



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

SONALY LIMA ALBINO

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE
***SCAFFOLDS* ACRIDÍNICOS COM POTENCIAL AÇÃO**
ANTIPARASITÁRIA

RECIFE

2024

SONALY LIMA ALBINO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE
SCAFFOLDS ACRIDÍNICOS COM POTENCIAL AÇÃO
ANTIPARASITÁRIA**

Defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Doutor(a) em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Orientador(a): Prof. Dra. Teresinha Goncalves da Silva

Coorientador(a): Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

RECIFE

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Albino, Sonaly Lima.

Desenvolvimento e avaliação farmacológica de scaffolds acridínicos com potencial ação antiparasitária / Sonaly Lima Albino. - Recife, 2024.

200f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2024.

Orientação: Teresinha Gonçalves da Silva.

Coorientação: Ricardo Olímpio de Moura.

Inclui referências e anexos.

1. Atividade antileishmania; 2. Atividade tripanocida; 3. Derivados acridínicos; 4. Estudos in silico; 5. Atividade imunomoduladora. I. Silva, Teresinha Gonçalves da. II. Moura, Ricardo Olímpio de. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

Sonaly Lima Albino

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE SCAFFOLDS
ACRIDÍNICOS COM POTENCIALAÇÃO ANTIPARASITÁRIA**

Defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Doutor(a) em Inovação Terapêutica.

Tese aprovada em: 03/05/2024

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Teresinha Goncalves da Silva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Marcelo Zaldini Hernandez (Avaliador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Dra. Anekécia Lauro da Silva (Avaliadora Externa)
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof. Dr. Igor José dos Santos Nascimento (Avaliador Externo)
Universidade Estadual da Paraíba

Prof. Dr. Samuel Paulo Cibulski (Avaliador Externo)
Universidade Estadual da Paraíba

DEDICATÓRIA

Meus pais, Solange e Udenilson.
Meu esposo, Rafael.
Minha irmã, Suilanny.
A vocês, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por Sua infinita bondade, graça e fidelidade, por ter me fortalecido e capacitado a alcançar esse objetivo.

Aos meus pais, Solange e Udenilson, e à minha irmã, Suilanny, por tanto em tantos momentos da minha vida. Vocês são meu alicerce. Sem o amor, ensinamentos, apoio, fé, incentivo e companheirismo de vocês, nada disso teria sido possível.

Ao meu amor, meu esposo, Rafael. Obrigada por ser o meu companheiro de vida, por compartilhar tantos momentos felizes e tornar essa caminhada mais leve. Agradeço por me apoiar e acreditar em mim.

A toda minha família, que sempre esteve ao meu lado. Em especial, a minha rosa, minha avó Silva (*in memoriam*), que sempre se orgulhou muito da sua neta “bioquímica” e que partiu antes de vê-la “terminar os estudos”, mas que agora, lá do céu, compartilha comigo a alegria dessa conquista.

A minha orientadora, professora Teresinha, por ter me aceitado e confiado como sua orientanda. Obrigada pelos ensinamentos e por toda compreensão.

Ao meu coorientador, professor Ricardo, que há oito anos me acolheu em seu laboratório e me guiou durante a graduação, mestrado e doutorado. Obrigada por me ensinar muito além do que os livros ensinam, por ser um excelente exemplo de profissional, professor, pesquisador, farmacêutico e, sobretudo, de ser humano.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos, que sempre tornaram a rotina laboratorial mais leve e prazerosa. Agradeço por dividir as frustrações de cada reação que deu errado, a tristeza de cada molécula que não deu uma boa atividade, a correria de cada prazo apertado, a ansiedade de cada defesa, e ainda assim manter a positividade e o sorriso no rosto. Em especial, a Jamire, Misael, Karla, Joilly, Mirelly, Yvnni e tantos outros que me acompanharam durante todos esses anos.

A Universidade Federal de Pernambuco e a Universidade Estadual da Paraíba por fornecerem infraestrutura para o desenvolvimento dessa pesquisa e por me proporcionarem os ensinamentos que me moldaram academicamente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, pela oportunidade, e aos professores integrantes do programa, que contribuíram diretamente para o meu crescimento profissional.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE),
por fomentar a pesquisa.

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente, meus sinceros
agradecimentos.

“Pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.”

Romanos 11:36

RESUMO

As leishmanioses e a doença de Chagas compreendem doenças parasitárias causada por protozoários de alto impacto em países tropicais e subtropicais. O arsenal terapêutico disponível para o tratamento dessas patologias é reduzido e limitado devido a fatores associados a toxicidade, alto custo e resistência medicamentosa. Diante dessa problemática, os derivados acridínicos se apresentam como potenciais compostos antiparasitários devido a sua estrutura privilegiada responsável pelo desenvolvimento de variados mecanismos de ação quimioterápicos. A partir dessa premissa, esse trabalho envolveu a síntese e avaliação do potencial antiparasitário de duas classes de derivados acridínicos (triazolidínico-acridínico e espiro-acridínicos). O primeiro capítulo da tese envolveu a síntese do derivado triazolidínico-acridínico (ACW-02) e avaliação frente formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis*, com posterior avaliação da citotoxicidade e estimulação de macrófagos por MTT, citometria de fluxo e microscopia. Os estudos *in silico* foram desenvolvidos a fim de prever um possível mecanismo de ação pela interação com os alvos de DNA, TryR, Topo1, CYP51 e CPB de *Leishmania sp.*, por meio do *docking* molecular, dinâmica molecular e cálculo de MM-PBSA. Os resultados demonstraram uma boa atividade anti-amastigota ($IC_{50} = 6,57 \mu\text{g mL}^{-1}$) e não toxicidade aos macrófagos ($CC_{50} > 256 \mu\text{g mL}^{-1}$), com indícios de possível ação imunomoduladora ao induzir um efeito microbicida em macrófagos infectados. Os resultados obtidos na determinação de citocinas no sobrenadante da cultura demonstram uma diminuição na expressão de IL-10, IL-6, TNF- α e IFN- γ , gerando efeitos contrários entre si que os tornam inconclusivos. Os estudos *in silico* demonstraram melhor afinidade e estabilidade na formação do complexo do ACW-02 com CPBLa ($Fitscore = 50,97$, $\Delta G_{bind} = -103,13 \text{ kJ mol}^{-1}$), alvo envolvido na imunorregulação da relação parasita-hospedeiro e possível responsável pela atividade leishmanicida desempenhada pelo derivado ACW-02. O segundo capítulo da tese compreende a síntese de derivados espiro-acridínicos e avaliação da atividade antileishmania e tripanocida. Para tal, os compostos AMTAC-01 e AMTAC-22 foram resintetizados e, subsequentemente, avaliados. A avaliação *in vitro* do potencial leishmanicida se deu pelos métodos de mensuração da atividade de β -gal e adição do substrato CPRG frente amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, nos quais os derivados apresentaram potente atividade antipromastigota ($IC_{50} = 1,3-2,2 \mu\text{g mL}^{-1}$). A determinação do efeito tripanocida *in vitro* frente formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* relevou o AMTAC-22 como promissor para tripomastigotas ao apresentar um IC_{50} ($2,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) menor que o benzonidazol. Entretanto, esses compostos demonstraram baixo índice de seletividade quando avaliado frente macrófagos, células Vero e L929. Os estudos *in silico* demonstraram o perfil de *druglikeness* dos compostos e demonstraram uma afinidade desejável frente aos alvos TryR, CYP51, CPBLa, Topo e TFI por *docking* molecular, sendo os melhores complexos selecionados para dinâmica molecular, que ressaltou AMTAC01-CPBLa como o complexo mais estável pela avaliação de RMSD, RMSF, Rg e ligações de hidrogênio. Em conclusão, os resultados demonstraram o potencial antiparasitário dos compostos acridínicos investigados, impulsionando a continuidade dos estudos envolvendo esses possíveis candidatos a fármacos a fim de mitigar o efeito tóxico e compreender seus mecanismos de ação.

Palavras-chave: Atividade antileishmania. Atividade tripanocida. Derivados acridínicos. Estudos *in silico*. Atividade imunomoduladora.

ABSTRACT

Leishmaniasis and Chagas disease comprise parasitic diseases caused by protozoa with a high impact in tropical and subtropical countries. The therapeutic arsenal available for treating these pathologies is limited and reduced due to factors associated with toxicity, high cost, and drug resistance. Given this problem, acridine derivatives emerge as potential antiparasitic compounds due to their privileged structure responsible for the development of various chemotherapeutic mechanisms of action. Based on this premise, this work involved the synthesis and evaluation of the antiparasitic potential of two classes of acridine derivatives (triazolidine-acridine and spiro-acridines). The first chapter of the thesis involved the synthesis of the triazolidine-acridine derivative (ACW-02) and its evaluation against amastigote and promastigote forms of *L. amazonensis*, followed by evaluation of cytotoxicity and macrophage stimulation using MTT, flow cytometry and microscopy. *In silico* studies were conducted to predict a possible mechanism of action by interacting with the DNA targets, TryR, Topo1, CYP51, and CPB of *Leishmania sp.*, through molecular docking, molecular dynamics, and MM-PBSA calculation. The results demonstrated good anti-amastigote activity ($IC_{50} = 6.57 \mu\text{g mL}^{-1}$) and non-toxicity to macrophages ($CC_{50} > 256 \mu\text{g mL}^{-1}$), with indications of possible immunomodulatory activity by inducing a microbicidal effect in infected macrophages. The results obtained in the determination of cytokines in the culture supernatant showed a decrease in the expression of IL-10, IL-6, TNF- α , and IFN- γ , generating contradictory effects and, consequently, inconclusive. *In silico* studies demonstrated better affinity and stability in the formation of the complex of ACW-02 with CPBLa (Fitscore = 50.97, $\Delta G_{\text{bind}} = -103.13 \text{ kJ mol}^{-1}$), a target involved in the immunoregulation of the parasite-host relationship and possibly responsible for the leishmanicidal activity exhibited by the derivative ACW-02. The second chapter of the thesis comprises the synthesis of spiro-acridine derivatives and the evaluation of their antileishmanial and trypanocidal activity. For this purpose, the compounds AMTAC-01 and AMTAC-22 were resynthesized and subsequently evaluated. The *in vitro* evaluation of leishmanicidal potential was performed using methods to measure β -gal activity and addition of CPRG substrate against amastigotes and promastigotes of *L. amazonensis* and *L. infantum*, in which the derivatives showed potent antipromastigote activity ($IC_{50} = 1.3\text{-}2.2 \mu\text{g mL}^{-1}$). The determination of trypanocidal effect *in vitro* against amastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* revealed AMTAC-22 as promising for trypomastigotes by presenting an IC_{50} ($2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$) lower than benznidazole. However, these compounds demonstrated a low selectivity index when evaluated against macrophages, Vero cells, and L929 cells. *In silico* studies demonstrated the druglikeness profile of the compounds and showed a desirable affinity against the targets TryR, CYP51, CPBLa, Topo, and TFI by molecular docking, with the best complexes selected for molecular dynamics, which highlighted AMTAC01-CPBLa as the most stable complex through evaluation of RSMD, RMSF, Rg, and hydrogen bonds. In conclusion, the results demonstrated the antiparasitic potential of the investigated acridine compounds, propelling the continuity of studies involving these possible drug candidates in order to mitigate toxic effects and understand their mechanisms of action.

Keywords: Antileishmanial activity. Trypanocidal activity. Acridine derivatives. *In silico* studies. Immunomodulatory activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Manifestações clínicas das leishmanioses	16
Figura 2 - Ciclo vital da leishmania.....	18
Figura 3 - Resposta imunológica adaptativa.....	23
Figura 4 - Estrutura dos compostos leishmanicidas utilizados na clínica	25
Figura 5 - Ciclo vital do <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
Figura 6 - Derivados nitrofuranos tripanocidas (a) nitrofurazona e (b) nifurtimox	32
Figura 7 – Benzonidazol.....	33
Figura 8 - Processo de <i>docking</i> molecular.....	36
Figura 9 - Fluxograma de utilização de técnicas de modelagem molecular para obtenção de fármacos.....	38
Figura 10 - Estrutura química enumerada do núcleo acridínico.....	40
Figura 11 - Principais derivados acridínicos empregados na terapia farmacológica.....	41
Figura 12 - Interações reversíveis com o DNA	42
Figura 13 - Derivados 9-aminoacridínicos ativos contra <i>L. chagasi</i> , <i>L. donovani</i> e <i>L. major</i>	44
Figura 14 - Compostos híbridos tiofênicos-acridínicos.....	45
Figura 15 - Compostos híbridos artemisínicos-acridínicos	46
Figura 16 - Derivados espiro-acridínicos ativos contra <i>L. infantum</i>	47
Figura 17 – Fármacos acridínicos acranil, aminacrina e mepacrina, respectivamente... 47	
Figura 18 - Derivado 2-(acridin-9-iltio)- <i>N,N</i> -dimetiletanamina.....	48
Figura 19 - Derivado bis-acridínico 16	49
Figura 20 - Composto bis-acridínico 15 ativo frente <i>T. cruzi</i>	49
Figura 21 - Efeito do composto ACW-02 em macrófagos J774 pelo método anexina V-FITC/PI.....	67
Figura 22 - Efeito do composto ACW-02 em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>	69
Figura 23 - Composto 3a (<i>N</i> -[6-(benzoilamino)-3-acridina]-benzamida).....	70
Figura 24 - Derivados 9-aminoacridínicos ACW-02 e ACS-AZ, respectivamente.	70
Figura 25 - Derivados espiro-acridínicos imunomoduladores	71
Figura 26 - Avaliação da produção de citocinas	73

Figura 27 - Avaliação do efeito do composto ACW-02 na produção de espécies reativas	77
Figura 28 - Ancoragem molecular do composto (a) ACW-02 e (b) ligante co-cristalizado em DNA (PDB ID: 1Z3F).	79
Figura 29 - Estrutura da elipticina	80
Figura 30 - <i>Docking</i> molecular do (A) ACW-02 e (B) ligante co-cristalizado no alvo TryR (PDB ID: 4APN).	82
Figura 31 - <i>Docking</i> molecular do (A) ACW-02 e (B) fluconazol no alvo CYP51 (PDB ID: 3L4D).	83
Figura 32 - <i>Docking</i> molecular do (A) ACW-02 e (B) camptotecina no alvo TOP1 (PDB ID: 2B9S).....	84
Figura 33 - <i>Docking</i> molecular do (A) ACW-02 e (B) composto 1c no alvo CPBLa....	85
Figura 34 - Simulações de dinâmica molecular.....	87
Figura 35 – Cromatograma do derivado AMTAC-01	110
Figura 36 - Cromatograma do derivado AMTAC-22	111
Figura 37 - Análise estrutural dos compostos AMTAC-01, -02 e -22.	115
Figura 38 - Relação estrutura-atividade dos compostos espiro-acridínicos frente amastigotas de <i>L. infantum</i>	117
Figura 39 - Espectros de (a) fluorescência e (b) absorção de UV-Vis do AMTAC-01.	121
Figura 40 - Interação do AMTAC-22 com DNA por fluorescência	122
Figura 41 - <i>Docking</i> molecular dos compostos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo de DNA (PDB ID: 1Z3F).	125
Figura 42 - Disposição dos compostos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo 1Z3F	126
Figura 43 - Interações dos compostos espiro-acridínicos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 aos sulcos do DNA (PDB ID: 102D).....	127
Figura 44 - Interações formadas por (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo CYP51 de <i>Leishmania infantum</i>	132
Figura 45 - Interações dos compostos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo CYP51 de <i>T. cruzi</i>	133
Figura 46 - Interações formadas entre (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo 4APN	136
Figura 47 - Ancoragem molecular dos derivados (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo TryR de <i>T. cruzi</i>	137

Figura 48 - Interações realizadas pelos compostos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo topoisomerase 1 de <i>L. donovani</i>	140
Figura 49 - Interações realizadas pelos compostos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo topoisomerase 2 de <i>T. cruzi</i>	141
Figura 50 - Formação do complexo entre CT1 e topoisomerase 2 de <i>T. cruzi</i>	142
Figura 51 - Docking molecular dos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 em TFI de <i>L. mexicana</i>	144
Figura 52 - Interações formadas pelos compostos espiro-acridínicos (A) AMTAC-01 e (B)-22 no alvo TFI de <i>T. cruzi</i>	146
Figura 53 - Interações dos compostos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 com CPBLa	148
Figura 54 - Complexos estabelecidos entre os compostos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo cruzaina	149
Figura 55 - Dinâmica molecular dos compostos espiro-acridínicos em alvos pertencentes a tripanossomatídeos	151
Figura 56 - Modelo de Boiled-Egg dos compostos espiro-acridínicos	154
Figura 57 - Metabolismo de fases 1 e 2 dos compostos espiro-acridínicos	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas e estruturais do derivado ACW-02	62
Tabela 2 - Avaliação da atividade leishmanicida e efeito citotóxico desempenhado pelo derivado triazolidínico-acridínico.....	64
Tabela 3 - Avaliação do efeito microbicida do composto ACW-02.....	68
Tabela 4 - Resultados do <i>docking</i> molecular nos alvos propostos	81
Tabela 5 - Energia de ligação e parâmetros de interação calculados por MM-PBSA....	89
Tabela 6 - Características físico-químicas e estruturais dos derivados espiro-acridínicos	108
Tabela 7 - Picos da amostra de AMTAC-01 detectados por CLAE	110
Tabela 8 - Picos da amostra de AMTAC-22 detectados por CLAE	111
Tabela 9 – Avaliação antileishmania <i>in vitro</i> dos compostos espiro-acridínicos.....	112
Tabela 10 - Avaliação da atividade tripanocida dos compostos AMTAC-01 e -22	119
Tabela 11 - Validação dos alvos de DNA por redocking	124
Tabela 12 - Docking molecular dos compostos espiro-acridínicos em DNA.....	124
Tabela 13 - Validação dos alvos por redocking	129
Tabela 14 - Resultados do docking molecular frente CYP51	131
Tabela 15 - Resíduos dos alvos CYP51 que interagem com as moléculas em estudo .	131
Tabela 16 - Resultados do docking molecular frente TryR	134
Tabela 17 - Resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações com os alvos de TryR	135
Tabela 18 - Resultados do docking molecular frente isoformas de Topoisomerase I e II	138
Tabela 19 - Resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com os compostos avaliados	138
Tabela 20 - Resultados do docking molecular frente triose-fosfato isomerase	143
Tabela 21 - Resíduos de aminoácidos de triose-fosfato isomerase envolvidos na interação com os derivados espiro-acridínicos	143
Tabela 22 - Resultados do docking molecular frente cisteína protease	147
Tabela 23 - Aminoácidos dos sítios ativos das cisteínas protases que interagem com os compostos em estudo.....	147
Tabela 24 - Modo de interação dos compostos espiro-acridínicos sobre Glicoproteínas P	155

Tabela 25 - Parâmetros de druglikeness	156
Tabela 26 - Interação dos compostos espiro-acridínicos com as isoformas de CYP450	157

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Esquema geral de síntese do derivado ACW-02.....	52
Esquema 2 – Mecanismo reacional para obtenção do composto ACW-02	61
Esquema 3 - Planejamento para obtenção do composto espiro-acridínico indólico	94
Esquema 4 - Esquema geral para obtenção dos derivados espiro-acridínicos	95
Esquema 5 - Esquema de síntese para obtenção do núcleo acridínico	97
Esquema 6 - Mecanismo reacional para obtenção dos derivados espiro-acridínicos (AMTACs).....	107

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔG	Energia livre de Gibbs
Å	Angstrom
ADMET	Absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade
CADD	Planejamento de fármacos assistida por computador
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
CCDA	Cromatografia de camada delgada analítica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPBLa	Cisteína protease de <i>Leishmania amazonensis</i>
CPRG	Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo
CYP51	Esterol 14-alfa-desmetilase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir de 50% de crescimento
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IS	Índice de seletividade
LC	Leishmaniose cutânea
LC ₅₀	Concentração letal média
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
Log P	Coefficiente de partição
MM-PBSA	Área de superfície de mecânica molecular Poisson-Boltzmann
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio
ns	Nanossegundo
PMAPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
ps	Picosegundo
RMSD	Desvio quadrático médio
RSMF	Flutuação quadrática média
Rg	Raio de giro
TNF	Fator de necrose tumoral

TryR	Tripanotiona redutase
Topo	Topoisomerase
TFI	Triose-fosfato isomerase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	Leishmaniose	15
2.1.1	<i>Ciclo de vida e infecção</i>	<i>16</i>
2.1.2	<i>Aspectos imunológicos relacionados a interação hospedeiro-parasita</i>	<i>19</i>
2.1.3	<i>Tratamentos atuais.....</i>	<i>24</i>
2.2	Doença de Chagas	27
2.2.1	<i>Ciclo de vida e infecção</i>	<i>28</i>
2.2.2	<i>Aspectos imunológicos relacionados a interação hospedeiro-parasita</i>	<i>30</i>
2.2.3	<i>Tratamentos tripanocidas atuais</i>	<i>31</i>
2.3	Planejamento e desenvolvimento de novos fármacos por intermédio da Química Medicinal.....	33
2.3.1	<i>Métodos in silico</i>	<i>35</i>
2.4	Derivados acridínicos	40
2.4.1	<i>Derivados acridínicos com ação leishmanicida.....</i>	<i>43</i>
2.4.2	<i>Derivados acridínicos com ação tripanocida.....</i>	<i>47</i>
3	CAPÍTULO 1 – SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DE UM DERIVADO TRIAZOLIDÍNICO-ACRIDÍNICO	51
3.1	Objetivos.....	51
3.1.1	<i>Objetivos gerais</i>	<i>51</i>
3.1.2	<i>Objetivos específicos</i>	<i>51</i>
3.2	Metodologia	52
3.2.1	<i>Síntese do composto acridínico</i>	<i>52</i>
3.2.2	<i>Avaliação da atividade antileishmania.....</i>	<i>53</i>
3.2.3	<i>Avaliação da citotoxicidade em macrófagos</i>	<i>55</i>
3.2.4	<i>Avaliação do efeito microbicida.....</i>	<i>56</i>
3.2.5	<i>Análise da produção de citocinas por macrófagos</i>	<i>57</i>
3.2.6	<i>Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....</i>	<i>57</i>
3.2.7	<i>Análise estatística.....</i>	<i>58</i>
3.2.8	<i>Estudos in silico</i>	<i>58</i>
3.3	Resultados e discussões.....	61
3.3.1	<i>Obtenção do derivado triazolidínico-acridínico.....</i>	<i>61</i>
3.3.2	<i>Avaliação da atividade leishmanicida</i>	<i>63</i>

