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 2, p. 401-405, jan. 2009.

MYERS, S.; BAKER, A. Drug discovery—an operating model for a new era. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 8, p. 727, ago. 2001.

NARE, B.; HARDY, L. W.; BEVERLEY, S. M. The roles of pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductase-thymidylate synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 21, p. 13883-13891, maio. 1997.

NATALE, C. C.; SEIXAS, P. M; DE ALMEIDA, D. M. A importância dos modelos murinos na caracterização das respostas imunológicas às leishmanioses: uma revisão. *Atas de Ciências da Saúde* (ISSN 2448-3753), v. 4, n. 3, p. 35-59, jul – set. 2016.

NEISSE, A. C.; HONGYU, K. Variáveis Psicológicas e Desempenho Acadêmico: Uma Análise Da Existência de Correlação Canônica. **E&S Engineering and Science**, v. 6, n. 2, p. 76-86, nov. 2017.

NEVES, DP. *Parasitologia Humana*, 11ª ed, São Paulo, Atheneu, 2005.

NEVES, L. O. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **An. bras. dermatol.**, v. 86, p. 1092-1101, nov/dez. 2011.

NGUEWA, P. A. et al. Pentamidine is an antiparasitic and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin. **Chemistry & biodiversity**, v. 2, n. 10, p. 1387-1400, out. 2005.

NIE, N. H.; BENT, Dale H.; HULL, C. H. *SPSS: Statistical package for the social sciences*. New York: McGraw-Hill, 1975.

NO, J. H.. Visceral leishmaniasis: revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta tropica**, v. 155, p. 113-123, mar. 2016.

OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals/Section 4: Health Effects. 1997.

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidance document on the validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] models., 2007. Disponível em:< <https://www.oecd.org/>> Acesso em 08 de janeiro de 2020.

Oliveira, A. P. et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. **J Immunol Methods**, v. 387, n. 1-2, p. 245-53, Jan. 2013.

OLIVEIRA, R. B. de et al. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotona redutase. *Química Nova*, v. 31, n. 2, p. 261-267, 2008.

ORRO, A. et al. In silico drug repositioning on F508del-CFTR: A proof-of-concept study on the AIFA library. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 113186, mar. 2021.

OSHIRO, C. M.; KUNTZ, I. D.; DIXON, J. S. Flexible ligand docking using a genetic algorithm. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 9, n. 2, p. 113-130, abr. 1995.

OSPINO, I. et al. Modelo Qsar para la predicción de los tiempos de vida media de bifenilos policlorados en humanos. **Vitae**, v. 12, n. 1, p. 45-53, 2005.

OTTANA, R. et al. 5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidinones: design and synthesis of novel anti-inflammatory agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4243-4252, jul. 2005.

OZOE, Y. et al. The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 391, n. 1, p. 744-749, jan. 2010.

PADIGEL, U. M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J. P. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. **Journal of immunology**, v. 171, n. 7, p. 3705–10, 1 out. 2003.

PAIRAS, G. N. et al. The Isoxazole Ring and Its N-Oxide: A Privileged Core Structure in Neuropsychiatric Therapeutics. **ChemMedChem**, v. 12, n. 6, p. 408-419, mar. 2017.

PALUMBO, E. Current treatment for cutaneous leishmaniasis: a review. **American journal of therapeutics**, v. 16, n. 2, p. 178-182, mar. 2009.

PASSERO, L. F. D. et al. Histopathology, humoral and cellular immune response in the murine model of *Leishmania (Viannia) shawi*. **Parasitology international**, v. 59, n. 2, p. 159–65, jun. 2010.

PAZ, O. S. et al. Modeling of BACE-1 Inhibitors as Anti-Alzheimer's Agents. In: *Computational Modeling of Drugs Against Alzheimer's Disease*. Humana Press, New York, NY. p. 177-206. Set. 2018.