3.3.3	<i>Determinação da citotoxicidade em macrófagos</i>	65
3.3.4	<i>Determinação do efeito microbicida em culturas de macrófagos infectados com L. amazonensis</i>	67
3.3.5	<i>Análise da expressão de citocinas</i>	71
3.3.6	<i>Avaliação da produção de EROs e ERNs</i>	75
3.3.7	<i>Ancoragem molecular</i>	78
3.3.8	<i>Dinâmica molecular</i>	86
3.3.9	<i>Cálculos de mecânica molecular/área de superfície de Poisson-Boltzmann</i> ..	89
3.4	Conclusão	92
4	CAPÍTULO 2 – SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS COM POTENCIAIS ATIVIDADES LEISHMANICIDA E TRIPANOCIDA	93
4.1	Objetivos	93
4.1.1	<i>Objetivos gerais</i>	93
4.1.2	<i>Objetivos específicos</i>	93
4.2	Metodologia	94
4.2.1	<i>Delineamento da pesquisa</i>	94
4.2.2	<i>Síntese dos compostos espiro-acridínicos</i>	95
4.2.3	<i>Determinação de pureza dos compostos sintetizados</i>	97
4.2.4	<i>Avaliação da atividade antileishmania frente Leishmania amazonensis e Leishmania infantum</i>	98
4.2.5	<i>Avaliação da atividade tripanocida</i>	99
4.2.6	<i>Determinação da citotoxicidade</i>	100
4.2.7	<i>Determinação do índice de seletividade</i>	102
4.2.8	<i>Interação com DNA</i>	103
4.2.9	<i>Estudo in silico de ancoragem molecular</i>	104
4.2.10	<i>Simulação de dinâmica molecular</i>	105
4.2.11	<i>Predição farmacocinética in silico</i>	105
4.3	Resultados e discussão	106
4.3.1	<i>Obtenção dos derivados espiro-acridínicos</i>	106
4.3.2	<i>Avaliação do potencial antileishmania</i>	112
4.3.3	<i>Avaliação do potencial tripanocida</i>	118
4.3.4	<i>Interação com DNA</i>	120
4.3.5	<i>Estudo teórico de possíveis mecanismos de ação</i>	128
4.3.6	<i>Dinâmica molecular</i>	150
4.3.7	<i>Predição farmacocinética in silico</i>	152

4.4 Conclusão.....	161
REFERÊNCIAS	163
ANEXOS	185

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) compreendem um grupo de 20 doenças infecciosas que constituem a aproximadamente 11% da carga global de doenças, o que corresponde a 1 bilhão de indivíduos predominantemente concentrados em regiões tropicais e subtropicais caracterizadas por níveis extremos de pobreza, especialmente entre populações indígenas (FERREIRA, L. L. G.; MORAES, J. DE; ANDRICOPULO, 2022; HOTEZ et al., 2020). As DTNs estão associadas a altos níveis de mortalidade e morbidade entre a população atingida, equivalentes a 200 mil mortes e 19 milhões anos de vida ajustados por incapacidade perdidos anualmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023).

Essas doenças divergem quanto a biologia do patógeno, modos de transmissão e quadros clínicos, tornando árduo o controle das contaminações (MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2017). Desse modo, são necessários esforços direcionados a esse objetivo que, no entanto, são expressamente insuficientes. As DTNs caracterizam-se, não somente pela população vulnerável em comum, mas também pela falta de investimentos direcionados a pesquisa e desenvolvimento de estratégias preventivas, métodos de diagnóstico e tratamentos medicamentosos (FEASEY et al., 2010; HOTEZ et al., 2020). Atualmente, apenas 0,5% dos fármacos e vacinas nas fases de descoberta e ensaios clínicos até o lançamento no mercado são direcionados às DTNs, além disso, somente 0,6% dos fundos da Assistência Oficial ao Desenvolvimento (AOD) da saúde são fornecidos às DTNs (CONCEIÇÃO et al., 2022; MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2017). Essa problemática apresenta grande relevância no Brasil. Estatísticas demonstram que o país possui a maior população afetada por DTNs no Hemisfério Ocidental. Correspondendo a 35% da população da América Latina e Caribe, o Brasil detém acima de 90% dos casos de duas das DTNs: esquistossomose e leishmaniose visceral (FONSECA; ALBUQUERQUE; ZICKER, 2020; HOTEZ; FUJIWARA, 2014).

De acordo com o cenário nacional e mundial, algumas DTNs são priorizadas devido suas importâncias clínicas e sociais: doença de Chagas, hanseníase, dengue e chikungunya, esquistossomose e leishmaniose (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023; FONSECA; ALBUQUERQUE; ZICKER, 2020). Nesse trabalho, destacamos a leishmaniose e a doença de Chagas, que são parasitoses causadas pelos protozoários da família Trypanosomatidae, *Leishmania sp.* e *T. cruzi*, responsáveis por um amplo espectro de condições clínicas dificilmente sanadas pelo reduzido arsenal terapêutico, limitado por fatores associados a toxicidade, resistência medicamentosa, alto custo, entre outros.

A partir dessa premissa, a química medicinal emerge como uma área multidisciplinar que compreende, entre outros, o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos por intermédio de estratégias racionais que, por sua vez, podem ser direcionadas para as patologias supracitas. Com base nessa abordagem, esse trabalho propõe o planejamento, síntese e avaliação de compostos acridínicos com potencial antiparasitário. Dividido em dois capítulos, diferentes classes de derivados acridínicos (triazolidínico-acridínico e espiro-acridínicos) foram desenvolvidos e investigados por métodos *in silico* e *in vitro* quanto a atividade leishmanicida e/ou tripanocida, bem como possíveis mecanismos de ação, visando a elucidação da ação desempenhada.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Leishmaniose

As leishmanioses compreendem um conjunto de doenças parasitárias ocasionadas pelos protozoários intracelulares do gênero *Leishmania sp.*, da família Trypanosomatidae. A infecção ocorre por intermédio da picada do mosquito fêmea infectado do gênero *Phlebotomous* ou *Lutzomyia*, que realiza o repasto sanguíneo e consequente passagem do parasito para corrente sanguínea do hospedeiro (ELMAHALLAWY et al., 2014; ROBERTS, 2005; SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES., 2021). Dados estatísticos epidemiológicos publicados pela Organização Mundial da Saúde (2023) indicam que aproximadamente 700 mil a 1 milhão de casos ocorrem anualmente e, atualmente, 1 bilhão de pessoas residem em áreas endêmicas e apresentam-se em risco iminente de infecção. Essas doenças são ocasionadas por aproximadamente 20 espécies de *Leishmania sp.*, que se classificam em dois grupos, sendo elas as do Mundo Velho, que inclui espécies características da África, Ásia e Sul Europeu (*L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* e o complexo *donovani* [*L. donovani*, *L. infantum*]), e as do Novo Mundo, que incidem principalmente na América Latina (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e o complexo *Viannia* [*L. brasiliensis*, *L. guyanensis*]) (COSTA-DA-SILVA et al., 2022; ORGANIZATION, 2023b; ROBERTS, 2005). Essas são responsáveis por causar diferentes manifestações clínicas, histopatológicas e imunopatológicas de acordo com as características da espécie em questão e o mecanismo molecular de defesa do hospedeiro (ANVERSA et al., 2018; UPADHYAY et al., 2018).

As manifestações clínicas são classicamente diferenciadas em três formas: leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea (Figura 1). A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é a forma mais agressiva da parasitose, sendo fatal em 95% dos casos se não tratada. Estima-se uma ocorrência de 50 a 90 mil casos anualmente reportados, principalmente em países da América Latina, como o Brasil, e no subcontinente indiano e leste africano, que correspondem a aproximadamente 90% dos casos. Essa é majoritariamente causada por *L. donovani* e *L. infantum*, e caracteriza-se por sintomas sistêmicos que incluem febre intermitente, esplenomegalia, hematomegalia, hipergamaglobulinemia, pancitopenia, entre outros (ORGANIZATION, 2023b; RODRIGUES et al., 2016).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da doença, com incidência anual de cerca de 600 mil a 1 milhão de novos casos, e caracteriza-se por lesões dermatológicas que se desenvolvem de eritemas até úlceras, ocasionando em cicatrizes irreversíveis, infecções

secundárias e morbidades. Essa pode ainda desenvolver uma condição definida como leishmaniose cutânea difusa (LCD) que apresenta múltiplos nódulos, pápulas ou tubérculos com infiltração difusa na pele e sem ulceração. As espécies responsáveis incluem *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. aethiopica* entre outras. Estas, por sua vez, ocasionalmente também são associadas a leishmaniose mucocutânea (LMC), caracterizada por lesões parcial ou totalmente destrutivas das mucosas naso-orofaríngea e laríngea. Desse modo, cerca de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central; enquanto 90% dos casos de LMC ocorrem no Brasil, Bolívia, Etiópia e Peru (ARONSON et al., 2016; COSTA-DA-SILVA et al., 2022; MOLKARA; REZA TAHERI; SABOURI RAD, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023b).

Figura 1 - Manifestações clínicas das leishmanioses



Fonte: Adaptado de Abbasi et al. (2018). (A) Leishmaniose visceral, (B) Leishmaniose cutânea, (C) Leishmaniose mucocutânea.

2.1.1 Ciclo de vida e infecção

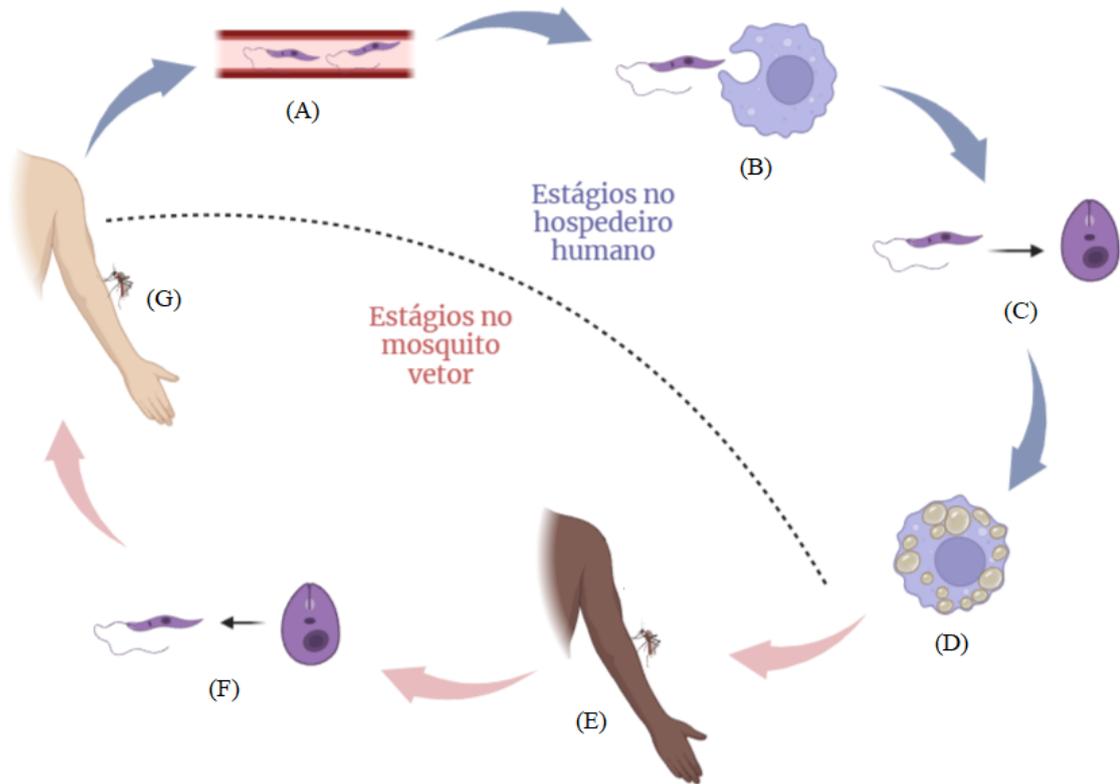
A *Leishmania sp.* é um protozoário heteroxênico que completa seu ciclo de vida intercalando entre hospedeiros definitivos mamíferos, tais como humanos, cães e roedores, e hospedeiros intermediários que compreendem os mosquitos flebotomíneos (SAINI; JOSHI; KAUR, 2022).

Adicionalmente, seu desenvolvimento compreende a alternância entre dois estágios morfológicos definidos como formas amastigota e promastigota. Amastigotas apresentam forma oval, não flagelada, sem motilidade, tamanho de aproximadamente 3-5 μm , e caracterizam-se por serem intracelulares encontradas nos fagócitos e sistema circulatório dos

hospedeiros mamíferos infectados. Em contrapartida, as formas promastigotas são alongadas, medem cerca de 10-15 μm , apresentam um flagelo que permite sua motilidade (ELMAHALLAWY; ALKHALDI; SALEH, 2021; SAINI; JOSHI; KAUR, 2022).

O ciclo de vida e infecção se inicia pela introdução das formas promastigotas metacíclicas por intermédio da picada do mosquito infectado no hospedeiro mamífero. A passagem das formas parasitárias pelo local da inoculação é favorecida por componentes encontrados na saliva do inseto que apresentam propriedades capazes de inibir respostas microbicidas pela modulação de antígenos e citocinas, a exemplo do aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias Th2 e diminuição da expressão de citocinas protetoras Th1 (Figura 2A) (VANNIER-SANTOS; MARTINY; SOUZA, 2005). No hospedeiro definitivo, o parasito interage com células fagocitárias do sistema imune, é ingerido por neutrófilos que, por sua vez, são ingeridos por macrófagos. Nessa célula, o parasito promastigota inicia sua diferenciação em amastigota dentro de organelas ligadas à membrana da via endocítica, adquirindo progressivamente características endossomais/lisossomais tardias. Esse processo de diferenciação começa nas horas seguintes à fagocitose e leva em média 5 dias. Após essa etapa, os parasitos são liberados dos macrófagos infectados e fagocitados por macrófagos saudáveis, perpetuando a infecção no hospedeiro (COURRET et al., 2002; IKEOGU et al., 2020) (Figura 2B-2D).

Figura 2 - Ciclo vital da leishmania



Fonte: Adaptado de Saini et al. (2022). Legenda: (A) formas promastigotas na corrente sanguínea; (B) fagocitose das formas promastigotas pelos macrófagos; (C) transformação das promastigotas em amastigotas dentro do macrófago; (D) multiplicação das amastigotas dentro do macrófago até extravasamento; (E) picada do mosquito com sucção das formas amastigotas; (F) conversão das amastigotas em promastigotas no intestino do mosquito *Phlebotomus* fêmea; (G) picada e injeção das formas promastigotas para o hospedeiro vertebrado.

É dada continuidade ao ciclo pela picada e ingestão do sangue infectado pelo vetor (Figura 2E). Pelas alterações nas condições fisiológicas, tais como diminuição da temperatura e aumento do pH no intestino do inseto, são impulsionadas extensas modificações morfológicas e bioquímicas no parasito. Este, ingerido na forma amastigota, se prolifera e se modifica extracelularmente durante o período de aproximadamente 7-8 dias após ingestão, assumindo a forma promastigota procíclica não infecciosa, que apresenta um pequeno flagelo e princípio de motilidade, até a forma promastigota metacíclica infecciosa, compreendendo o processo de metaciclogênese. Subsequentemente essa forma infecciosa é migrada para probóscide do mosquito para posterior inoculação, completando o ciclo vital da *Leishmania* (Figura 2F-2G)

(AVILA-GARCA et al., 2014; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; VANNIER-SANTOS; MARTINY; SOUZA, 2005).

Todavia, a transmissão da doença não se restringe por intermédio do vetor. Vias alternativas para contaminação vêm sido reportadas, a exemplo do contato direto com o tecido infectado durante procedimentos cirúrgicos/terapêuticos/laborais, transmissão sexual, transmissão congênita, entre outros (AVILA-GARCA et al., 2014).

2.1.2 Aspectos imunológicos relacionados a interação hospedeiro-parasita

A resposta imunológica do hospedeiro à infecção pelo parasito de *Leishmania sp.* envolve uma série de mecanismos complexos e relaciona-se a diferentes fatores, tais como a diversidade genética do hospedeiro, espécie da *Leishmania* e diferentes isolados parasitários. Desde a inoculação das formas promastigotas metacíclicas na corrente sanguínea do hospedeiro até sua efetiva infecção, diferenciação em amastigotas e multiplicação nos macrófagos, há a atuação de inúmeros componentes do sistema imunológico inato e adaptativo na função de erradicar a infecção ou de possibilitar sua progressão (GABRIEL et al., 2019; IKEOGU et al., 2020).

2.1.2.1 Imunidade inata

A resposta imunológica desempenhada pelo hospedeiro será instaurada prontamente pelo recrutamento de células pertencentes a imunidade inata (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas) ao local de inoculação do parasito. Durante esse estágio, a propriedade pró-inflamatória de agentes presentes na saliva do flebotomíneo, tais como o peptídeo maxadilan, é essencial para quimiotaxia e modulação dessas células fagocitárias (DUBIE; MOHAMMED, 2020; LOPES; COSTA-DA-SILVA; DOSREIS, 2014; ROSSI; FASEL, 2018). As células fagocitárias são responsáveis pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs) e consequente desencadeamento de respostas secundárias, como a produção de citocinas e moléculas coestimuladoras. São exemplos característicos de moléculas presentes na superfície da leishmania: o lipofosfoglicano (LPG), glicoproteína-63 (GP63) e glicosilfosfatidilinositol (GPI). Desse modo, além das células previamente citadas, células natural *killers*, proteínas do sistema complemento e quimiocinas efetuam relevantes contribuições para o controle da infecção (BECKER et al., 2003; DUBIE; MOHAMMED, 2020).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem pelo sistema vascular ao local de infecção, onde fagocitam e auxiliam na eliminação do parasito por uma diversidade de mecanismos intra e extracelulares, como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), exocitose de conteúdo granular rico em serinoproteases capazes de danificar a membrana parasitária e liberar armadilhas extracelulares de neutrófilos (*Neutrophil Extracellular Traps*, NETs) para aprisionar e inativar os parasitos.

Entretanto, os mecanismos de defesa desempenhados são contraditórios pois, a depender da espécie parasitária, podem ser insuficientes ou benéficos para o desenvolvimento do parasito. Por exemplo, as NETs apresentam-se como mecanismo de defesa eficaz contra espécie de *L. amazonensis*, porém ineficaz contra *L. infantum*, *L. donovani* e *L. mexicana* (HURRELL; REGLI; TACCHINI-COTTIER, 2016). Isso porque, ao ser fagocitada, a forma promastigota de *Leishmania sp.* se protege ao desempenhar mecanismos que incluem a inibição da biogênese dos fagolisossomos, a prevenção do estresse oxidativo, o atraso na apoptose dos neutrófilos, e indução a produção de quimiocinas e citocinas, como IL-8 e MIP1- β (CCL4), que, por sua vez, atraem mais células do sistema imune. Assim, determinadas espécies do parasito são capazes de desempenhar um mecanismo denominado “cavalo de tróia”, no qual são hábeis a sobreviver no vacúolo parasitoforo do neutrófilo até a apoptose da célula, e estimulam a secreção de quimiocinas que induzem a quimiotaxia de macrófagos ao local da infecção para fagocitose dos neutrófilos infectados (COSTA-DA-SILVA et al., 2022; GABRIEL et al., 2019; IKEOGU et al., 2020; TOEPP; PETERSEN, 2020).

O macrófago trata-se da principal célula hospedeira para a *Leishmania*, sendo necessária para os processos de sobrevivência, replicação e diferenciação, porém, também é a principal célula efetora capaz de destruir o parasito (COSTA-DA-SILVA et al., 2022). Essas células fagocitam o patógeno, confinando-o em uma organela fago-lisossoma composta por enzimas líticas e baixo pH, e ativam e liberam espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio a fim de eliminar o parasito intracelular e prevenir a progressão da doença. Em contrapartida, o parasito desenvolveu estratégias para defesa contra esses processos, dentre os quais se destaca a capacidade de impedir a ação tóxica do óxido nítrico ao secretar ou induzir os macrófagos a produzirem arginase (KEDZIERSKI; EVANS, 2014; ROSSI; FASEL, 2018).

A liberação de espécies reativas é uma das principais táticas utilizadas pelos macrófagos para eliminar o parasito e, para tal, um dos maiores produtores de espécies reativas é o óxido nítrico sintase-induzível (iNOS), que apresenta como substrato a L-arginina para produção de óxido nítrico (NO). Por sua vez, a proliferação e o desenvolvimento de parasitos de *Leishmania*

são dependentes da disponibilidade de poliaminas, que podem ser geradas pelo catabolismo da L-arginina e pela atividade enzimática da enzima arginase de *Leishmania* e dos hospedeiros mamíferos. No parasito, esta enzima é essencial para sua sobrevivência, pois é responsável por hidrolisar a L-arginina em L-ornitina e ureia, de modo que a sua disponibilidade auxilia na progressão da cascata metabólica que sustenta o crescimento e a sobrevivência do parasito. Além disso, no macrófago hospedeiro humano, além de realizar uma cascata metabólica semelhante, a arginase pode regular a atividade da iNOS pela competição pelo seu substrato L-arginina, resultando em baixos níveis de NO citotóxico, sendo, portanto, favorável para o desenvolvimento do parasito (BADIRZADEH et al., 2017; COLOTTI; ILARI, 2011; GLISIC et al., 2016; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). O desencadeamento do sentido para qual será favorecido o equilíbrio se dará através da influência da resposta imune adaptativa, que envolverá a essencial atividade de células T.

2.1.2.2 Imunidade adaptativa

A imunidade adaptativa é composta por células que medeiam a imunidade celular e humoral de modo específico, especializado e com capacidade de manter a memória imunológica. As células T apresentam um papel indispensável no controle do sistema imunológico frente a infecção parasitária por *Leishmania* e é baseado no desenvolvimento de diferentes subtipos celulares que, por sua vez, caracterizam-se por produzir diferentes padrões de citocinas (ARAUJO FLORES et al., 2020; IKEOGU et al., 2020).

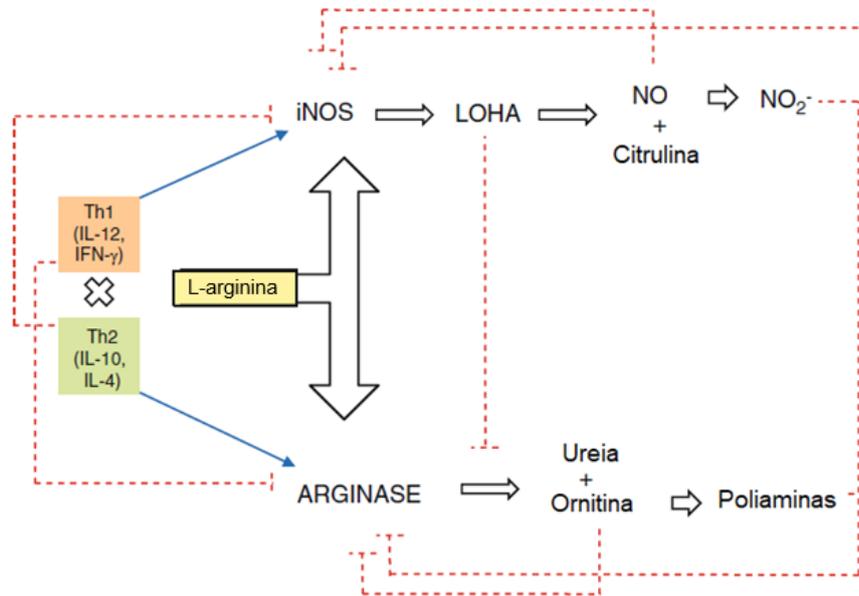
As citocinas locais secretadas proporcionam um ambiente adequado para conduzir a resposta de células T antígeno-específicas e os subconjuntos de memória de linfócitos T auxiliares CD4⁺ que, posteriormente, se desenvolvem em células T efetoras que se diferenciam diversos subtipos a depender do estímulo, a exemplo de Th1, Th2, Th17, Treg e TFH (ELMAHALLAWY; ALKHALDI; SALEH, 2021).

As células auxiliares do tipo 1 (Th1) são cruciais para erradicação do parasito a partir da expressão das citocinas interleucina-12 (IL-12), interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que, segundo estudos, estão correlacionados com a ativação macrofágica e destruição parasitária (DUBIE; MOHAMMED, 2020). O IFN- γ é a principal citocina expressa pelas Th1, responsável pela ativação de macrófagos pela via clássica M1, resultando em produção de iNOS, que degrada arginina em OH-arginina e, subsequentemente, em NO e citrulina, que posteriormente pode induzir a formação adicional de NO. Esse mecanismo é responsável pela atividade leishmanicida dependente de NO e desempenha um papel

fundamental contra infecção (CLASSEN; LLOBERAS; CELADA, 2009; GABRIEL et al., 2019; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009; RATH et al., 2014). Assim, a imunidade celular gerada pelas células Th1 é considerada como principal mediador da resistência à *Leishmania*, tendo em vista que uma resposta imune protetiva frente LC causada por *L. major*, *L. mexicana*, ou *L. amazonensis*, bem como LV causada por *L. donovani* ou *L. infantum*, depende do desenvolvimento do perfil de células T pró-inflamatórias. Entretanto, a exacerbação da resposta mediada por Th1 está associado a grave dano tecidual e a apresentação clínica da doença (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017).

Por sua vez, a ativação de células auxiliares do tipo 2 (Th2) induz a produção das citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 (MUXEL et al., 2018) e ativação macrófaga por uma via alternativa (M2). Essa via é caracterizada pela produção de poliaminas pela ativação da enzima arginase, favorecimento a sobrevivência do parasito e consequente progressão da doença. Adicionalmente, os macrófagos ativados alternativamente pela via Th2 exibem um fenótipo anti-inflamatório/imunoregulador que está relacionado à remodelação e reparação de tecidos, resistência a alguns parasitos e a promoção do crescimento do tumor (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). Assim, o equilíbrio entre as respostas obtidas pelo estímulo de Th1 ou Th2, juntamente com os mecanismos reguladores, é um determinante no curso da infecção (Figura 3).

Figura 3 - Resposta imunológica adaptativa



Fonte: Silva; Floeter-Winter (2014). Legenda: As vias estimulatórias são representadas por setas azuis contínuas e as vias inibitórias por setas vermelhas tracejadas. LOHA: N ω-hidroxi-L-arginina.

Adicionalmente, as células T auxiliaadoras tipo 17 (Th17) têm demonstrado um papel importante na imunopatogênese da leishmaniose por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre as quais destaca-se a IL-17. Essa interleucina pertence a uma família que abrange seis subtipos diferentes, incluindo IL-17A a IL-17F, e é responsável por induzir a expressão de outras citocinas (IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF), quimiocinas (CXCL1, CXCL10) e metaloproteases, sendo a chave na ativação e atração de neutrófilos para os locais de inflamação. Entretanto, os efeitos dessas células ainda não estão totalmente esclarecidos, tendo em vista que o estímulo promovido por essas se apresenta associado a respostas protetoras, como em infecções por *L. infantum* e *L. donovani*, e promotoras, como em infecções por *L. major* (BANERJEE et al., 2016; IKEOGU et al., 2020; PEDRAZA-ZAMORA et al., 2017).

Nesse sentido, as células T reguladoras (Treg) são também consideradas cruciais no controle da infecção ao diminuir a resposta inflamatória exacerbada. Essas são encontradas nos locais infectados e limitam a função das células T efetoras CD4⁺ por meio de mecanismos independentes ou dependentes de IL-10, que, entretanto, promovem a persistência do parasito a longo prazo, resistência ao tratamento e a uma possível reinfeção. Desse modo, alguns

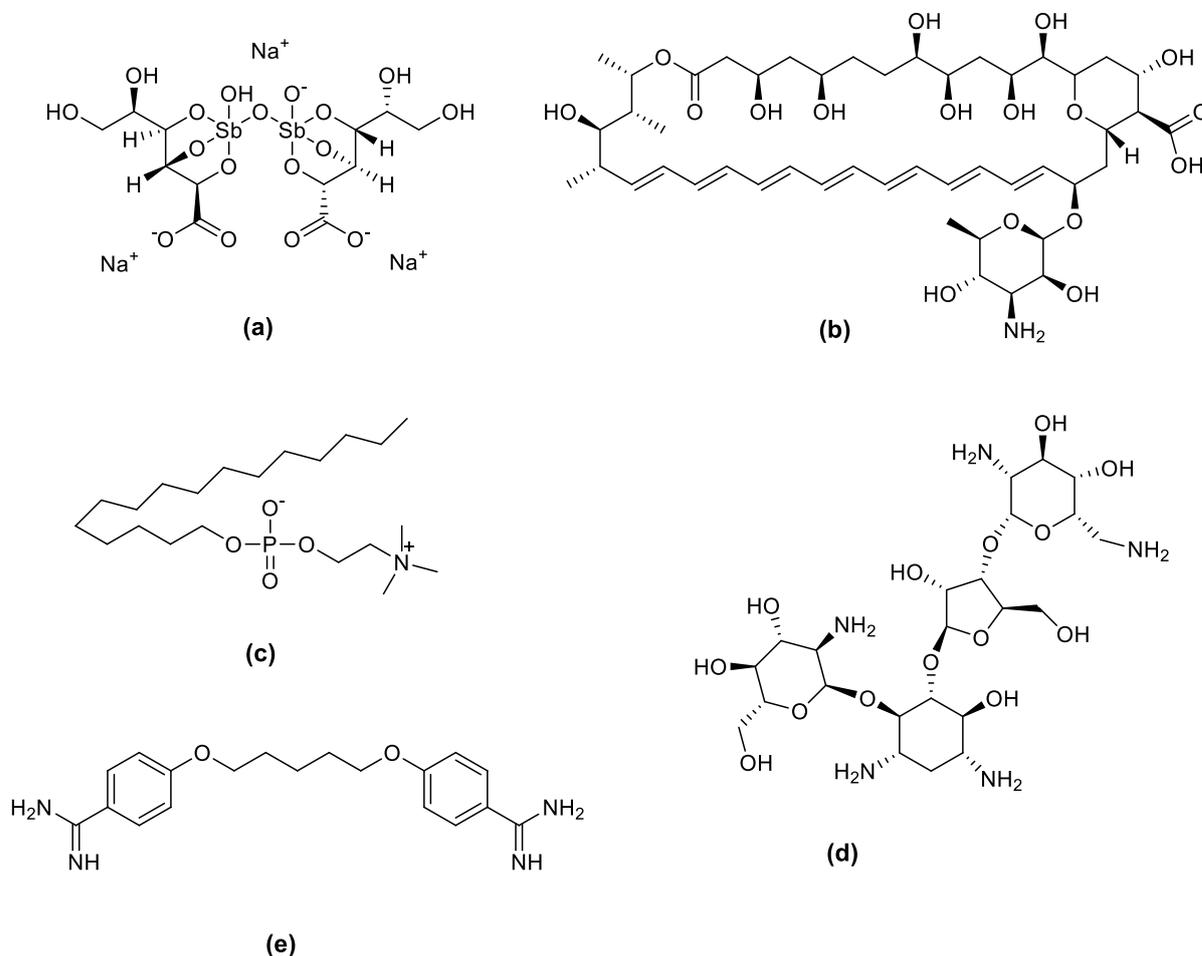
estudos relatam a relação da função das células Treg com casos de LC crônica causada por *L. panamensis* e *L. braziliensis*, bem como o aumento da suscetibilidade a infecção inicial e alterações imunológicas que favorecem uma reinfeção por *L. major* (GABRIEL et al., 2019; IKEOGU et al., 2020; ROSSI; FASEL, 2018; SCOTT; NOVAIS, 2016).

2.1.3 Tratamentos atuais

O tratamento quimioterápico para leishmaniose visa promover a morte parasitária de modo a cessar os efeitos clínicos causados pelo mesmo, garantindo, simultaneamente, a segurança e o conforto do paciente. Adicionalmente, o tratamento é considerado crucial para o controle da disseminação da parasitose e sua transmissão entre indivíduos, bem como para prevenir recorrência da doença. Entretanto, existem diversos fatores limitantes que envolvem essa temática, desde a baixa eficácia, alto custo, crescente resistência, dificuldade na administração do medicamento e risco de toxicidade sistêmica (MOLKARA; TAHERI; RAD, 2019; SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021).

O arsenal terapêutico de medicamentos leishmanicidas permanece invariável há anos e compreende apenas cinco medicamentos (Figura 4) (TIWARI et al., 2017), incluindo fármacos utilizados desde 1940, como os antimoniais pentavalentes (SbV), que são, até os dias atuais, utilizados como primeira linha de tratamento contra leishmaniose. Esses sucederam os compostos antimoniais trivalentes (SbIII), anteriormente utilizados como tratamento eficaz para leishmaniose, mas com efeitos secundários graves que acarretaram na interrupção do seu uso, tais como toxicidade cutânea, cardiovascular, renal, hepática, respiratória, entre outros (MOLKARA; TAHERI; RAD, 2019; WINSHIP, 1987).

Figura 4 - Estrutura dos compostos leishmanicidas utilizados na clínica



Fonte: Adaptado de Tiwari et al. (2017). (a) Estibogluconato de sódio; (b) Anfotericina B; (c) Miltefosina; (d) Paromicina; (e) Pentamidina.

Os antimoniais pentavalentes são comercializados atualmente como estibogluconato de sódio (Pentostan®) (Figura 4a) e antimoniato de meglumina (Glucantime®), sendo administrados por via intravenosa e intramuscular, respectivamente (MOLKARA; TAHERI; RAD, 2019). O mecanismo de ação envolvido na ação desempenhada pelos antimoniais pentavalentes ainda não é completamente compreendido, porém acredita-se que esses compostos sejam pró-fármacos que, em condições de baixo pH dentro do fagócito, sofre redução para sua forma ativa, o SbIII. Como antimônio trivalente, a ação leishmanicida está associada a inibição de tripanotona redutase, enzima essencial para sobrevivência do parasito, visto sua ação catalítica na redução do dissulfeto de tripanotona em ditiol tripanotona na única

via antioxidante parasitária responsável por defender a *Leishmania* do estresse oxidativo letal gerado pelo hospedeiro. Adicionalmente, achados sugerem a capacidade de inibição a topoisomerase I, e inibição da adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) por meio da inibição do ciclo do ácido cítrico e da glicólise (SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021; TIWARI et al., 2017). Entretanto, seu uso é limitado devido a crescente resistência e aos diversos efeitos adversos, que incluem cardiotoxicidade, pancreatite, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (ARAÚJO-VILGES et al., 2017).

A anfotericina B (Figura 4b) é um polieno antifúngico isolado de *Streptomyces nodosus*, reposicionado para ação leishmanicida devido sua ação na membrana celular parasitária. Esse apresenta afinidade pelo ergosterol e causa a perda da integridade membranar ao modificar a permeabilidade da mesma, ocasionando a perda de pequenas moléculas e íons essenciais, além de formar poros aquosos. No entanto, a alta toxicidade associada a esse fármaco restringe sua utilização e inclui efeitos tais como: anemia, potassemia, náusea, febre, mialgia, nefrotoxicidade, entre outros. Assim, a formulação lipossomal (AmBisome) foi desenvolvida como uma estratégia bem sucedida para contornar os efeitos adversos, porém, limitações tais como alto custo, via de administração de difícil aceitabilidade e surgimento de resistência persistem como desvantagens no seu uso (MOLKARA; TAHERI; RAD, 2019; TIWARI et al., 2017; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

Miltefosina (Figura 4c) é um medicamento que inicialmente foi desenvolvido como antitumoral, mas suspenso para essa finalidade devido a hemotoxicidade causada. Assim, semelhantemente a anfotericina B, esse medicamento foi reposicionado para ação antileishmania. Visando essa atividade, a miltefosina age como um análogo da alquilfosfocolina, que inibe a biossíntese de esteróis e fosfolípidios, interrompendo as vias de transdução intercelular. A administração é por via oral, todavia, este medicamento também está associado a alta toxicidade gastrointestinal e teratogenicidade, portanto, não é recomendado para mulheres grávidas e crianças (MOLKARA; TAHERI; RAD, 2019; SOTO; SOTO, 2006).

Paromicina (Figura 4d) é quimicamente um antibiótico aminoglicosídico que inibe a síntese de proteínas de protozoários por ligação à subunidade ribossômica 30S, resultando no acúmulo de complexos ribossomais 30S-50S anormais e, conseqüentemente, causando morte celular. Esse fármaco apresenta-se efetivo no tratamento de LC e LV, mas com disponibilidade restrita a regiões endêmicas (CHAWLA et al., 2011; KIP et al., 2018; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

Por fim, a pentamidina (Figura 4e) é uma diamina aromática utilizada como terapia de segunda linha contra leishmaniose. Seu mecanismo de ação ainda não está inteiramente elucidado, porém acredita-se estar associado a inibição do sistema de transporte ativo e complexo DNA mitocondrial. Em contrapartida, estudos indicam resistência de espécies de *Leishmania* ao medicamento devido à diminuição da captação e aumento do efluxo. Adicionalmente, a pentamidina é altamente tóxica, gerando hipoglicemia, nefrotoxicidade e hipotensão (SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012; SINGH et al., 2016).

Desse modo, tendo em vista o arsenal terapêutico apresentado e suas desvantagens, a Organização Mundial de Saúde veementemente recomenda e impulsiona a pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos voltados para o tratamento das leishmanioses (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). Portanto, a partir dessa premissa, a química medicinal apresenta de estratégias viáveis para o planejamento e obtenção de novos compostos ativos.

2.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pela infecção pelo protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi*, pertencente à família Trypanosomatidae. A transmissão do parasito se dá classicamente por intermédio de insetos hematófagos da subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como Barbeiros (*Triatoma infestans*) (CATALÁ; NOIREAU; DUJARDIN, 2017; FUENTES-VICENTE et al., 2018). Todavia, diferentes formas de transmissão são reportadas, como por transplante de órgãos, transfusão sanguínea, transmissão congênita e consumo de alimentos contaminados, tornando desafiador o controle da propagação parasitária (SHIKANAI YASUDA, 2021).

Desse modo, essa doença apresenta uma crescente incidência em regiões urbanas endêmicas ou não endêmicas devido a mobilidade populacional de regiões rurais Americanas para os demais continentes (ORGANIZATION, 2024; SHIKANAI YASUDA, 2021). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2024), estima-se que aproximadamente 6-7 milhões de indivíduos encontrem-se infectados por protozoários *T. cruzi*, majoritariamente nos países endêmicos da América Latina.

A inoculação do parasito segue um curto período de incubação (1-2 semanas) e precede as três etapas da infecção: fase aguda, indeterminada e crônica. A fase aguda é comumente assintomática, porém quando presentes, os sintomas inespecíficos e incluem febre, mal-estar,

edema subcutâneo, hepatoesplenomegalia e distúrbios neurológicos. A progressão da doença leva indivíduos a fase indeterminada, onde não são detectadas manifestações clínicas, e fase crônica, que se caracteriza por complicações cardiovasculares (insuficiência cardíaca, arritmia e tromboembolismo) ou digestivas (megacólon e megaesôfago), sendo o sinal patognomônico da doença o sinal de Romanã. Essas manifestações clínicas, em particular as cardiomiopatia crônica, são responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade, especialmente em jovens adultos (MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015; MAZZETI et al., 2021; RANGEL-GAMBOA et al., 2019).

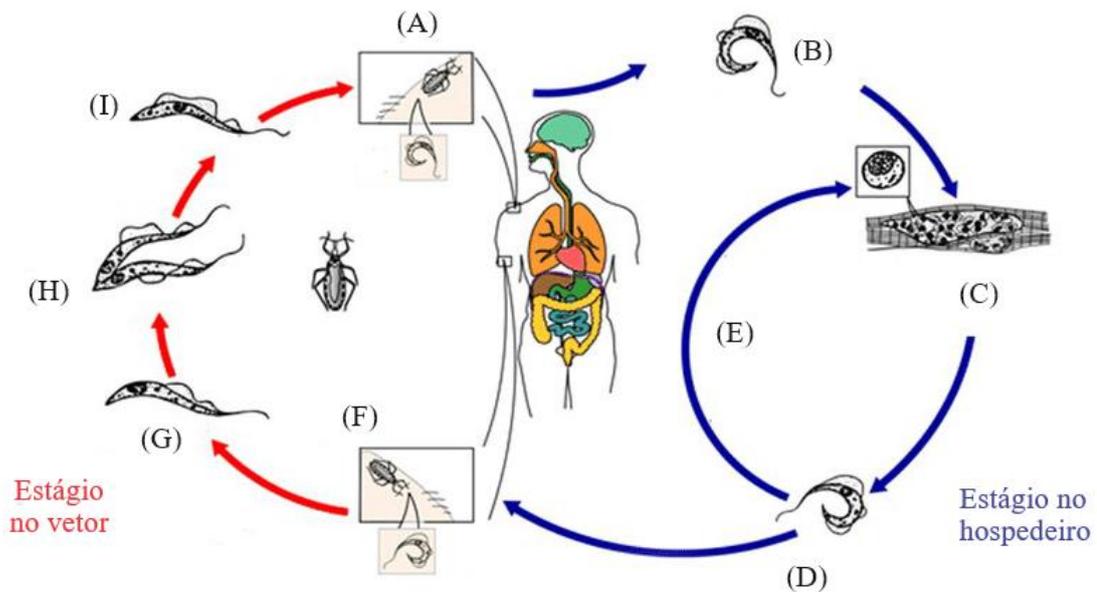
2.2.1 Ciclo de vida e infecção

O protozoário *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida heteroxênico, é mantido na natureza por inúmeras espécies de vetores e espécies hospedeiras de mamíferos distribuídas na maioria dos biomas e habitats das Américas. Esse se diferencia em ao menos quatro formas morfológicas a depender dos estímulos provenientes do microambiente em que está inserido, dentre elas: epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas, tripomastigotas e amastigotas (LUCENA et al., 2019; MARTÍN-ESCOLANO et al., 2022).