PEARSON, R. D. et al. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. **J. Immunol.**, v. 131, p. 1994-1999, out. 1983.

PENNING, T. D. et al. Synthesis and biological evaluation of the 1, 5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1 H-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). **Journal of medicinal chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1347-1365, abr. 1997.

PERONA, J. J.; GRUIC-SOVULJ, I. Synthetic and editing mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases. In: *Aminoacyl-tRNA Synthetases in Biology and Medicine*. Springer, Dordrecht, p. 1-41. Jul. 2013

PINTO-MARTINEZ, A. K. et al. Mechanism of action of miltefosine on *Leishmania donovani* involves the impairment of acidocalcisome function and the activation of the sphingosine-dependent plasma membrane Ca²⁺ channel. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 1, dez. 2018.

PIRMEZ, C. et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **The Journal of clinical investigation**, v. 91, n. 4, p. 1390-1395, abr. 1993.

PITTA, M. G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 8, p. 2379-2387, jul. 2009.

PLANO, D. et al. Selenocyanates and diselenides: a new class of potent antileishmanial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 8, p. 3315-3323, ago. 2011.

PRADO-PRADO, F. J. et al. Unified QSAR approach to antimicrobials. Part 3: first multi-tasking QSAR model for input-coded prediction, structural back-projection, and complex networks clustering of antiprotozoal compounds. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 11, p. 5871-5880, jun. 2008.

PROTEIN DATA BANK: the single global archive for 3D macromolecular structure data. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D520-D528, jan. 2019.

RAKOTOMANGA, M. et al. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1425-1430, mar. 2007.

RAMAKRISHNAN, P. et al. In silico evaluation of drugs used in treatment of oral lichen planus. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 49, n. 9, p. 926-932, ago. 2020.

RAMOS, P. K. et al. Serum cytokine responses over the entire clinical-immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum* chagasi infection. **BioMed research international**, v. 2016, mar. 2016.

RANADE, R. M. et al. Induced resistance to methionyl-tRNA synthetase inhibitors in *Trypanosoma brucei* is due to overexpression of the target. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3021-3028, jun. 2013.

RATH, Susanne et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, jul/ago. 2003.

REIS, L. C., et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 103-115, maio-ago. 2006.

REIS, S. L. G. B. et al. Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolilaril-hidrazonas. **Quim. Nova**, v. 34, n. 1, p. 76-81, nov. 2011

RIBEIRO, J. M. et al. A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Science**, v. 243, n. 4888, p. 212-214, jan. 1989.

RIO DE JANEIRO (Estado). Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Subsecretaria de Vigilância em Saúde. Gerência de doenças transmitidas por vetores e zoonoses - GDTVZ.

Boletim epidemiológico leishmanioses- Nº 001/2019, Cenário epidemiológico: leishmanioses em humanos no estado do RJ, ago. 2019.

ROBERTS, M. T. M. Current Understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, Edinburgh, v. 75/76, p. 115-130, jul. 2006.

ROBLEDO, S. M. et al. Eficacia y tolerancia de la pentamidina en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea producida por *Leishmania (V.) panamensis* en Colombia. **Biomedica (Bogotá)**, v. 26, n. 1, p. 188-193, fev. 2006.

ROCHA, G. B. et al. Rm1: A reparameterization of am1 for h, c, n, o, p, s, f, cl, br, and i. **Journal of computational chemistry**, v. 27, n. 10, p. 1101-1111, maio. 2006.

RODRIGUES, S. A. et al. Análise de correlação canônica na associação de fatores climáticos e acidentes de trânsito na cidade de botucatu-sp. **revista de engenharia e tecnologia**, v. 11, n. 1, p. páginas 132-143, 2019.

ROGERS, K. A. et al. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS microbiology letters**, v. 209, n. 1, p. 1-7, mar. 2002.