O ciclo se inicia pela transmissão do parasito em sua forma infectiva (tripomastigotas metacíclicas) ao hospedeiro humano por intermédio das vias anteriormente mencionadas (Figura 5A). As formas tripomastigotas metacíclicas, uma vez no hospedeiro, adentram a corrente sanguínea por meio de duas etapas: processo de adesão, caracterizada pela interação entre uma variedade de antígenos do *T. cruzi* aos receptores das células do hospedeiro no local de inoculação, que desencadeiam eventos de sinalização celular; e o processo de internalização, que compreende a formação do vacúolo parasitóforo do *T. cruzi* (TcPV) (SALASSA; ROMANO, 2019). Sendo capaz de invadir diferentes tipos de células nucleadas, os parasitos se diferenciam na forma amastigota, evadem do TcPV para o citoplasma, completam sua diferenciação e se proliferam por meio de fissão binária até preencher o espaço disponível na célula infectada. Nesse momento, as formas amastigotas alongam-se, readquirem os flagelos longos e diferenciam-se em tripomastigotas não replicativas, que, por sua vez, induzem a lise celular. Essas formas liberadas na corrente sanguínea podem se disseminar, infectar outras células em diferentes tecidos, bem como serem ingeridos por um triatomíneo (Figura 5B-5E). A capacidade de invadir uma variedade de tecidos, especialmente na fase crônica da doença, é

responsável por desenvolver as mais diversas manifestações clínicas (FUENTES-VICENTE et al., 2019; MARTÍN-ESCOLANO et al., 2022; SOUZA, CARVALHO; BARRIAS, 2010).

Figura 5 - Ciclo vital do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de Souza, Carvalho e Barrias (2010). Legenda: (A) Repasto sanguíneo do inseto triatomíneo, com passagem de formas tripomastigotas metacíclicas para ferida da mordida ou nas membranas mucosas. (B)

Tripomastigotas metacíclicas penetram nas células, diferenciando-se em amastigotas. (C) Amastigotas se multiplicam por fissão binária nas células infectadas. (D) Formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas e entram na corrente sanguínea. (E) Tripomastigotas infectam novas células, gerando as manifestações clínicas.

(F) Repasto sanguíneo com ingestão do sangue infectado. (G) Epimastigotas no intestino. (H) Multiplicação no intestino. (I) Tripomastigotas metacíclicas no intestino posterior.

O ciclo de vida do parasito se perpetua pela picada do inseto triatomíneo ao hospedeiro mamífero e ingestão do sangue infectado por formas tripomastigotas (Figura 5F). No estômago do inseto, a maioria dos parasitos sofrem lise e, aqueles que sobrevivem, se diferenciam em esferomastigotas ou epimastigotas, as principais formas replicativas no hospedeiro invertebrado. As epimastigotas migram para o intestino do inseto, onde se proliferam, migram para o intestino posterior e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infecciosos, que são excretados com as fezes do vetor (Figuras 5G-5I) (BERN et al., 2011; SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010).

2.2.2 Aspectos imunológicos relacionados a interação hospedeiro-parasita

A determinação da efetividade da infecção ou erradicação parasitária deriva de complexos mecanismos imunológicos desempenhados pelo hospedeiro humano. Diante disso, a articulação da resposta imune se divide classicamente em três etapas: durante as duas primeiras semanas, destacam-se os mecanismos efetores da resposta imune inata; no decorrer dos estágios intermediário e tardio da fase aguda da infecção, surgem os efeitos gerados pela resposta imune específica adquirida desempenhada pelos componentes celulares e humorais; a longo prazo, mantendo-se durante a fase crônica da infecção, caso não tratada, a memória imunológica manifesta-se e garante resistência à reinfecção (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000). Consequentemente, o protozoário dispõe de variadas estratégias para evadir o sistema imunológico, especialmente na subversão do sistema complemento e inibição do efeito fagocítico das células mononucleares (NARDY; MORROT; FREIRE-DE-LIMA, 2015; ZAMBRANO-VILLA et al., 2002).

A defesa inicial do hospedeiro após a inoculação do parasito compreende a atuação de células fagocitárias. Para tal, os PMAPs presentes na superfície do parasito induzem a invasão celular e medeiam a ativação da resposta imune. Esses são majoritariamente compostos por moléculas glicosiladas ligadas à membrana celular por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), como mucinas ancoradas por GPI derivadas de tripomastigotas (tGPI-mucinas), transialidases e proteínas associadas a mucinas (MAGALHÃES et al., 2022).

Os macrófagos compreendem as primeiras e principais células a responder a infecção. Quando ativados, esses produzem substâncias citotóxicas, incluindo superóxido pela NADPH oxidase (NOX) e óxido nítrico mediado pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS), como consequência de reações geradas pelo sistema imune, danos secundários às mitocôndrias e destruição de tecidos causada pelo parasito. Entretanto, a fim de evadir do efeito tripanocida do macrófago, o parasito produz o vacúolo parasitóforo que se fundem aos lisossomos afim de manter a mobilidade do tripomastigota dentro da célula hospedeira e induzir a formação de um ambiente ácido que contribui para diferenciação em formas amastigotas no citoplasma. Adicionalmente, a sobrevivência do parasito é mediada por uma rede complexa de enzimas antioxidantes, como peroxidases e superóxido dismutases (SODs), que o protegem de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016; KOO et al., 2016; PAIVA; MEDEI; BOZZA, 2018; PIACENZA et al., 2008).

Não obstante, devido a capacidade do *T. cruzi* de infectar uma diversidade de células nucleadas, outras células de defesa também desempenham papéis essenciais no controle da

infecção. Os neutrófilos e células dendríticas exercem atividade fagocitária, assim como os eosinófilos, que, juntamente com basófilos e mastócitos, são responsáveis por iniciar uma resposta inflamatória. Complementarmente, as células natural *killer* são fundamentais para a destruição de células infectadas e para produção da citocina IFN- γ (MARSHALL et al., 2018; RIOS et al., 2019).

Adicionalmente, em resposta ao reconhecimento dos PMAPs e da ativação macrofágica, as células T CD4⁺ e CD8⁺ atuam na amplificação da reação imune pela expressão de citocinas e destruição de células infectadas, respectivamente. Estudos realizados em modelos experimentais de infecção por *T. cruzi* indicam uma significativa resposta Th1, envolvendo células CD4⁺ e CD8⁺, caracterizada pela produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12. Dentre essas, o IFN- γ demonstra um papel protetor inicial na infecção, induz a produção de metabólitos do NO e apresenta atividade tripanocida em macrófagos infectados. Em contrapartida, a produção de IL-10 e TGF- β está associada à replicação do parasito pela inibição da atividade tripanocida dos macrófagos, sendo possível que sua expressão seja uma medida para minimizar os efeitos citotóxicos desenvolvidos pela superprodução de citocinas pró-inflamatórias (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996; ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; RIOS et al., 2019; SILVA et al., 1998).

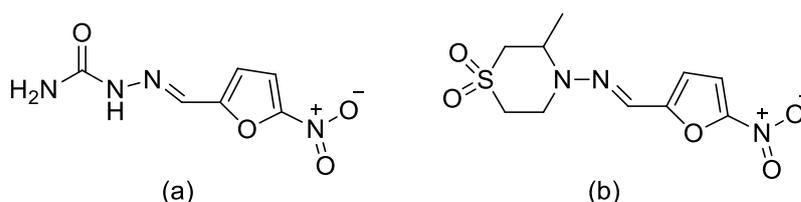
Semelhantemente, destaca-se a atuação do sistema complemento na contenção da disseminação do parasito. Após replicação intracelular, ruptura da célula hospedeira e acesso a corrente sanguínea, o parasito torna-se um alvo do sistema complemento. Ao ser ativado por uma das três possíveis vias (lecitina, clássica ou alternativa), as cascatas reacionais levam a produção de C3 convertase e C5 convertase, resultando na formação do complexo de ataque à membrana (MAC) e na subsequente lise do patógeno. Todavia, o *T. cruzi* desenvolveu estratégias de evasão do sistema complemento que se concentra na interrupção ou inibição da formação do C3 convertase, intermediário essencial para o desenvolvimento de todas as respostas mediadas pelo complemento (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016; CESTARI et al., 2013; LIDANI et al., 2017).

2.2.3 Tratamentos tripanocidas atuais

O tratamento medicamentoso para doença de Chagas é dividido em: etiológico, no qual o alvo do tratamento é o parasito, e não etiológico, que visa tratar as manifestações clínicas (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019). O tratamento etiológico compreende, atualmente, a utilização de dois medicamentos: nifurtimox e benzonidazol.

Durante o início da década de 50, compostos contendo a porção nitrofurano foram investigados frente modelos infectados com *T. cruzi*, evidenciando a potencialidade do derivado nitrofurazona, que, por sua vez, serviu como estrutura base para o desenvolvimento do fármaco nifurtimox (Figura 6).

Figura 6 - Derivados nitrofuranos tripanocidas (a) nitrofurazona e (b) nifurtimox



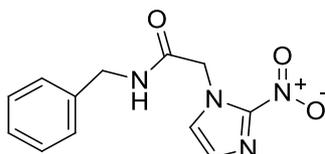
Fonte: Patterson, Fairlamb (2019).

O nifurtimox é um pró-fármaco ativado por nitroreduases do tipo 1 presentes do *T. cruzi* (TcNTR). O mecanismo de ação do nifurtimox ainda não foi inteiramente elucidado, porém compreende-se que a sua ação envolve alteração no ciclo redox e na formação de radicais livres, que são responsáveis por ocasionar lesões nos parasitos (MAZZETI et al., 2021). As limitações do tratamento incluem a alta incidência de efeitos adversos, tais como distúrbios gastrointestinais (anorexia, náuseas e desconforto abdominal) e alterações relacionadas ao sistema nervoso central (insônia, irritabilidade e desorientação), além de surgimento de resistência aos compostos nitroheterocíclicos, que parece estar associada à perda de uma cópia do gene TcNTR. Portanto, devido à alta toxicidade, durante os anos 80, o nifurtimox foi suspenso no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai. Atualmente, é autorizada sua utilização nesses países quando o tratamento com o benzonidazol é ineficaz (COURA; CASTRO, 2002; ECHEVERRIA; MORILLO, 2019; RIBEIRO et al., 2020).

O benzonidazol (Figura 7) foi recentemente aprovado pela FDA para o tratamento da doença de Chagas em pacientes na faixa etária de 2 a 12 anos. Esse derivado imidazólico não possui o mecanismo de ação elucidado, entretanto é sugerido que também envolva a redução por TcNTR que ocasionam efeito citotóxico aos parasitos por formas adutos nas macromoléculas de DNA e RNA, além de induzir aumento na fagocitose e lise do parasito, e inibir seu crescimento pela ação da enzima fumarato redutase. Adicionalmente, existem hipóteses de que o benzonidazol desenvolva uma ação imunomoduladora ao aumentar a

expressão de IFN- γ (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019; MAZZETI et al., 2021; RAJÃO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2020).

Figura 7 – Benzonidazol



Fonte: Patterson, Fairlamb (2019).

Todavia, o benzonidazol provoca um amplo espectro de efeitos adversos, dentre os quais destacam-se as reações de hipersensibilidade, intolerância digestiva, anorexia, astenia, dores de cabeça, distúrbios no sono, neuropatia, entre outros. Resistência medicamentosa dos protozoários de *T. cruzi* ao benzonidazol também vêm sendo ocasionalmente reportado. Assim, existe um índice considerável de pacientes que abandonam o tratamento (ALDASORO et al., 2018; ECHEVERRIA; MORILLO, 2019).

Embora nenhuma adição tenha sido feita a esse arsenal terapêutico há mais de 50 anos, ambos fármacos apresentam bons índices de cura na fase aguda da infecção, com valores variando de 60 a 85% de cura, alcançando até 100% no caso de transmissão congênita. Não obstante, a eficácia desses compostos decai significativamente durante a etapa crônica da doença (5-20%), além de apresentar diferentes perfis de eficácia a depender da região geográfica devido a variabilidade genética entre cepas da espécie (MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015; PATTERSON; FAIRLAMB, 2019; RAJÃO et al., 2014).

Portanto, em vista do limitado arsenal terapêutico e da necessidade da obtenção de compostos eficazes no tratamento da etapa crônica da doença, ressalta-se a necessidade de novos fármacos que possam suprir essa demanda.

2.3 Planejamento e desenvolvimento de novos fármacos por intermédio da Química Medicinal

No decorrer das últimas décadas, aproximadamente 100 bilhões de dólares têm sido investidos anualmente no desenvolvimento de novos fármacos por indústrias farmacêuticas,

indicando a relevância da descoberta de novos agentes bioativos para as mais diversas enfermidades (DENG et al., 2020). Nesse contexto, o emprego das estratégias da química medicinal apresenta-se indispensável para obtenção racional de fármacos.

Assim, a química medicinal compreende uma ciência multidisciplinar com foco no desenho estrutural, invenção, descoberta, identificação e síntese de novos compostos bioativos, bem como o estudo da relação entre a estrutura química desses e os parâmetros farmacológicos observados em testes, tais como relação estrutura-atividade, absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007; SILVA, 2013).

Durante as etapas iniciais do planejamento do fármaco, diferentes estratégias podem ser empregadas a fim de obter novos compostos bioativos de forma racional. Dentre essas, destaca-se a abordagem fisiológica, na qual o foco trata-se do mecanismo de ação visado. Essa via requer o conhecimento do processo fisiopatológico, alvos e moléculas endógenas envolvidas (BARREIRO; FRAGA, 2015).

A disponibilidade de informações sobre a estrutura tridimensional do alvo, em especial acerca do sítio ativo, permite o desenho da estrutura molecular da nova entidade química, possibilitando determinar sua ação (agonista/ativador ou antagonista/inibidor) e afinidade (tipos de interações) sob o alvo, de modo que possa complementar geométrica e eletrostaticamente o sítio ativo. Essa estratégia é denominada desenho de fármacos baseado na estrutura (*structure-based drug design*, SBDD) (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2018; MONTANARI, 2011). A estrutura é comumente obtida por técnicas de cristalografia de raio X e ressonância magnética nuclear (RMN), e é base para experimentos baseados na estrutura, como triagens virtuais de alto rendimento, *docking* molecular, dinâmica molecular, modelagem por homologia, entre outros (LEELANANDA; LINDERT, 2016; NASCIMENTO; AQUINO; SILVA-JÚNIOR, 2022).

Em contrapartida, a ausência da estrutura do alvo redireciona a estratégia para o planejamento a partir da estrutura do ligante endógeno, sendo assim um desenho de fármacos baseado no ligante (*ligand-based drug design*, LBDD). Com isso, diversas técnicas foram desenvolvidas com o passar dos anos a fim de identificar características relevantes do(s) ligante(s), envolvendo: análise da similaridade dos ligantes, procura pelo farmacóforo, relação quantitativa estrutura-atividade e triagem virtual baseada no ligante (BACILIERI; MORO, 2007; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2018).

A partir dessas premissas, surgiu a estratégia de desenho de fármacos baseado no fragmento (*fragment-based drug design*, FBDD), desenvolvida e largamente empregada,

especialmente em escala industrial, durante as duas últimas décadas. Essa baseia-se na avaliação preliminar de determinados fragmentos no alvo bem conhecido e, a partir dos acertos, são realizados acréscimos à estrutura a fim de obter compostos *leads*, com propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas desejáveis. Por meio dessa abordagem, vários medicamentos têm sido desenvolvidos e utilizados na clínica, tal como o vemurafenibe, um inibidor da atividade oncogênica da B-Raf quinase (LI, 2020; MURRAY; REES, 2009; SOUZA NETO et al., 2020).

Aliados a essas e as mais diversas abordagens para o desenho e planejamento de novos fármacos, diversos métodos que visam o desenvolvimento e avaliação desses surgiram. Atualmente, os métodos *in silico* se destacam durante as etapas iniciais para obtenção de novas moléculas bioativas, desde a construção da estrutura até avaliações preliminares da potencial atividade (KUMAR; JHA, 2017).

2.3.1 Métodos *in silico*

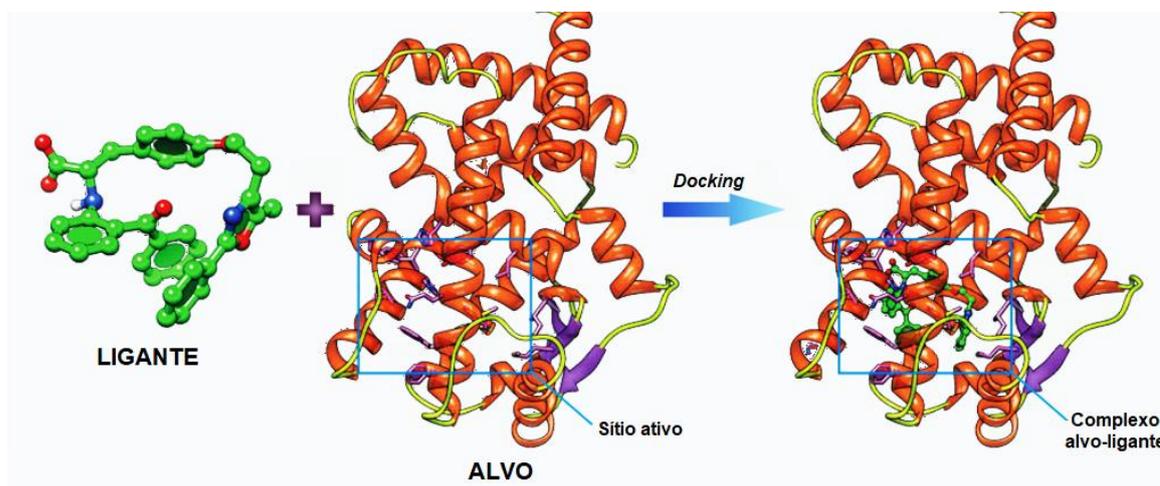
O processo tradicional de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, compreendendo várias etapas que demandam um alto investimento e tempo prologado, que estima aproximadamente 15 anos. Embora o desenvolvimento de cada medicamento apresente variações a depender da espécie química, tais como metodologias e tempo de estudo, dados recentes indicam um gasto de US\$944 milhões a US\$2,8 bilhões por medicamento, com tendência crescente com o passar dos anos (SIMOENS; HUYS, 2021). Todavia, há um alto índice de falha durante esses processos, nos quais cerca de 90% dos fármacos que chegam às fases clínicas são eventualmente descartados. Aproximadamente 75% das falhas ocorrem devido à erros nas fases da descoberta e planejamento (LEELANANDA; LINDERT, 2016).

Assim, o desenho de medicamentos auxiliado por computador (*computer-aided drug design*, CADD) têm se tornado um campo de estudos emergente devido ao potencial de otimizar a obtenção do fármaco, ao reduzir o custo (em cerca de 50%) e duração dos processos, atuando principalmente nas etapas iniciais, decisivas para o sucesso da pesquisa. Desse modo, a principal vantagem da utilização de métodos de CADD é a seleção de compostos promissores para avançar para os estudos biológicos, baseando-se em triagens racionais realizadas nos alvos de interesse por simulação em *softwares* computacionais e em predições de propriedades farmacocinéticas (NASCIMENTO; AQUINO; SILVA-JÚNIOR 2022; SURABHI; SINGH, 2018; VEMULA et al., 2022).

2.3.1.1 Docking molecular

O *docking* molecular trata-se de uma técnica utilizada para determinar a conformação e orientação da molécula em avaliação no sítio escolhido do alvo macromolecular, utilizando complementariedade estérica e interações eletrostáticas para quantificá-lo e, a partir disso, designar o complexo mais estável (Figura 8) (VEMULA et al., 2022). Portanto, esse método *in silico* é frequentemente utilizado devido a viabilidade da sua aplicação como uma alternativa para antecipar a orientação de candidatos a fármacos frente ao alvo a fim de prever a sua afinidade e, conseqüentemente, provável atividade farmacológica (CHAUDHARY; MISHRA, 2016).

Figura 8 - Processo de *docking* molecular



Fonte: Liao et al. (2013).

Como observado na Figura 8, a princípio o processo pode ser visualizado como um modelo chave e fechadura, no qual a conformação do ligante tende a ser modificada para otimizar o encaixe no alvo, tendo em vista que o programa simula diversas posições de complexação entre esses. Assim, a estabilização desses complexos é desenvolvida por intermédio das interações realizada entre os componentes, e podem ser classificadas nos seguintes tipos: forças eletrostáticas (dipolo-dipolo, íon-dipolo, iônica), eletrodinâmica (interações de Van der Waals), estéricas (causadas por entropia) e relacionadas ao solvente (ponte de hidrogênio e interações hidrofóbicas) (CHAUDHARY; MISHRA, 2016; CHEN; SEUKEP; GUO, 2020; LIAO et al., 2013).

As estruturas tridimensionais do alvo são depositadas, processadas, distribuídas e obtidas em bases de dados, tais como o *Protein Data Bank* (PDB). Introduzido em 1971 em um projeto conjunto entre *Cambridge Crystallographic Data Center* e *Brookhaven National Laboratory*, o PDB compreende a principal repositório de estruturas proteicas. Atualmente é manejado por quatro membros, que são PDBj, PDBe, *Research Collaboration for Structural Bioinformatics* (RCSB) e *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (BMRB), e contém acima de 200.000 estruturas (LEELANANDA; LINDERT, 2016; PROTEIN DATA BANK, 2023; SINGH; KUMAR, 2021).

Na indisponibilidade da estrutura do alvo de interesse, é possível criar um modelo comparativo baseado na estrutura de uma proteína relacionada, por meio um processo conhecido como modelagem por homologia. Esse consiste na previsão da estrutura fundamentando-se no princípio de que sequências evolutivas semelhantes possuem estruturas tridimensionais similares, pois conservam-se em maior grau do que a sequência de aminoácidos. Desse modo, realiza-se a seleção de um alvo conhecido e homólogo ao de interesse, no qual o grau de semelhança é diretamente proporcional a precisão do alvo previsto, e realiza-se a construção do modelo utilizando algoritmos de modelagem comparativa. Assim, o sucesso da modelagem por homologia vêm sendo bem documentado e continuamente mostrado no *Critical Assessment of Structure Prediction* (CASP), um experimento comunitário que visa avançar em métodos computação da estrutura 3D da proteína a partir da sequência de aminoácidos (KRYSHTAFOVYCH et al., 2021; LEELANANDA; LINDERT, 2016; MUHAMMED; AKI-YALCIN, 2019; SINGH, 2020).

2.3.1.2 Dinâmica molecular

A dinâmica molecular (DM) trata-se de uma técnica simulatória que visa estimar interações baseando-se nas propriedades estruturais, dinâmicas e termodinâmicas de um sistema molecular (SALO-AHEN et al., 2021).

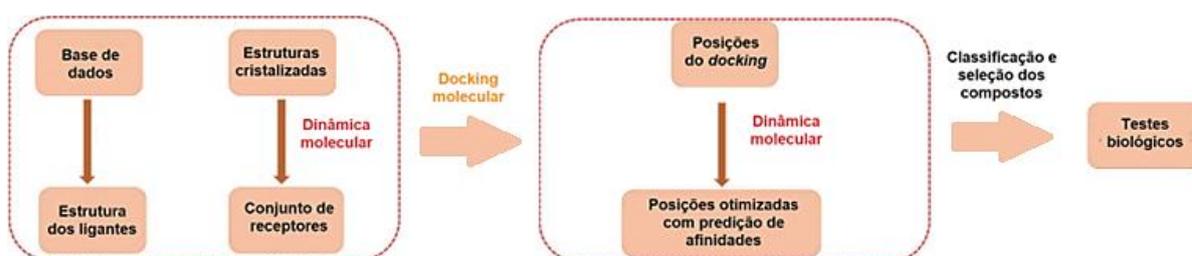
Inicialmente desenvolvida no início da década de 80, as simulações desenvolvidas por DM podem prever como cada átomo em uma proteína, ou em outro sistema molecular, irá se mover em função do tempo, utilizando de um modelo físico que rege as interações interatômicas, conforme as leis de Newton. Desse modo, diferentemente do *docking* molecular, a DM envolve a possibilidade de modificar a conformação do alvo, permitindo a formação de um modelo flexível e, conseqüentemente, mais fidedigno ao sistema biológico. Além da modificação conformacional, é possível observar: a formação de ligação entre os ligantes;

dobramento e agregação de proteínas ou peptídeos; comportamento frente alterações, como mutação, fosforilação, protonação, adição ou remoção de ligantes, entre outros (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018; LIU et al., 2018; SALSBURY, 2010).

Complementarmente, além de permitir identificar a posição dos átomos durante qualquer período de tempo durante a análise, também se apresenta como vantagem da DM a capacidade de controlar com precisão as variáveis do sistema, tais como: a conformação inicial da proteína, ligantes ligados a ela, presença de mutações ou modificações pós-traducionais, moléculas presentes no sistema, temperatura, pressão, pH, voltagem através da membrana, e assim por diante (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018).

Desse modo, a utilização dessa ferramenta apresenta vantagens desde a validação do alvo, até a otimização e obtenção de compostos *leads*. Assim, a abordagem em conjunto com o *docking* molecular têm se tornado cada vez mais comum e viável, especialmente após a realização da docagem a fim de otimizar as interações realizadas no complexo mais estável obtido. Segue na Figura 9 o fluxo de trabalho baseado na utilização de ambas as técnicas combinadas durante as etapas de planejamento e desenvolvimento de candidatos a fármacos (GANESAN; COOTE; BARAKAT, 2017; SALO-AHEN et al., 2021).

Figura 9 - Fluxograma de utilização de técnicas de modelagem molecular para obtenção de fármacos



Fonte: Adaptado de Liu et al. (2017).

2.3.1.3 Predição farmacocinética

Define-se farmacocinética como o estudo o curso do tempo da concentração do fármaco em diferentes fluídos e tecidos do corpo após sua administração, compreendendo as etapas de

absorção, distribuição, metabolismo e excreção, além da avaliação da toxicidade (ADMET) (ZHAI et al., 2020).

O estudo e o entendimento dos parâmetros avaliados por esse ramo são de essencial importância para a obtenção de fármacos eficientes e impactam significativamente o desenvolvimento de candidatos a fármacos, desde a seleção de *hits* até avaliação pré-clínica. Essa relevância é refletida no fato de que limitações na farmacocinética são uma das principais causas de falha nos últimos estágios do processo de desenvolvimento, estimando-se provocar remoção de aproximadamente 40-60% de compostos durante as fases pré-clínicas (HONORIO; MODA; ANDRICOPULO, 2013; SHAKER et al., 2021).

As avaliações farmacocinéticas tradicionais demandam recursos, tempo e questões éticas. Desse modo, devido aos avanços nos algoritmos de aprendizado de máquina e conjuntos de dados acumulados, as duas últimas décadas apresentaram o surgimento e evolução da predição dos perfis de ADMET, utilizando métodos computacionais. Assim, modelos matemáticos permitem a redução de dados farmacocinéticos à valores de parâmetros, fornecendo informações e compreensão sobre os processos ADMET e prevendo o resultado em diferentes cenários de dosagem (OTA; YAMASHITA, 2022; SHAKER et al., 2021; WANG et al., 2019; ZHAI et al., 2020).

Atualmente, esse serviço é disponibilizado *online* por meio de plataformas, tais como: PreADMET 2.0, ALOGPS 2.1, SwissADME, DrugMint, LightBBB, CardPred, ToxinPred, ProTox-II, ToxiPred, ADMETlab, pkCSM, Xenosite, entre outros (SHAKER et al., 2021). Desse modo, ao estabelecerem uma correlação entre a estrutura química do composto e propriedades de ADMET, esses modelos promovem a possibilidade de otimizar rapidamente parâmetros associados a farmacocinética (ex.: solubilidade, lipofilia, área de superfície polar, peso molecular, etc), alcançando vantagens a longo prazo ao, por consequência, aprimorar parâmetros clínicos, como meia-vida, estabilidade e eficácia terapêutica (HONORIO; MODA; ANDRICOPULO, 2013).

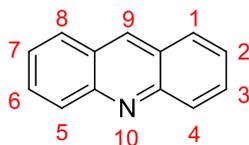
Em suma, a aplicabilidade e viabilidade desses métodos *in silico* se estende para uma variada gama de estruturas químicas, em especial para moléculas pequenas, a exemplo de compostos contendo um núcleo heterocíclico, que está presente em aproximadamente 90% dos fármacos sintéticos empregados na terapêutica. Dentre esses, destacam-se os compostos heterocíclicos nitrogenados, que correspondem a 95% dos fármacos heterocíclicos, com os núcleos indólico, quinolínico, acridínico, entre outros (BERNARDO; TONG, 2012; DAI et al.,

2017; MENEGATTI; FRAGA; BARREIRO, 2001; VITAKU; SMITH; NJARDARSON, 2014).

2.4 Derivados acridínicos

O núcleo acridínico, também denominado como 10-aza-antraceno, dibenzopiridina ou 2,3,5,6-dibenzopiridina, é um alcaloide do antraceno constituído por um sistema aromático tricíclico, com um átomo de nitrogênio contido no anel central (GONI et al., 2022; SILVA et al., 2022) (Figura 10).

Figura 10 - Estrutura química enumerada do núcleo acridínico



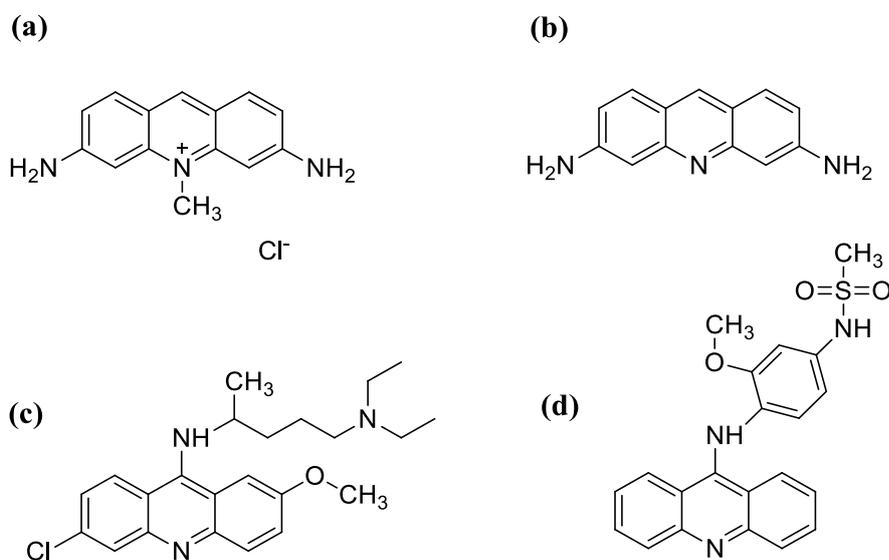
Fonte: Goni et al., 2022.

Compostos acridínicos vêm sendo estudados como agentes terapêuticos desde 1912, a partir da capacidade do composto isolado do carvão de alcatrão, acriflavina (Figura 11a), em desempenhar uma boa atividade tripanocida, reportada por Ehrlich e Benda. Esse composto, juntamente com seu derivado neutro e não-metilado, proflavina (Figura 11b), passaram a serem utilizados no tratamento antibacteriano durante a Primeira Guerra Mundial, permanecendo em destaque até o surgimento da penicilina. Complementarmente, um diferente derivado acridínico, a mepacrina (Figura 11c), foi posteriormente desenvolvido e introduzido como agente antimalárico durante a Segunda Guerra Mundial (KUMAR; KAUR; KUMARI, 2012; PONS et al., 2001; RUPAR et al., 2018; WAINWRIGHT, 2001).

Atualmente, o fármaco amsacrina (Figura 11d), um derivado 9-anilinoacridínico, é utilizado amplamente na clínica como antineoplásico, em particular no tratamento de leucemias linfocítica aguda refratária e não linfocíticas. Esse fármaco quimioterápico destaca-se por ter sido o primeiro a desempenhar o mecanismo de ação de veneno de topoisomerase II, no qual a molécula é responsável por estabilizar o complexo covalente enzima-DNA, que induzem a formação de intermediários nocivos para o metabolismo celular pelo aumento exacerbado de

sucessivas quebras nas fitas de DNA, induzindo eventos mutagênicos e apoptóticos (GOMES et al., 2022; JANGIR et al., 2012; KETRON et al., 2012). Adicionalmente, devido ao sistema poliaromático planar característico do anel acridínico, a amsacrina se intercala entre os pares de bases nitrogenadas de DNA (VENUGOPAL et al., 2022).

Figura 11 - Principais derivados acridínicos empregados na terapia farmacológica



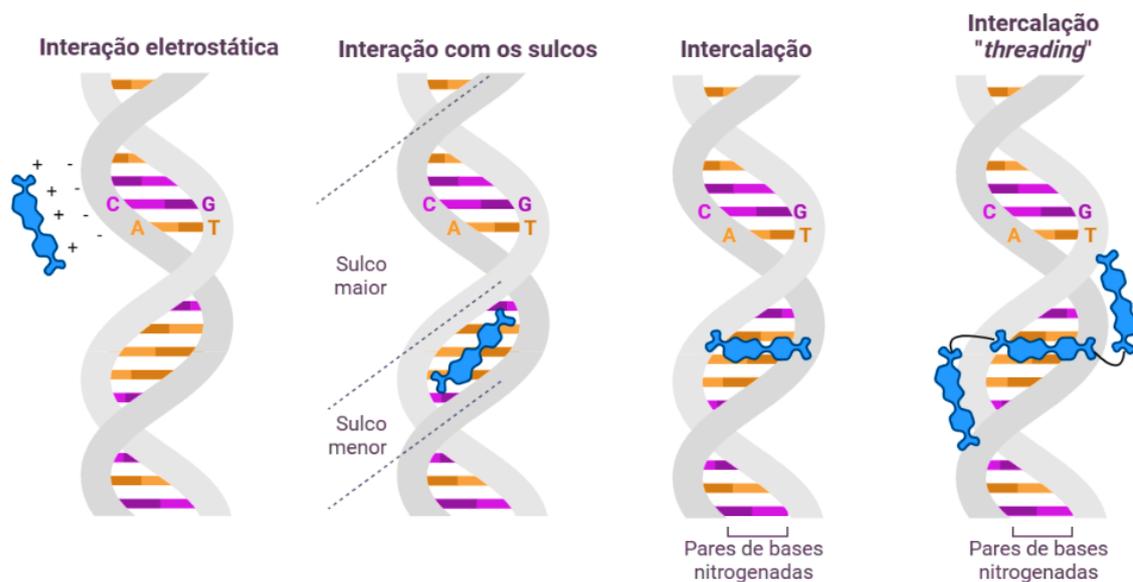
Fonte: Aatoria (2024). (a) acriflavina; (b) proflavina; (c) mepacrina; (d) amsacrina.

Desse modo, os derivados acridínicos são visados devido a sua potencialidade farmacológica para diversas finalidades, tais como anti-inflamatória (MALLU; THIRUMALAI; ASHARANI, 2017; SONDEHI et al., 2010), antitumoral (KUMAR; KUMAR; PRASAD, 2013; LANG et al., 2013), antibacteriana (GÜNDÜZ et al., 2019; KUDRYAVTSEVA et al., 2017), antiparasitária (AZIM et al., 2008; SANTELLI-ROUVIER et al., 2004; YU et al., 2012), antiviral (SUVEYZDIS et al., 2000; TONELLI et al., 2011), antifúngica (KAYA; YILDIRIR; ÇELIK, 2015; OLIVEIRA, et al., 2019), entre outros.

A investigação de compostos acridínicos com atividade quimioterápica apresenta maior destaque no campo de pesquisa devido aos mecanismos classicamente inerentes a estrutura do núcleo acridínico, a exemplo da interação com DNA.

Compostos que interagem com DNA são classicamente divididos em três categorias de acordo com o mecanismo desempenhado. São eles: (a) ligação ao DNA por meio de proteínas, como fatores de transcrição e polimerases; (b) ligação do RNA ao DNA, formando o híbrido RNA-DNA ou estruturas triplas de DNA; (c) ligação de compostos aromáticos ou heterocíclicos ao DNA por interação eletrostática, ligação covalente ou intercalação entre os pares de bases nitrogenadas (JOHARI-AHAR et al., 2023; SHI et al., 2019). Os derivados acridínicos encaixam-se na última categoria e caracterizam-se por interagir por ligações não-covalentes, que, por sua vez, podem subdividir-se em: (i) atrações eletrostáticas com o esqueleto aniônico fosfato-açúcar; (ii) interações com os sulcos menor ou maior do DNA; (iii) intercalação entre os pares de base pelo sulco maior ou menor do DNA; (iv) intercalação *threading* (Figura 12). Dentre esses, as acridinas comumente interagem com o DNA por intercalação entre as bases nitrogenadas ou por ligação aos sulcos (RESCIFINA et al., 2014).

Figura 12 - Interações reversíveis com o DNA



Fonte: Aatoria (2024).

A estrutura química de moléculas intercaladoras é classicamente caracterizada pela presença de anéis aromáticos fundidos entre si, e átomos com carga positiva inserido no anel e/ou como um substituinte de cadeia lateral (STREKOWSKI; WILSON, 2007). Desse modo, a intercalação ocorre pela inserção perpendicular da molécula entre os pares de bases de DNA, formando o complexo reversível DNA-intercalador estabilizado por interações de van der Waals, ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas e/ou transferência de carga, causando

uma modificação nos ângulos de torção entre os grupos açúcar-fosfato, e conseqüente alteração na topologia da macromolécula com resultante alongamento, enrijecimento e desenrolamento das hélices de DNA. Essas modificações estruturais promovem retardo ou inibição dos processos celulares, tais como a transcrição e replicação (FERGUSON; DENNY, 2007; IHMELS; OTTO, 2005; MARTINEZ; CHACON-GARCIA, 2005).

Em contrapartida, compostos que interagem com os sulcos caracterizam-se pela estrutura alifática e/ou aromática contendo grupamentos catiônicos que protonam em pH fisiológico, a exemplo de poliaminas, mitomicinas, distamicinas e ciclopropilindoles. A flexibilidade conformacional inerente a esses compostos permite a adaptação desses às curvaturas das hélices do DNA e estabilização da interação majoritariamente por forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, com as paredes do sulco e bases nitrogenadas, respectivamente. Diferentemente do mecanismo por intercalação, não há extensa alteração na conformação do DNA (ALMEIDA et al., 2017; SNYDER; HENDRY, 2005; STREKOWSKI; WILSON, 2007).

Nesse sentido, diante da notoriedade atribuída a potencialidade quimioterápica do núcleo acridínico, podemos ressaltar a relevância dos seus derivados como potenciais agentes leishmanicida e tripanocidas.

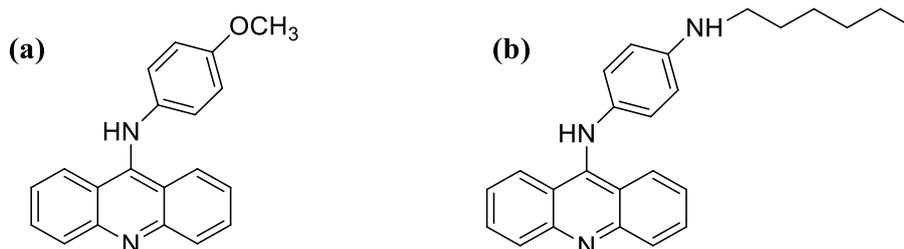
2.4.1 Derivados acridínicos com ação leishmanicida

O início da avaliação da atividade de derivados acridínicos contra espécies de *Leishmania sp.* é documentada a partir da última década no século 20, com a determinação do potencial leishmanicida *in vitro* frente formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. donovani*. O trabalho realizado por Werbovets e colaboradores (1992) selecionou compostos acridínicos conhecidos e inéditos com atividade estabelecida como inibidores de topoisomerase II, demonstrando valores de LD₉₀ abaixo de 25 µM para mepacrina (LD₉₀ = 2 µM frente *L. chagasi*) (Figura 8c) e derivados 9-aminoacridínicos, em especial o composto *p*-metóxfenil (LD₉₀ = 9 µM frente ambas cepas) (Figura 13a).

Semelhantemente, novos derivados 9-aminoacridínicos foram sintetizados e avaliados por Mauel e colaboradores (1993) frente cepas de *L. major*. Os compostos, em sua maioria, em concentrações iguais ou menores que 1 µM, demonstraram inibição no crescimento de macrófagos infectados com amastigotas de *L. major* acima de 80%, além de diminuir a viabilidade e motilidade do parasito. Dentre esses, o composto 1'-hexilamino-9-anilinoacridina

(Figura 13b) se destacou como um dos compostos mais ativos contra formas amastigostas livres e intracelulares, além de desempenhar baixa toxicidade frente células de Jurkat ($IC_{50} = 17 \mu M$), sugerindo boa seletividade ao parasito.

Figura 13 - Derivados 9-aminoacridínicos ativos contra *L. chagasi*, *L. donovani* e *L. major*.

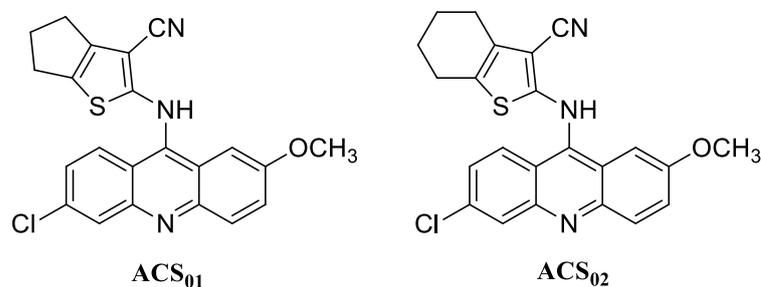


Fonte: Aatoria (2024). (a) derivado *p*-metóxfenil avaliado por Werbovets et al. (1992); (b) derivado 1'-hexilamino-9-anilinoacridina sintetizado por Mauel et al. (1993).

Esses resultados promissores impulsionaram a continuidade de estudos paralelos a fim de alcançar esse objetivo por diversos grupos de pesquisa, e são reportados nos trabalhos de Ahua et al. (2004), Astelbauer et al. (2011), Carole et al. (2005), Chibale et al. (2001), Gamage et al. (1997), Giorgio et al. (2003, 2007), Girault et al. (2000), Peniche et al. (2014), entre outros.