ROMAGNOLI, R. et al. Anticancer activity of novel hybrid molecules containing 5-benzylidene thiazolidine-2, 4-dione. **European journal of medicinal chemistry**, v. 63, p. 544-557, maio. 2013.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 55, p. 453-483, out. 2001.

SAKAGUCHI S., et al. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. **Cell**, Cambridge, v. 133, p. 775-87, maio. 2008.

SALT, D. W. et al. Variable selection and specification of robust QSAR models from multicollinear data: arylpiperazinyl derivatives with affinity and selectivity for α 2-adrenoceptors. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 18, n. 7-9, p. 495-509, jul. 2004.

- SALUM, I. B.; POLIKARPOV, I.; ANDRICOPULO, A. D. Structural and chemical basis for enhanced affinity and potency for a large series of estrogen receptor ligands: 2D and 3D QSAR studies. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 26, n. 2, p. 434-442, set. 2007.
- SALUM, L. B.; POLIKARPOV, I.; ANDRICOPULO, A. D. Structure-based approach for the study of estrogen receptor binding affinity and subtype selectivity. **Journal of chemical information and modeling**, v. 48, n. 11, p. 2243-2253, out. 2008.
- SANDER, et al. DataWarrior, An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. **Journal of chemical information and modeling**, v. 55, n. 2, p. 460–73, jan. 2015.
- SANGRAULA, H. et al. Orally effective drugs for kala-azar (visceral leishmaniasis): focus on miltefosine and sitamaquine. **J Assoc Physicians India**, v. 51, p. 686-90, jun. 2003.
- SANTOS, C. S. et al. Representações sociais de profissionais de saúde sobre doenças negligenciadas. *Escola Anna Nery Revista de Enfermagem*, v. 21, n. 1, p. 1-9, fev. 2017.
- SANTOS, R. S.; PAULA, N. M.; BARBOSA, M. S.; SOARES, C. M. A. Caracterização imunológica da proteína recombinante gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do patógeno humano *Paracoccidioides brasiliensis*. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 2, maio/ago. 2012.
- SARAVIA, N. G. et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 4, p. 725-735, abr. 1989.
- SAS Institute Inc. SAS/STAT Product Documentation. SAS Institute Inc., Cary, NC. 2011.
- SCHRODINGER, L. L. C. The PyMOL molecular graphics system. Version, v. 1, n. 5, p. 0, 2010.
- SCOTTI, L. et al. In-silico analyses of natural products on *Leishmania* enzyme targets. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 15, n. 3, p. 253-269, mar. 2015.
- SEEBECK, T.; STERK, G. J.; KE, H. Phosphodiesterase inhibitors as a new generation of antiprotozoan drugs: exploiting the benefit of enzymes that are highly conserved between host and parasite. **Future medicinal chemistry**, v. 3, n. 10, p. 1289-1306, ago. 2011.

SHARMA, H. et al. Synthesis, Anti-inflammatory Activity and Docking Studies of Some Newer 1, 3-Thiazolidine-2, 4-dione Derivatives as Dual Inhibitors of PDE4 and PDE7. **Current computer-aided drug design**, v. 15, n. 3, p. 225-234, jun. 2019.

SHAROM, F. J. The P-glycoprotein multidrug transporter. **Essays in biochemistry**, v. 50, p. 161-178, set. 2011.

SHAW, J.J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 3, p. 323-335, mar. 1975.

SHIBA, K. et al. Human cytoplasmic isoleucyl-tRNA synthetase: selective divergence of the anticodon-binding domain and acquisition of a new structural unit. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 16, p. 7435-7439, ago. 1994.

SHIBATA, S. et al. Selective inhibitors of methionyl-tRNA synthetase have potent activity against *Trypanosoma brucei* infection in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 1982-1989, abr. 2011.

SHLOMAI, J.; KORNBERG, A. Deoxyuridine triphosphatase of *Escherichia coli*. Purification, properties, and use as a reagent to reduce uracil incorporation into DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 9, p. 3305-3312, 1978.