Mais recentemente, baseando-se na estrutura da mepacrina, 8 novos compostos híbridos tiofênicos-acridínicos foram sintetizados e avaliados frente formas promastigotas de *L. amazonensis* por Serafim e colaboradores (2018). Os resultados mostraram uma boa atividade antipromastigota dos compostos da série ACS, associado a um baixo índice de hemólise $> 1000 \mu M$, em especial os compostos ACS₀₁ e ACS₀₂ (Figura 14), cujo resultados foram superiores aos fármacos controle positivo (antimonais tri e pentavalentes), com valores de IC_{50} de $9,60 \pm 3,19$ e $10,95 \pm 3,96 \mu M$, respectivamente. Esses compostos foram posteriormente avaliados em cepas de *L. amazonensis* resistentes a antimoniais, demonstrando resultados relativamente maior que os anteriores, com os respectivos valores de IC_{50} de $14,83 \pm 0,44$ e $16,36 \pm 1,7 \mu M$. Adicionalmente, avaliou-se o possível mecanismo de ação desses compostos pela interação com DNA por espectroscopia de ultravioleta, no qual ambos apresentaram constante de ligação de $10^{-4} M$, característico de compostos intercalantes.

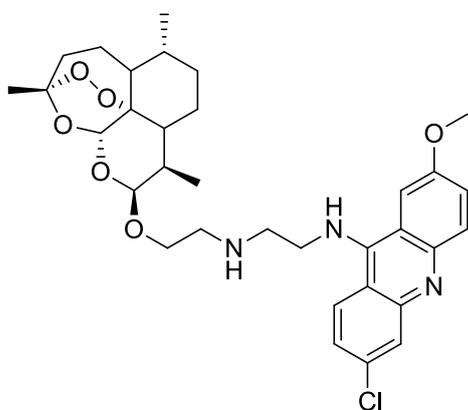
Figura 14 - Compostos híbridos tiofênicos-acridínicos



Fonte: Serafim et al. (2018).

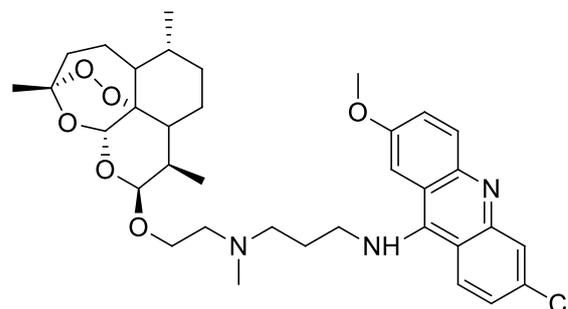
Aucamp e colaboradores (2020) desenvolveram um trabalho baseando-se na potencialidade antiparasitária de derivados da artemisina hibridizados com o núcleo acridínico. Esses compostos, juntamente com derivados acridínicos intermediários, foram avaliados *in vitro* frente três cepas promastigotas de *Leishmania*: duas de *L. donovani* e uma de *L. major*. Os derivados de acridina sintetizados (intermediários e híbridos) foram considerados ativos contra todas as três cepas, com valores de IC₅₀ na ordem de micromolar e sub-micromolar. No entanto, esses não apresentaram um índice de seletividade desejável (SI < 10) para o parasito quando avaliada toxicidade em células de ovário de hamster chinês. Entretanto, é dado destaque aos compostos 19 e 20 (Figura 15), os quais apresentaram valores de IC₅₀ < 0,40 µM para todas cepas, e índices de seletividade acima do que apresentado pelas artemisinas utilizadas como fármacos de referência (di-hidroartemisina, arteméter, artesunato, anfotericina B e emetina).

Figura 15 - Compostos híbridos artemisínicos-acridínicos



19

L. donovani 1S: IC₅₀ = 0,38 uM. SI = 4.
L. donovani 9515: IC₅₀ = 0,32 uM. SI = 5.
L. major: IC₅₀ = 0,29 uM. SI = 6.



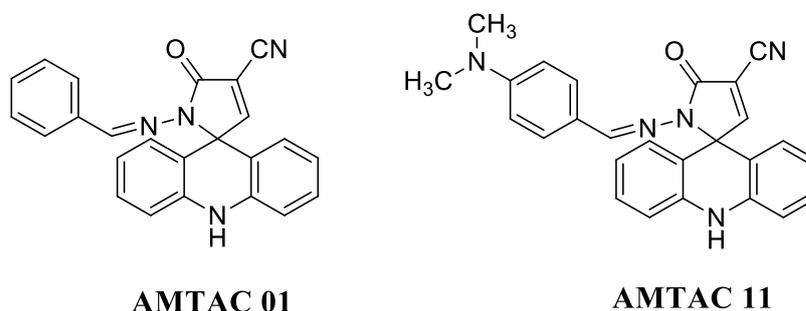
20

L. donovani 1S: IC₅₀ = 0,37 uM. SI = 3.
L. donovani 9515: IC₅₀ = 0,17 uM. SI = 7.
L. major: IC₅₀ = 0,23 uM. SI = 5.

Fonte: Aucamp, Zuma (2020).

Por fim, Almeida e colaboradores (2021) avaliaram a atividade de compostos espiro-acridínicos, previamente sintetizados e investigados quanto a ação antitumoral por Almeida et al. (2016) e Gouveia et al. (2018). A análise *in vitro* frente formas promastigotas de *L. infantum* demonstrou a potência dos compostos AMTAC 01 e 11 (Figura 16), com valores de IC₅₀ de 2,039 e 1,109 µg mL⁻¹, respectivamente. Esses foram selecionados e avaliados sob as formas amastigotas, no qual o AMTAC 11 demonstrou um ótimo desempenho ao ser capaz de inibir o crescimento do parasito 33,2% a mais que o composto de controle (anfotericina B). Esse derivado espiro-acridínico apresentou o EC₅₀ de 0,974 µg mL⁻¹, e não toxicidade as células PBMC (>100 µg mL⁻¹), resultando em um índice de seletividade acima de 102,67.

Figura 16 - Derivados espiro-acridínicos ativos contra *L. infantum*

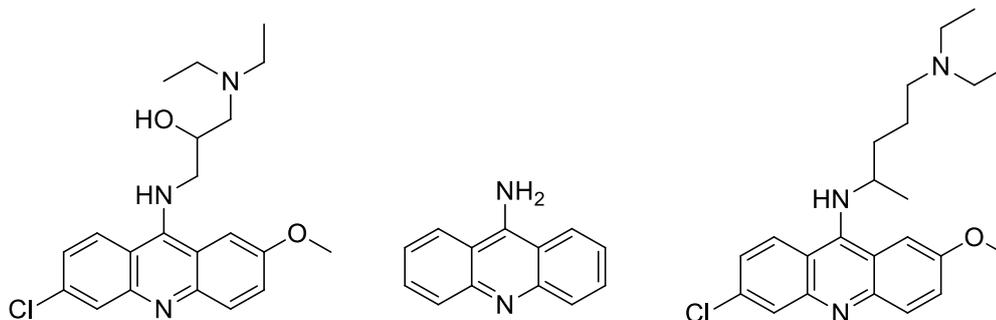


Fonte: Almeida et al. (2021).

2.4.2 Derivados acridínicos com ação tripanocida

Relatos na literatura relacionados a estudos envolvendo a avaliação de derivados acridínicos frente *T. cruzi* são escassos. Inicialmente, foram avaliadas a potencialidade tripanocida de fármacos acridínicos já estabelecidos, visando reposicioná-los para essa finalidade. Desse modo, Hammond, Hogg e Gutteridge (1985) avaliaram a atividade dos compostos acranil, aminacrina e mepacrina (Figura 17) frente formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* por microscopia ótica e microscopia de fluorescência. Não foram estabelecidos valores de IC₅₀, porém observou-se, para os três compostos, a capacidade de alterar a morfologia e quantidade de parasitos em diferentes concentrações (10^{-3} , $2,5 \times 10^{-4}$, $6,2 \times 10^{-5}$ e $1,5 \times 10^{-5}$ M).

Figura 17 – Fármacos acridínicos acranil, aminacrina e mepacrina, respectivamente.

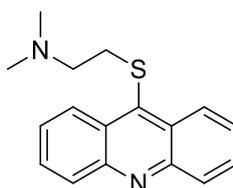


Fonte: Hammond, Hogg, Gutteridge (1985).

Para as formas tripomastigotas, nas diferentes concentrações, observou-se a capacidade de extinguir os parasitos, diminuir a quantidade de protozoários em relação ao controle e deformar sua morfologia. Enquanto que, para as formas epimastigotas, os três fármacos desempenharam atividades iguais nas concentrações avaliadas, nos quais se observou a presença de organismos mortos nas concentrações de 10^{-3} e $2,5 \times 10^{-4}$ M. Posteriormente, avaliou-se o efeito nos níveis de nucleotídeos de adenina e ácido 2,3-difosfoglicérico em glóbulos vermelhos humanos nas mesmas concentrações anteriormente utilizadas, demonstrando valores semelhantes ao controle negativo (ausência de fármaco), indicando mínima interação com células do hospedeiro. Subsequentemente, Jacoby e colaboradores (1996) observaram também a capacidade da mepacrina em inibir tripanotona redutase, uma importante enzima para sobrevivência do parasito.

A partir desses resultados, Osuna e colaboradores (1988) sintetizaram 23 novos derivados acridínicos e os avaliaram *in vitro* frente formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* nas concentrações de 1 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados demonstraram o perfil tripanocida dos compostos, destacando-se o composto 4e (2-(acridin-9-iltio)-*N,N*-dimetiletanamina, figura 18), que em ambas concentrações inibiu em 100% o crescimento e motilidade do *T. cruzi*, e não apresentou toxicidade em células HeLa. Esses resultados foram mais promissores que o fármaco nifurtimox, que apresentou entre 70-99% de inibição do crescimento na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de 1-39% na concentração $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 18 - Derivado 2-(acridin-9-iltio)-*N,N*-dimetiletanamina

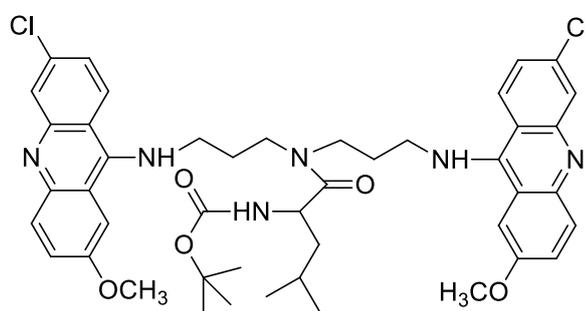


Fonte: Osuna et al. (1988).

Nos estudos realizados por Girault e colaboradores (2000), avaliou-se o efeito antiparasitário *in vitro* de bis-acridinas. Os resultados sob formas amastigotas de *T. cruzi* demonstraram bons índices de atividade anti-amastigota para os compostos 13, 15 e 16 na menor concentração testada ($1,56 \mu\text{M}$) de 60, 40 e 70% de inibição no crescimento, respectivamente.

Dentre esses, destaca-se o composto 16 (Figura 19) como mais promissor da série, devido a inibição de 90% do crescimento apresentado na concentração de 3,13 μM , e menor citotoxicidade frente células MRC-5 em relação aos demais compostos, apresentando, na concentração de 3,13 μM , 43% de citotoxicidade. Entretanto, os resultados não foram superiores ao do composto controle, o benzonidazol, que apresentou o IC_{50} mensurado de 3130 nM e $\text{CC}_{50} > 50 \mu\text{M}$.

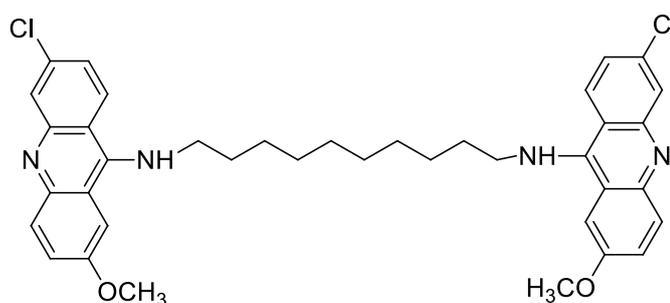
Figura 19 - Derivado bis-acridínico 16



Fonte: Girault et al. (2000).

Similarmente, derivados bis-acridínicos foram avaliados contra amastigotas de *T. cruzi* e macrófagos J774 por Caffrey e coautores (2007). Entretanto, apenas um dos compostos (derivado 15, figura 20) apresentou atividade, considerada intermediária, na concentração de 10 μM . Todas as bis-acridinas foram ineficazes em 5 μM , e o composto 3 foi diretamente citotóxico para os macrófagos.

Figura 20 - Composto bis-acridínico 15 ativo frente *T. cruzi*



Fonte: Caffrey et al. (2007).

Mais recentemente, Manchester e colaboradores (2013) avaliaram o efeito da acriflavina (Figura 11a) em formas epimastigotas de *T. cruzi* e os resultados obtidos pelo grupo demonstraram que, nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o composto reduziu a proliferação celular em 5, 14, 40 e 55%, respectivamente, após 48 horas de tratamento. Adicionalmente, observou-se alteração no DNA do cinetoplasto a partir da menor concentração avaliada (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Em concentrações mais altas, dentre as alterações observadas, constatou-se que o cinetoplasto perdeu sua estrutura normal em forma de disco, e o arranjo fibrilar foi transformado em uma massa compacta e amorfa dentro da mitocôndria.

Logo, mesmo diante de poucas pesquisas que investiguem essa temática, são observados resultados promissores que podem sugerir um potencial inerente ao núcleo acridínico.

Portanto, considerando o núcleo acridínico como um promissor *scaffold* para o desenvolvimento de compostos ativos contra parasitos da família Trypanosomatidae, esse trabalho objetivou a o planejamento, a síntese e avaliação farmacológica de derivados acridínicos, abordando, por meio de dois capítulos, a investigação do potencial de um núcleo inédito e a investigação da atividade antiparasitária de compostos espiro-acridínicos conhecidos, a fim de obter compostos leishmanicidas e tripanocidas potentes e eficazes.

3 CAPÍTULO 1 – SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DE UM DERIVADO TRIAZOLIDÍNICO-ACRIDÍNICO

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivos gerais

Sintetizar um derivado acridínico e avaliar sua atividade antileishmania *in vitro*, determinar mecanismos de ação responsáveis pela possível ação farmacológica *in silico* e *in vitro*.

3.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse estudo envolverão:

- a) Sintetizar os compostos intermediário e composto final;
- b) Avaliar a atividade leishmanicida do composto final frente formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- c) Determinar a citotoxicidade em macrófagos J774 por ensaio de MTT e citometria de fluxo;
- d) Avaliar o efeito microbicida em macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*;
- e) Analisar a capacidade do composto em alterar a produção de citocinas pelos macrófagos;
- f) Determinar a influência na produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio;
- g) Desenvolver um estudo teórico de possíveis mecanismos de ação *in silico* por *docking* molecular, dinâmica molecular e MM-PBSA.

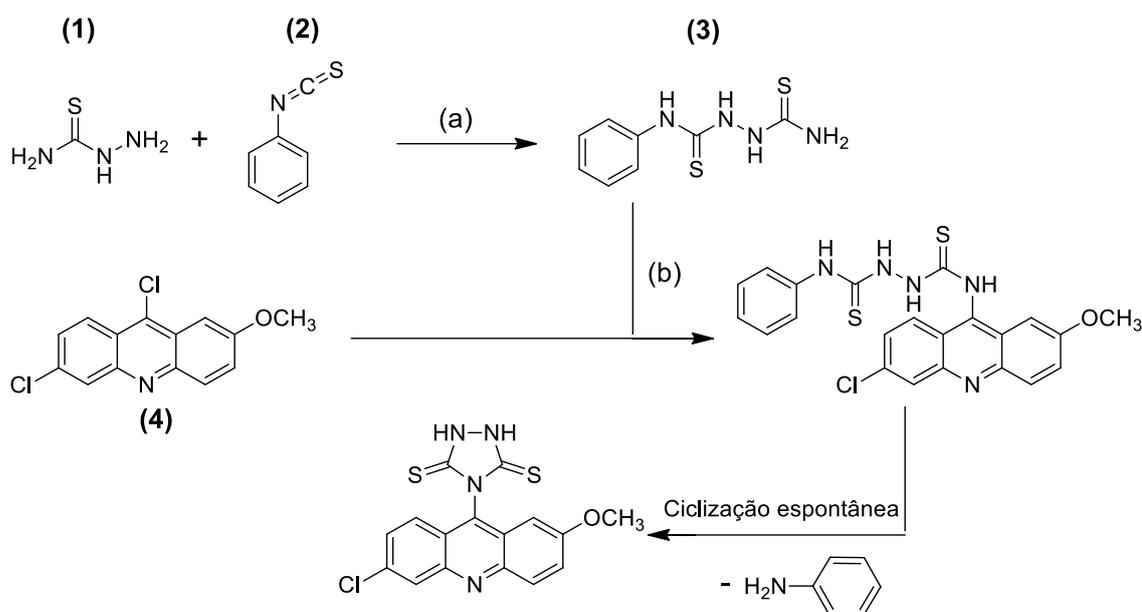
3.2 Metodologia

3.2.1 Síntese do composto acridínico

O composto acridínico proposto havia sido anteriormente desenvolvido pelo grupo de estudos do Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos da Universidade Estadual da Paraíba. A síntese, caracterização físico-química e estrutural estão descritas no trabalho de Moura (2019).

A rota sintética empregada para obtenção do derivado triazolidínico-acridínico foi uma via plena linear. A obtenção do intermediário *N*-fenilhidrazina-carbiotiamina (3) ocorreu pela reação nucleofílica de adição entre os produtos de partida tiossemicarbazida (1) e fenilisotiocianato (2), em meio etanólico a 50 °C. A partir desse composto, realizou-se a reação com o núcleo 6,9-dicloro-2-metóxi-acridina (4) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) por meio de uma reação de substituição nucleofílica aromática, em meio etanólico e ácido, em temperatura de refluxo (78 °C), obtendo-se o composto final que, por sua vez, realiza uma ciclização espontânea resultando em um derivado triazolidínico-acridínico (ACW-02) (Esquema 1).

Esquema 1 - Esquema geral de síntese do derivado ACW-02



Fonte: Aatoria (2024). (a) EtOH, 50 °C; (b) EtOH, HCl, 78 °C.

3.2.1.1 Procedimento de síntese do intermediário N-fenilhidrazina-carbiotiamida

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, adicionou-se 0,2000 g de tiossemicarbazida e 0,3000 g de fenilisotiocianato (equivalência molar 1:1), em 10 mL de etanol. O sistema reacional foi deixado em agitação, a uma temperatura de 50° C, durante aproximadamente 1 hora. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). Após a finalização, a precipitação do produto foi promovida pela adição de etanol gelado ao sistema. O precipitado do produto foi filtrado e lavado com etanol gelado.

3.2.1.2 Procedimento de síntese do composto final 4-(6-cloro-2-metóxiacridin-9-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-ditiona (ACW-02)

A síntese do composto triazolidínico-acridínico foi realizada em um balão de fundo redondo, de 100 mL, partindo de 0,2000 g do núcleo 6,9-dicloro-2-metóxi-acridina e 0,1630 g do intermediário carbotioamida, obtido na etapa anterior (equivalência molar 1:1). Ao balão, adicionou-se 8 mL de etanol e 2 gotas de HCl, deixando o sistema reacional em agitação magnética e a temperatura de refluxo do solvente (78 °C), durante aproximadamente 1 hora. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). Após a finalização, a precipitação do produto final foi promovida pela adição de água destilada gelada. O precipitado foi filtrado e subsequentemente lavado com água destilada gelada. A fim de obter o composto com maior pureza, após a secagem esse foi recristalizado em solução de etanol.

3.2.2 Avaliação da atividade antileishmania

3.2.2.1 Cultivo das culturas de L. amazonensis

As culturas de amastigotas da linhagem MHOM/BR/pH8 de *L. amazonensis* foram mantidas em criopreservação até serem transferidas para meio de cultura NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) e cultivadas a 26 °C até que os parasitos atingissem a fase de crescimento logarítmico. Em seguida, a suspensão foi transferida para meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 0,2% de sulfato de gentamicina, a 26 °C, para que os parasitos voltassem à fase logarítmica de

crescimento. Após essa etapa, as formas promastigotas foram incubadas a 37 °C, produzindo uma curva de crescimento e a formação das cepas axênicas de amastigotas.

As formas promastigotas da cepa MHOM/BR/pH8 de *L. amazonensis* foram preservadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de estreptomicina/penicilina, a 26 °C, em incubadora B.O.D – J. Prolab, modelo JP. 100 (LBCM/CPAM). As formas promastigotas foram utilizadas na fase de crescimento exponencial em todas as etapas do experimento.

3.2.2.2 Avaliação da atividade anti-amastigota

A determinação da concentração inibitória do composto sintetizado capaz de eliminar 50% dos parasitos em culturas de amastigotas de *L. amazonensis* (IC₅₀) foi realizada por meio da utilização do método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (Sigma-Aldrich). Em uma placa de 96 poços, o composto foi diluído nas seguintes concentrações: 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 µg mL⁻¹. Paralelamente, 2,0x10⁵ amastigotas axênicas foram distribuídos por poço. As placas foram incubadas por 24 h, a 37 °C, com 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados 10 µL do reagente MTT por poço e as culturas foram reincubadas por um período de 4 h. Posteriormente, após o tempo de incubação, 50 µL de DMSO foram adicionados a cada poço para a solubilização dos cristais de formazan. As absorbâncias foram lidas em um espectrofotômetro de placa SpectraMAX GeminiXS ® (Molecular Devices LLC) em um comprimento de onda de 570 nm. Como controle positivo, utilizou-se o fármaco comercial Anfotericina B®.

3.2.2.3 Avaliação da atividade anti-promastigota

A metodologia para avaliação da atividade anti-promastigota em cepas de *L. amazonensis* baseou-se na contagem em câmara de Neubauer. Formas promastigotas na fase de crescimento logarítmico foram coletados, contados e diluídos em meio Schneider (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), suplementado com 20% FBS, na concentração de 1x10⁶ células mL⁻¹. Posteriormente, as células foram incubadas com diferentes concentrações do composto (10; 5; 2,5, 1,25; e 0,625 µg mL⁻¹). O controle negativo consistiu de células incubadas apenas em meio Schneider, enquanto o controle positivo compreendeu o uso do medicamento comercial Anfotericina B®. O crescimento da cultura foi observado após 72 horas de incubação a 25 °C

por contagem de células viáveis usando uma câmara de Neubauer e calculado usando a seguinte equação (1):

$$\text{No. } Leishmania/mL = \text{No. de células contadas} \times \text{No. de quadrantes da câmara de Neubauer} \times \text{diluição usada} \times 10^4$$

(fator de correção da câmara de Neubauer) (1)

A concentração que inibe 50% do crescimento do parasito (IC₅₀) foi o parâmetro utilizado para estimar a inibição do crescimento. Portanto, a IC₅₀ foi determinada após 72 horas de cultivo por análise de regressão linear com o *software* SPSS 8.0 para Windows. Cada teste foi realizado em 2 experimentos independentes, com diferentes culturas, e em triplicata.

3.2.3 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos

3.2.3.1 Cultivo das culturas de macrófago J774A.1

O cultivo de macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) foi mantido sob criopreservação. O processo de descongelamento iniciou-se com a transferência do conteúdo criopreservado para um tubo Falcon contendo 5 mL de meio de cultura DMEM (Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, além de 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de sulfato de gentamicina. O tubo foi centrifugado, as células foram ressuspensas e transferidas para um frasco de cultura mantido em incubadora a 37 °C com 5% de CO₂.

3.2.3.2 Avaliação do efeito citotóxico pelo método do MTT

A avaliação da citotoxicidade do composto sintetizado sobre os macrófagos seguiu a mesma metodologia previamente exposta no tópico “3.2.2.3 Avaliação da atividade antipromastigota”. Para esse experimento, em específico, foram distribuídos macrófagos na concentração 1,0x10⁵ por poço e, após a adição de todos componentes, a placa foi encubada durante 2 horas. Após essa etapa, o experimento se segue conforme anteriormente descrito.

3.2.3.2 Avaliação do efeito citotóxico por citometria de fluxo

O ensaio de citotoxicidade em macrófagos JJ74 A.1 foi realizado pelo método de dupla coloração de Anexina V-FITC/PI por citômetro de fluxo BD LSR For-tessa™ ®. As análises ocorreram em placas de 96 poços, distribuindo-se 4×10^4 macrófagos por poço, com adição da molécula nas concentrações de 1, 16 e $32 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estes foram incubados em meio DMEM ® por duas horas, a 37°C , com 5% de CO_2 . Posteriormente, $2 \mu\text{L}$ de anexina + $2 \mu\text{L}$ de PI foram adicionados a cada poço, seguidos de dez minutos de incubação. Por fim, as placas foram centrifugadas, com a retirada de $100 \mu\text{L}$ do sobrenadante e a adição de $200 \mu\text{L}$ de soro fisiológico. As células ativadas por fluorescência foram analisadas em um citômetro de fluxo. As análises foram realizadas em sextuplicata.

3.2.4 Avaliação do efeito microbicida

As células de macrófagos J774A.1 foram quantificadas e distribuídas ($1,5 \times 10^5$ células/poço) em uma placa de 24 poços, em meio DMEM, acrescentando-se lamínulas previamente lavadas em cada poço para promover a adesão celular. As células foram incubadas durante duas horas, a 37°C , com 5% de CO_2 . Após ao processo de adesão celular, os poços foram lavados com solução tampão fosfato pH 7,2; 37°C , seguido da adição das formas amastigotas de *L. amazonensis* ($1,5 \times 10^6$ /poço). Para promover a infecção dos macrófagos, estes foram incubados por 12 horas, a 37°C , com 5% de CO_2 , em meio DMEM acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB).

Para remover as leishmanias não fagocitadas, os poços foram lavados três vezes com FTS estéril a 37°C . A molécula foi então adicionada nas concentrações mencionadas anteriormente e a placa foi novamente incubada durante um período de tratamento de duas horas. Por fim, o meio excedente foi removido, os poços foram expostos à secagem e fixados em metanol, sendo posteriormente corados com solução de Giemsa 10% e avaliados por microscopia óptica (1000x).

O efeito microbicida foi avaliado pela determinação da infecção em 200 macrófagos, sendo expresso como produto da média de leishmanias fagocitadas pela porcentagem de macrófagos infectados. Para determinar a porcentagem estimada de macrófagos aderidos às lamínulas, as células presentes em 10% das lamínulas foram quantificadas com auxílio de microscopia óptica (400x).

3.2.5 *Análise da produção de citocinas por macrófagos*

A quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF- α foi realizada no sobrenadante de culturas celulares de macrófagos J774A.1 infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, por citometria de esferas (CBA), de acordo com as instruções do fabricante (BD Bioscience). Macrófagos foram aderidos a uma placa, infectados com *L. amazonensis* e tratados com o composto em análise nas concentrações de 2, 4 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Macrófagos não infectados e não tratados foram usados como controle negativo, enquanto os macrófagos não tratados infectados com *L. amazonensis* foram usados como controle positivo.

Após o período de tratamento de 24 horas, 50 μL do sobrenadante de cada poço foi transferido para um tubo cônico, seguido pela adição de 50 μL da mistura de *beads* de captura e 50 μL do reagente de detecção. Uma curva de calibração contendo as seguintes concentrações de cada citocina foi adicionada ao experimento: 0 pg mL^{-1} , 20 pg mL^{-1} , 40 pg mL^{-1} , 80 pg mL^{-1} , 156 pg mL^{-1} , 312,5 pg mL^{-1} , 625 pg mL^{-1} , 1250 pg mL^{-1} , 2500 pg mL^{-1} e 5000 pg mL^{-1} . A intensidade da fluorescência em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA usando o programa DIVA versão 7 (BD Bioscience) e os dados de fluorescência foram processados usando o programa FCAP array versão 3 (BD Bioscience). As experiências foram realizadas em triplicata.

3.2.6 *Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio*

A quantificação de EROs e ERNs foi realizada utilizando a sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF-DA) e diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM diacetato), que produzem, na presença de espécies reativas, 2,7-diclorofluoresceína (DCF) e 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM), respectivamente, que apresentam fluorescência e permanecem no interior da célula.

Os macrófagos foram aderidos a uma placa infectada com *L. amazonensis* e tratados com o composto em análise nas concentrações de 2, 4 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Macrófagos não infectados e não tratados foram usados como controle negativo, enquanto os macrófagos não tratados infectados com *L. amazonensis* foram usados como controle positivo. Após o período de tratamento de 24 horas, as placas foram incubadas por 30 minutos com a sonda DCF-DA diluída em solução salina pH 7,2 e 1 hora com a sonda DAF-FM diacetato diluída em solução salina pH 7,2, respectivamente, em câmara úmida a 37 °C com 5% de CO₂, protegida da luz. Em

seguida, as células foram lavadas com soro fisiológico, pH 7,2, à temperatura ambiente e ressuspensas com 200 µL de soro fisiológico nas mesmas condições.

A intensidade de fluorescência em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA usando o programa DIVA versão 7 (BD Bioscience) e a intensidade média de fluorescência (MFI) foi obtida após processar os dados no FlowJo™ versão 10.6.1. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram calculados como a diferença de MFI em cada grupo.

3.2.7 *Análise estatística*

A normalidade das variáveis foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Teste t pareado ou Wilcoxon foram usados para comparar duas amostras normais ou não normais, respectivamente. Para comparações múltiplas, foi empregado o teste ANOVA, para dados paramétricos ou não paramétricos, respectivamente. As análises e representações gráficas foram realizadas no programa Prism® Software Package (GraphPad®, EUA, 1997). As diferenças foram consideradas significativas com valor de $p < 0,05$.

3.2.8 *Estudos in silico*

3.2.8.1 *Modelagem por homologia*

Por não haver estrutura cristalográfica da cisteína protease B de *Leishmania amazonensis* (CPBLa), optou-se por realizar uma modelagem por homologia e assim construir o modelo semelhante a outros trabalhos (FREITAS et al., 2018; SCHRÖDER et al., 2013). Inicialmente, a sequência de aminoácidos necessária para a cisteína protease foi obtida do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information Search* (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (PRUITT; TATUSOVA; MAGLOTT, 2007), sob o código AAP21894, composto por 353 aminoácidos. Em seguida, foi realizada uma busca por proteínas com identidade estrutural usando o servidor de ferramentas de busca de alinhamento local básico (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (CAMACHO et al., 2009). Assim, a busca revelou 100 sequências homólogas, sendo que a de melhor alinhamento foi com a cruzaina de *T. cruzi* (PDB ID: 1AIM) (GILLMOR; CRAIK; FLETTERICK, 1997), utilizada como *template*. O modelo foi então construído utilizando o *Swiss-Model web software*

(<https://swissmodel.expasy.org/>) (SCHWEDE, 2003) e validado através do gráfico Ramachandran gerado pelo *web software* SAVES (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) (LASKOWSKI et al., 1993). O modelo desenvolvido foi alinhado com o PDB original (1AIM) por meio do *software* PyMol, e o valor do desvio médio quadrado médio (RMSD) foi calculado para a validação final do modelo.

3.2.8.2 *Docking molecular*

A estruturas de alvo estudadas foram primeiramente tratadas com base na teoria semi-empírica no nível PM6 utilizando o *software* Spartan 14. Depois de otimizadas, foram submetidas ao estudo de *docking* molecular através do programa Gold 5.8.1. A estrutura do decâmero (PDB ID: 1Z3F) foi usada como modelo de DNA. Tripanotiona redutase de *L. infantum* (PDB ID: 4APN), topoisomerase I de *L. donovani* (PDB ID: 2B9S) e 14 -alfa-éster desmetilase de *L. infantum* (PDB ID: 3L4D) foram selecionados e obtidos do *Protein Data Bank* (PDB), levando-se em consideração a homologia entre a sequência genética das espécies *L. amazonensis*, *L. donovani* e *L. infantum* (ALMEIDA et al., 2021; BAIOTTO et al., 2013; CANALS et al., 2005; DAVIES et al., 2006; HARGROVE et al., 2011; TSCHOEKE et al., 2014). Para validar o estudo, foram realizados *redockings* para alvos com ligantes cocristalizados. O receptor foi tratado como uma molécula rígida, enquanto os ligantes foram tratados como flexíveis. Os resultados do *docking* foram analisados, de modo que as interações intermoleculares foram utilizadas como parâmetros para medir a energia de afinidade do composto em análise com o alvo (*score*). O confôrmero com maior pontuação foi avaliado pelo programa Pymol 2.3.2, analisando-se a distância e o tipo de conexão estabelecidas com o receptor (ALMEIDA et al., 2021).

3.2.8.3 *Simulação de dinâmica molecular*

Os complexos de ACW-02 com TryR, Topo I, CYP51 e CPBLa obtidos por meio do *docking* molecular foram utilizados em simulações de dinâmica molecular por intermédio do *software* GROMACS®. Assim, as moléculas de água foram removidas, enquanto cargas e hidrogênios foram adicionados usando a ferramenta DockPrep do *software* Chimera®. Em seguida, foi empregado o campo de força CHARMM36, seguido do método de solvatação TIP3P. Topologias de ligantes foram geradas pelo *web software* SwissParam (<http://www.swissparam.ch/>) (ZOETE et al., 2011). Assim, foi criada uma caixa cúbica de 1

nm, adicionando água e íons na concentração fisiológica (0,15M). O sistema foi inicialmente equilibrado em 10.000 passos pelo método do gradiente conjugado, seguido da minimização total do sistema em 20.000 passos. Em seguida, foram realizados balanços NVT (número constante de partículas, volume e temperatura) e NPT (número constante de partículas, pressão e temperatura), a uma temperatura de 300 K, durante 10 ns. Por fim, foram executadas as simulações de 100 ns. Os gráficos do desvio quadrático médio (RMSD), flutuação quadrática média (RMSF), raio de giro (Rg) e ligação hidrogênio foram gerados usando o *software* Xmgrace®.

3.2.8.4 Cálculo de mecânica molecular/área de superfície de Poisson-Boltzmann

O método de mecânica molecular/área de superfície de Poisson-Boltzmann (MM-PBSA) calcula a energia das interações entre um ligante e uma macromolécula. Esses cálculos são geralmente aplicados em triagens virtuais de alto rendimento para reduzir falsos positivos (KUMARI; KUMAR; LYNN, 2014). Assim, este método calcula a energia livre de Gibbs ($\Delta G_{\text{binding}}$) com base em energias de van der Waals e interações eletrostáticas (não ligadas) entre o ligante e seu receptor durante uma simulação de dinâmica molecular (SARMA; MATTAPARTHI, 2019). O $\Delta G_{\text{binding}}$ é calculado pela diferença entre a energia livre do complexo proteína-ligante (G_{cpx}) e proteína não ligada e ligante (G_{rec}). Finalmente, o $\Delta G_{\text{binding}}$ foi considerado como a soma das mudanças na entropia de solvatação ($-T\Delta S_{\text{sol}}$), energia de ligação (ΔE_{bind}) e entropia conformacional ($-T\Delta S_{\text{conf}}$), conforme mostrado na equação 2 (WANG et al., 2019). Os cálculos de MM-PBSA foram realizados usando a ferramenta *g_mmpbsa* (KUMARI; KUMAR; LYNN, 2014) através dos arquivos de trajetória obtidos após a simulação de dinâmica molecular usando o *software* GROMACS®. Em seguida, os valores de $\Delta G_{\text{binding}}$ foram determinados como a média das energias de interação livre e solvatação.

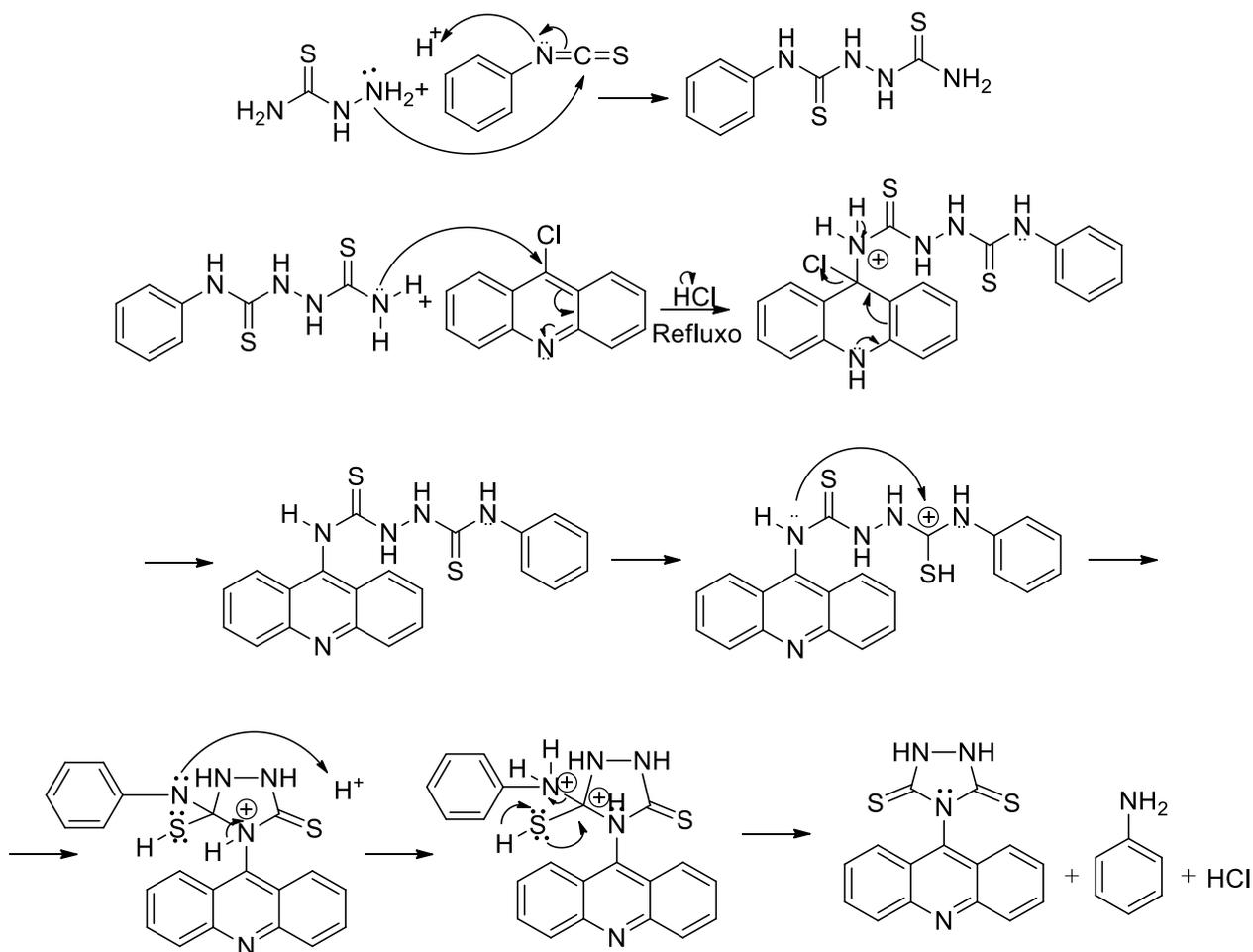
$$\Delta G_{\text{binding}} = E_{\text{binding}} - T\Delta S_{\text{sol}} - T\Delta S_{\text{conf}} \quad (2)$$

3.3 Resultados e discussões

3.3.1 Obtenção do derivado triazolidínico-acridínico

O composto sintetizado foi previamente descrito e caracterizado físico-química e estruturalmente por Moura (2019), identificado em seu trabalho como ACW-02B. A obtenção desse derivado ocorreu por uma ciclização espontânea causada por um ataque nucleofílico intramolecular com subsequente fragmentação da porção anilínica da subunidade carbotoioamida, favorecida pela energia cinética e térmica provida ao sistema reacional e a presença de prótons livres advindos do catalisador ácido utilizado. Esse processo originou o núcleo triazolidínico-ditiona ligado ao anel acridínico, estrutura ainda não descrita na literatura. Para melhor compreensão do mecanismo reacional, segue o esquema 2.

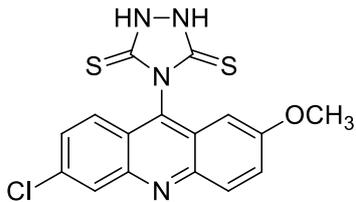
Esquema 2 – Mecanismo reacional para obtenção do composto ACW-02



Fonte: Moura (2019).

As características físico-químicas e estruturais desse composto foram determinadas por Moura (2019). Assim, seguem os dados na tabela 1 conforme apresentados pelo autor.

Tabela 1 - Características físico-químicas e estruturais do derivado ACW-02

Parâmetro	Características do ACW-02
<i>Estrutura molecular</i>	
<i>Nome químico</i>	4-(6-cloro-2-metóxiacridin-9-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-ditiona
<i>Fórmula molecular</i>	C ₁₆ H ₁₁ ClN ₄ OS ₂
<i>Massa molecular</i>	374,8610 g mol ⁻¹
<i>Aparência física</i>	Sólido laranja
<i>Fator de retenção</i>	0,50 – Hexano/Acetato de Etila (7:3)
<i>Rendimento reacional</i>	50%
<i>Faixa de fusão</i>	282-284 °C
<i>Log P</i>	4,76
<i>Espectroscopia de Infravermelho (KBr, cm⁻¹)</i>	3242-3147 (N-H); 3085-3056 (C-H _{Ar}); 1621-1482 (C=C _{Ar}); 1482 (N-C=S); 1208 (C=S); 1197 (C=C-O)
<i>Espectrometria de massas (m/z)</i>	376.0033 (32.0%), 375.0096 (17.3%)
<i>Espectroscopia de ressonância magnética de hidrogênio (300 MHz, DMSO-d₆, ppm)</i>	δ 3.88 (3H, s, OCH ₃); 7.36 (1H, dd, J = 2.05 Hz; J = 9.05 Hz, H-12); 7.52 (1H, dd, J = 2.9 Hz; J = 9.05 Hz, H-01); 7.62 (1H, d, J = 9.1 Hz, H-06); 7.65 (1H, d, J = 2 Hz, H-14); 8.25 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-03); 8.83 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-11); 12.79 (2H, s, NH).

<p><i>Espectroscopia de ressonância magnética de carbono (75 MHz, DMSO-d₆, ppm)</i></p>	<p>δ 194.64 (C-19, C-16); 156.34 (C-13); 138.50 (C-4); 136.27 (C-8); 132.48 (C-3); 131.33 (C-2); 130.46 (C- 5); 127.57 (C-9); 126.32 (C-6); 126.96 (C-12); 120.90 (C-1); 117.82 (C-11); 108.43 (C-14); 55.86 (OCH₃)</p>
--	--

Fonte: Dados obtidos de Moura (2019).