[Silicos-it.be.s3-website-eu-west-1.amazonaws.com/software/filter-it/1.0.2/filter-it.html](https://silicos-it.be.s3-website-eu-west-1.amazonaws.com/software/filter-it/1.0.2/filter-it.html), acessado em maio de 2020.

SILVA M.S.; BARATA L.; FERREIRA A.E., et al. Catalysis and structural properties of *Leishmania infantum* glyoxalase II: trypanothione specificity and phylogeny. **Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 195-204, dez. 2008

SILVA, A. S. et al. Análise multivariada da palma forrageira: características morfoprodutivas sob correlações canônicas. **Agrarian**, v. 13, n. 47, p. 100-106, fev. 2020.

SILVA, R. et al. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 149, p. 1-123, maio. 2015.

SINGH, G.; SEHGAL, R. Transfusion-transmitted parasitic infections. **Asian journal of transfusion science**, v. 4, n. 2, p. 73, jul. 2010.

- SINGH, I. et al. Synthesis of 5-(4-(1H-phenanthro [9, 10-d] imidazol-2-yl) benzylidene) thiazolidine-2, 4-dione as promising DNA and serum albumin-binding agents and evaluation of antitumor activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 166, p. 267-280, mar. 2019.
- SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, Rakesh K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485-497, jun. 2012
- SIPOS, F.. Process for producing the methyl ester of amphotericin B. U.S. Patent n. 4,035,567, jul. 1977
- SNYDMAN, D. R. et al. Parasitic central nervous system infections in immunocompromised hosts: malaria, microsporidiosis, leishmaniasis, and African trypanosomiasis. **Clinical infectious diseases**, v. 42, n. 1, p. 115-125, jan. 2006.
- SOFI, M. H. et al. Elevated IL-6 expression in CD4 T cells via PKC θ and NF- κ B induces Th2 cytokine production. **Molecular immunology**, v. 46, n. 7, p. 1443-1450, abr. 2009.
- SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Protein–ligand docking: current status and future challenges. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 1, p. 1526, jul. 2006.
- SOUZA, A. S. et al. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. **BioMed Central Infectious Diseases**, London, v.10, p.209, jul. 2010.
- SRIVALLI, K. M. R.; LAKSHMI, P. K. Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 353-367, jul/set. 2012.
- STATSOFT INC. Statistica v. 12.0. Data analysis software system. 2013.
- STEWART, D.; LOVE, W.. A general canonical correlation index. *Psychological bulletin*, v. 70, n. 3p1, p. 160, 1968.
- STEWART, J. J. P. MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 4, n. 1, p. 1-103, mar. 1990.

SUN, D et al. Synthesis, optimization and structure–activity relationships of 3, 5-disubstituted isoxazolines as new anti-tuberculosis agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 2, p. 460-472, fev. 2009.

SUNDAR, D. et al. Resistance to treatment in kala-azar: speciation of isolates from northeast India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 3, p. 193-196, set. 2001.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4267–4277, dez. 2010.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 5, p. 951-958, set. 2002.

TALHARI, S. et al. Tratamento de leishmanioses tegumentar americana. Resultados preliminares com pentamidina. **An. Bras. Dermatol.**, v. 60, p. 361-364, nov/dez. 1985.

TANGALLAPALLY, R. P. et al. Discovery of novel isoxazolines as anti-tuberculosis agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 23, p. 6638-6642, dez. 2007.

TIELENS, A. G.M; VAN HELLEMOND, J. J. Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. **Trends in parasitology**, v. 25, n. 10, p. 482-490, dez. 2009.

TOMAŠIĆ, T.; PETERLIN MASIC, L. Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 14, n. 1, p. 130-151, jan. 2014.

TORRIE, L. S. et al. Chemical validation of methionyl-tRNA synthetase as a druggable target in *Leishmania donovani*. **ACS infectious diseases**, v. 3, n. 10, p. 718-727, out. 2017.

TOVAR, J. et al. Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the tryA gene locus. **Molecular microbiology**, v. 29, n. 2, p. 653-660, maio. 1998.

TRACEY, D. et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. **Pharmacology & therapeutics**, v. 117, n. 2, p. 244-279, fev. 2008.

TRINCHIERI, Giorgio. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 2, p. 239-243, fev. 2007.

TROSSINI, G.H. G et al. Quantitative structure–activity relationships for a series of inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*: Molecular modeling, CoMFA and CoMSIA studies. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 28, n. 1, p. 3-11, ago. 2009.

TROTSKO, N. et al. Synthesis and antimycobacterial activity of thiazolidine-2, 4-dione based derivatives with halogenbenzohydrazones and pyridinecarbohydrazones substituents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 112045, mar. 2020.

TRUGILHO, P. F.; LIMA, J. T.; AKIRA, F. M. Correlação canônica das características químicas e físicas da madeira de clones de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*. **Cerne**, v. 9, n. 1, p. 81-91, fev. 2003.

TURCHETTI, A. P. et al. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 04, p. 403-407, abr. 2014.

VALDERRAMA, J. A. et al. Studies on quinones. Part 39: Synthesis and leishmanicidal activity of acylchloroquinones and hydroquinones. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4153-4159, jul. 2005.

VARNEK, A. et al. ISIDA-Platform for virtual screening based on fragment and pharmacophoric descriptors. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 4, n. 3, p. 191, 2008.

VASCONCELOS, J. M. et al. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **RBAC**, v. 50, n. 3, p. 221-7, nov. 2018.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, maio. 2002;

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. V. 16, p. 97–101, abr. 2003.

VELANKER, S. S. et al. Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. **Structure**, v. 5, n. 6, p. 751-761, jun. 1997.

VESSONI, F.. Correlação Canônica. MV2 Sistemas de Informação. Versão Preliminar, 1998.

- VICENS, Q.; WESTHOF, E. Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. **Structure**, v. 9, n. 8, p. 647-658, ago. 2001.
- VICINI, P. et al. Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-thiazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 11, p. 3859-3864, jun. 2006.
- VIEIRA, C. R. et al. Análise de Correlação Canônica entre Crescimento e Nutrição em Mudanças de Teca. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 2, maio. 2019.
- VISTOLI, G.; PEDRETTI, A.; TESTA, B. Assessing drug-likeness—what are we missing?. **Drug discovery today**, v. 13, n. 7-8, p. 285-294, abr. 2008.
- WARREN, G. L. et al. A critical assessment of docking programs and scoring functions. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 20, p. 5912-5931, ago. 2006.
- WATANABE, H. et al. Innate immune response in Th1-and Th2-dominant mouse strains. **Shock**, v. 22, n. 5, p. 460-466, nov. 2004.
- WEBER, T.; SELZER, P. M. Isoxazolines: a novel chemotype highly effective on ectoparasites. **ChemMedChem**, v. 11, n. 3, p. 270-276, jan. 2016.
- WHO. World Health Organization. Leishmaniasis Fact Sheet. 2019. Disponível em <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> > Acesso em 06 de janeiro de 2020.
- WILDMAN, S. A.; CRIPPEN, G. M. Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 39, n. 5, p. 868-873, ago. 1999;
- WISHART, D. d S. et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D1074-D1082, nov. 2018.
- WYLLIE S.; FAIRLAMB A. H. Methylglyoxal metabolism in trypanosomes and leishmania. **Semin Cell Dev Biol**, v. 22, n. 3, p. 271-277, maio. 2011.
- WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 38, p. 39925-39932, set. 2004.

ZHANG, P. et al. Synthesis and biological activities of novel isoxazoline-linked pseudodisaccharide derivatives. **Carbohydrate research**, v. 351, p. 7-16, abr. 2012.