Devido a ineditismo da estrutura química obtida e aos resultados apresentados por Moura (2019) referentes a atividade antiproliferativa do composto, esse trabalho se propôs a determinar o potencial e as propriedades anti-*Leishmania* inerentes a este.

3.3.2 Avaliação da atividade leishmanicida

O derivado triazolidínico-acridínico foi avaliado *in vitro* quanto sua capacidade em inibir em 50% o crescimento das formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis*, utilizando o fármaco Anfotericina B como controle positivo. Os resultados por meio desse ensaio são exibidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Avaliação da atividade leishmanicida e efeito citotóxico desempenhado pelo derivado triazolidínico-acridínico

COMPOSTO	ACW-02	ANFOTERICINA B
IC ₅₀ AMA (µg mL ⁻¹)	6,573 ± 0,04	2,946 ± 0,07
IC ₅₀ PRO (µg mL ⁻¹)	94,97 ± 0,06	1,416 ± 0,003
CC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	>256,00	3,09 ± 0,01
EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	9,46 ± 0,06	2,8 ± 0,0093
IS (CC ₅₀ /IC ₅₀ AMA)	> 38,95	1,05
IS (CC ₅₀ /IC ₅₀ PRO)	> 2,69	2,18

Fonte: Aatoria (2024). Legenda: A Tabela representa à média ± erro padrão da média de no mínimo três experimentos independentes realizados em triplicata. IC₅₀AMA = concentração capaz de inibir em 50% o crescimento das formas amastigotas de *L. amazonensis*. IC₅₀PRO = concentração capaz de inibir em 50% o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*. CC₅₀ = Concentração citotóxica que inibe 50% da viabilidade em macrófagos J774. EC₅₀ = Concentração que estimula o crescimento em 50% da população de macrófagos J774. IS = índice de seletividade.

Observa-se, a partir dos resultados obtidos, que o composto em estudo demonstrou maior afinidade pelas formas amastigotas do parasito, apresentando um IC₅₀ de 6,57 µg mL⁻¹, enquanto que frente a forma promastigota, exibiu o valor elevado de IC₅₀ de 94,97 µg mL⁻¹.

A espécie em análise, *Leishmania amazonensis*, é um importante agente etiológico causador leishmaniose tegumentar americana (LTA) e é uma das três principais espécies dermatrópicas infectantes no Brasil e apresenta particularidades clínicas em relação as demais, como em ser a única espécie causadora de leishmaniose cutânea difusa (BRASIL, 2007). Desse modo, os resultados preliminares obtidos frente a essa espécie viabilizam a continuidade dos estudos e indicam que diferentes estágios da infecção por *L. amazonensis* serão alcançados diante da ação farmacológica do derivado ACW-02.

Adicionalmente, baseando-se no estudo de Serafim e colaboradores (2018), previamente mencionado no tópico 2.4.1 envolvendo derivados acridínicos com ação leishmanicida, a hibridização da porção tiofênica com o anel 6,9-dicloro-2-metóxi-acridina foi benéfica para a atividade antipromastigota contra *L. amazonensis*, obtendo valores de IC₅₀ entre 9,62 e 69,11 μM. No entanto, a hibridização com o anel acridínico não-substituído causou uma perda na atividade leishmanicida (IC₅₀ > 500 μM), destacando-se então a relevância da substituição no anel acridínico por grupos com efeito mesomérico positivo (-OCH₃ e -Cl) para atividade antileishmania. Como este estudo envolve a obtenção de uma molécula inédita que possui o núcleo acridínico dissustituído, o mesmo que foi utilizado por Serafim e colaboradores (2018), supõe-se que esta porção da estrutura molecular do ACW-02 está associada a atividade apresentada.

Ademais, pode-se ressaltar o estudo realizado por Moura (2019), no qual o composto ACW-02B foi avaliado frente linhagens celulares tumorais, juntamente com o composto ACW-01B (derivado com o anel acridínico não-substituído). Os resultados demonstram, para as linhagens HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e HCT (câncer de cólon), uma maior inibição na porcentagem de crescimento em células tratadas com o composto ACW-01B (30,59 e 64,56%, respectivamente) em comparação ao ACW-02B (0,0 e 34,54%, respectivamente). Esse dado corrobora para uma possível seletividade atribuída aos substituintes do anel acridínico que, com base nos estudos citados, proporcionam à molécula uma maior afinidade às células parasitárias e menor interação com células humanas.

3.3.3 Determinação da citotoxicidade em macrófagos

Considerando a importância dos macrófagos como uma das principais células pertencentes a imunidade inata sobre o processo da instalação e progressão da infecção por parasitos *Leishmania sp.*, realizaram-se estudos a fim de determinar os efeitos do ACW-02 em macrófagos J774. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 2.

Observa-se que, até a concentração máxima avaliada (256 μg mL⁻¹), o derivado ACW-02 não apresentou toxicidade aos macrófagos. Em contrapartida, a anfotericina B, que embora seja um fármaco antileishmania potente, apresentou toxicidade frente aos macrófagos na baixa concentração de 3,09 μg mL⁻¹, que se aproxima aos valores de IC₅₀ obtidos para ambas as formas amastigota e promastigota da *Leishmania* (2,946 e 1,416 μg mL⁻¹), resultando em um baixo índice de seletividade (1,05 e 2,18, respectivamente).

A toxicidade da anfotericina B, entretanto, compreende também outros mecanismos que resultam em diversos efeitos adversos, principalmente a nefrotoxicidade. De acordo com a literatura, os efeitos indesejáveis do fármaco estão associados com a indução da interleucina 1 β e do fator de necrose tumoral, que são importantes mediadores de resposta de fase aguda e desempenham papéis cruciais na iniciação e potencialização das respostas imunes/inflamatórias, com direta indução a apoptose tecidual em órgãos (FALK et al., 2005; KAGAN et al., 2012). Tais fatores limitam a utilização clínica da anfotericina B e estabelecem a necessidade da inclusão do fármaco em um sistema lipossomal.

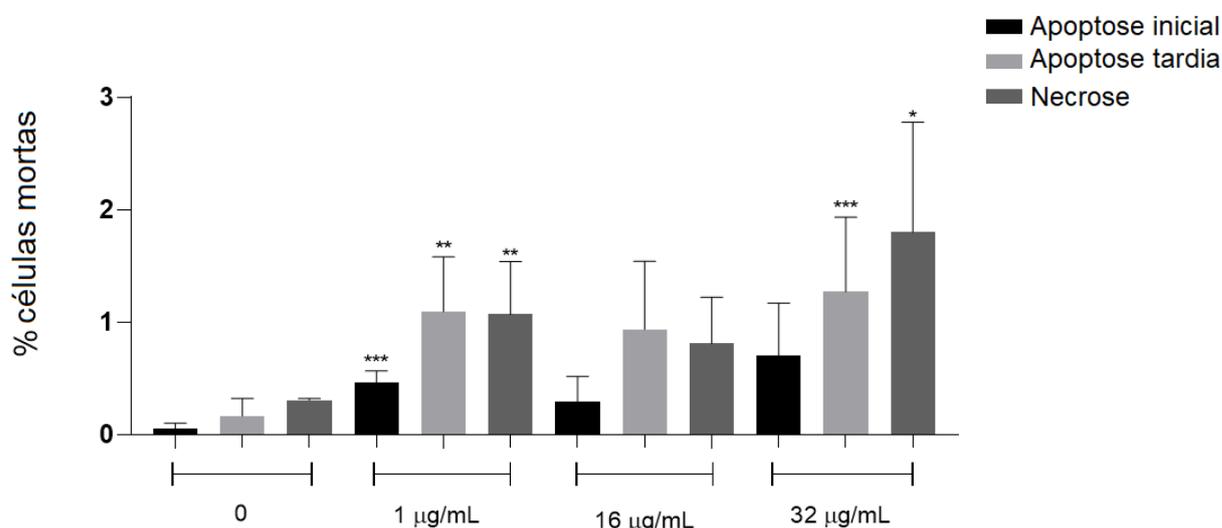
Para o composto sintetizado, no entanto, não houve a possibilidade de determinar precisamente os valores de IS devido a não toxicidade na maior concentração testada, porém compreende valores acima de 38,95 e 2,69 para as formas amastigota e promastigota, respectivamente. Esses valores fornecem uma margem de segurança, especialmente quando o ACW-02 é utilizado como um antiamastigota.

Adicionalmente, além de não se verificar efeito citotóxico, observou-se um efeito estimulatório (EC_{50}) na proliferação de macrófagos a partir da incubação com ACW-02 na concentração de 9,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$, conforme visualizado na Tabela 2, sugerindo uma possível atividade imunomoduladora. Portanto, a fim de esclarecer os efeitos do composto sintetizado sobre os macrófagos e a possibilidade de um efeito imunomodulador, estudos mais extensos foram realizados, como a avaliação da citotoxicidade por citometria de fluxo, determinação do efeito microbicida em macrófagos infectados, estímulo a expressão de citocinas e espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, conforme apresentado nos próximos tópicos.

3.3.3.1 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos por citometria de fluxo

A fim de compreender em mais detalhes o efeito do composto sintetizado sobre os macrófagos J774, foi realizado um ensaio de avaliação do ciclo celular utilizando a marcação com anexina V-FITC/PI. Este ensaio é baseado na capacidade da anexina V de se ligar à fosfatidilserina, que é externalizada em eventos apoptóticos, e do iodeto de propídio em se ligar ao DNA de células que perderam a integridade da membrana. Assim, este estudo permite a detecção de células viáveis (Anexina⁻/PI⁻), células em apoptose inicial (Anexina⁺/PI⁻), células em apoptose tardia (Anexina⁺/PI⁺) e células necróticas (Anexina⁻/PI⁺) (CRUZ et al., 2019; ZAKHAROVA et al., 2019). Os resultados podem ser visualizados na Figura 21.

Figura 21 - Efeito do composto ACW-02 em macrófagos J774 pelo método anexina V-FITC/PI



Fonte: Aatoria (2024). Legenda: Os asteriscos representam diferenças estatísticas entre macrófagos tratados e não tratados; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ANOVA seguida pelo teste de Turkey.

Conforme demonstrado, na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, a porcentagem de células em apoptose inicial, tardia e necrose foi de 0,46, 1,093 e 1,068, respectivamente. Quando aumentada para a concentração de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$, há uma diminuição nas porcentagens, sendo estas 0,2932, 0,9367 e 0,8083, respectivamente. Finalmente, na concentração de $32 \mu\text{g mL}^{-1}$, os percentuais aumentam para 0,7033, 1,272 e 1,8, respectivamente. Em comparação com o controle negativo, no qual não havia a presença do composto sintetizado e apresentou valores de 0,0567, 0,1667 e 0,3067%, o ACW-02 apresenta valores aproximados, destacando sua viabilidade como não citotóxico para macrófagos.

3.3.4 *Determinação do efeito microbicida em culturas de macrófagos infectados com L. amazonensis*

Estudos anteriores forneceram informações sobre a atividade leishmanicida do composto avaliado associada a uma possível atividade imunomoduladora em macrófagos devido ao aumento na expressão dessas células a partir do tratamento com o ACW-02. Dada a importância dessa célula para a progressão da patogênese em questão, essa possibilidade

representa uma associação de mecanismos favorável. Portanto, foi avaliado o efeito do ACW-02 sobre macrófagos infectados com formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, a fim de verificar seu potencial imunomodulador. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Avaliação do efeito microbicida do composto ACW-02

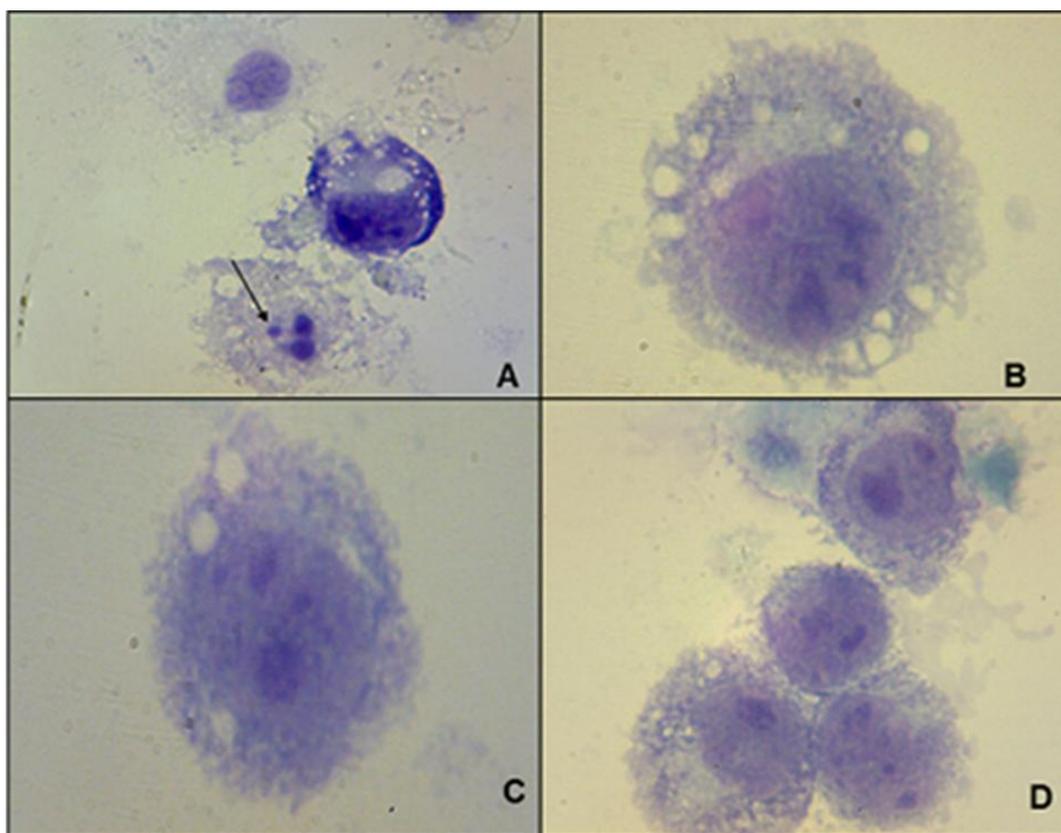
ACW-2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Macrófagos infectados (%)	Média de <i>Leishmanias</i>	Taxa de infecção (%)
0	22.0	2.4	53.0
1	12.0	1.2	14.5
16	11.5	1.2	13.5
32	11.5	1.8	21.0

Fonte: Autoria (2024).

Os resultados obtidos por meio dos parâmetros avaliados demonstram a influência da adição do composto em estudo sobre os macrófagos infectados. Em comparação com células infectadas e não tratadas ($0 \mu\text{g mL}^{-1}$), observou-se que a adição de ACW-02 reduziu todos os parâmetros avaliados, ou seja, o percentual de macrófagos infectados, a média de leishmanias por macrófago e a taxa de infecção em todas as concentrações (1, 16 ou $32 \mu\text{g mL}^{-1}$).

O efeito microbicida do ACW-02 pode ser visualizado por microscopia óptica com aumento de 100x na Figura 22. A baixa taxa de infecção, principalmente nas menores concentrações de ACW-02 (1 ou $16 \mu\text{g mL}^{-1}$), possivelmente interferiu de maneira positiva na funcionalidade dos macrófagos, favorecendo assim a eliminação dos parasitos.

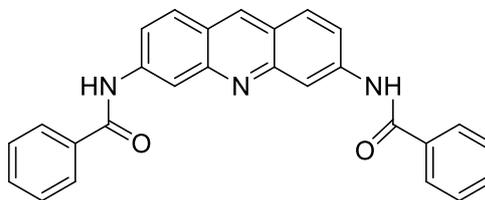
Figura 22 - Efeito do composto ACW-02 em macrófagos infectados com *L. amazonensis*



Fonte: Aatoria (2024). Legenda: (A) controle negativo ($0 \mu\text{g mL}^{-1}$); (B) macrófagos tratados com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; (C) macrófagos tratados com $16 \mu\text{g mL}^{-1}$; (D) macrófagos tratados com $32 \mu\text{g mL}^{-1}$. A seta indica a presença da amastigota de *L. amazonensis* internalizada no macrófago. Coloração: Giemsa 10%.

Os resultados corroboram para suposição do efeito imunomodulador. Especialmente nas menores concentrações avaliadas, que são mais próximas ao EC_{50} encontrado ($9,46 \mu\text{g mL}^{-1}$). Por outro lado, supõe-se que a testagem na concentração mais alta ($32 \mu\text{g mL}^{-1}$) possa ter ocasionado uma supersaturação no meio de cultura, alterando a solubilidade da molécula e, conseqüentemente, causando a diminuição da atividade biológica devido a menor interação do composto com os macrófagos infectados. Esses achados corroboram com relatos da literatura de derivados acridínicos com atividade imunomoduladora. O efeito de compostos acridínicos em macrófagos infectados com formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* é reportada por Di Giorgio e colaboradores (2007). O estudo destacou o composto *N*-[6-(benzoilamino)-3-acridina]-benzamida (3a) apresentou uma boa atividade antiamastigota, com IC_{50} de $1,1 \mu\text{M}$, com pouca toxicidade a monócitos (IC_{50} de $110,3 \mu\text{M}$). Adicionalmente, foi encontrada uma boa atividade antipromastigota ($\text{IC}_{50} = 4,3 \mu\text{M}$) (Figura 23).

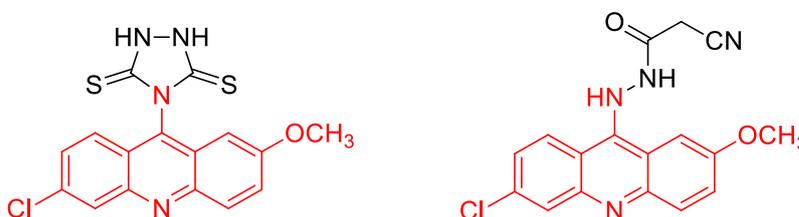
Figura 23 - Composto *N*-[6-(benzoilamino)-3-acridina]-benzamida (3a)



Fonte: Di Giorgio et al. (2007).

Estudos mais recentes, tal como o de Manguera e colaboradores (2022), avaliaram a atividade antiproliferativa de um composto 9-aminoacridínico que, assim como o ACW-02, apresenta o anel acridínico dissustituído com os grupamentos $-OCH_3$ e $-Cl$ (Figura 24). O composto promoveu uma diminuição nos níveis de IL-1 β e CCL-2 (proteína quimiotática de monócitos), o que os autores relacionaram ao efeito angiogênico encontrado; aumento de TNF- α e IL-4, que estão diretamente ligadas ao efeito citotóxico; e diminuição do estresse oxidativo e dos níveis de óxido nítrico. Assim, embora investigado com outra finalidade, o derivado ACS-AZ (*N'*-(6-cloro-2-metóxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazida) demonstrou a capacidade de modular a atividade do sistema imune pela alteração da expressão de citocinas e espécies reativas.

Figura 24 - Derivados 9-aminoacridínicos ACW-02 e ACS-AZ, respectivamente.

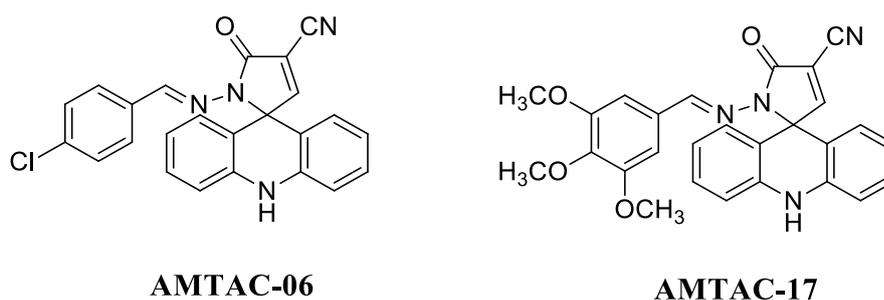


Fonte: Aatoria (2024).

Ainda nesse sentido, o nosso grupo de estudos determinou a capacidade imunomoduladora de compostos espiro-acridínicos AMTAC-06 e AMTAC-17 (Figura 25). No trabalho desenvolvido por Sousa Duarte e colaboradores (2020), o composto AMTAC-06

aumentou a expressão de TNF- α e IL-1 β , em associação com diminuição nos níveis de IFN- γ . Semelhantemente, no artigo publicado por Silva e colaboradores (2020), o derivado AMTAC-17 provocou um aumento nos níveis das citocinas Th1, ou seja, TNF- α , IL-12 e IL-1 β . Ambos resultados foram favoráveis para o efeito antiproliferativo visado.

Figura 25 - Derivados espiro-acridínicos imunomoduladores



Fonte: Sousa Duarte et al. (2020); Silva et al. (2020).

Desse modo, os resultados de EC₅₀ e efeito microbicida, em conjunto, podem indicar a ativação do efeito antileishmania do macrófago (KOLODZIEJ; KIDERLEN, 2005). A realização da atividade antileishmania desempenhada pelo macrófago pode se dar por alterações estruturais, como disseminação, fagocitose, vacuolização e aumento do volume lisossomal, ou por mecanismos celulares, como alterações no perfil de óxido nítrico, nível de citocinas e secreção de metaloproteinases de matriz (BHATTACHARYA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015).

Assim, a fim de determinar os mecanismos envolvidos na totalidade da atividade antileishmania do composto ACW-02, avaliou-se o efeito por mecanismos celulares de alteração na expressão de citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

3.3.5 *Análise da expressão de citocinas*

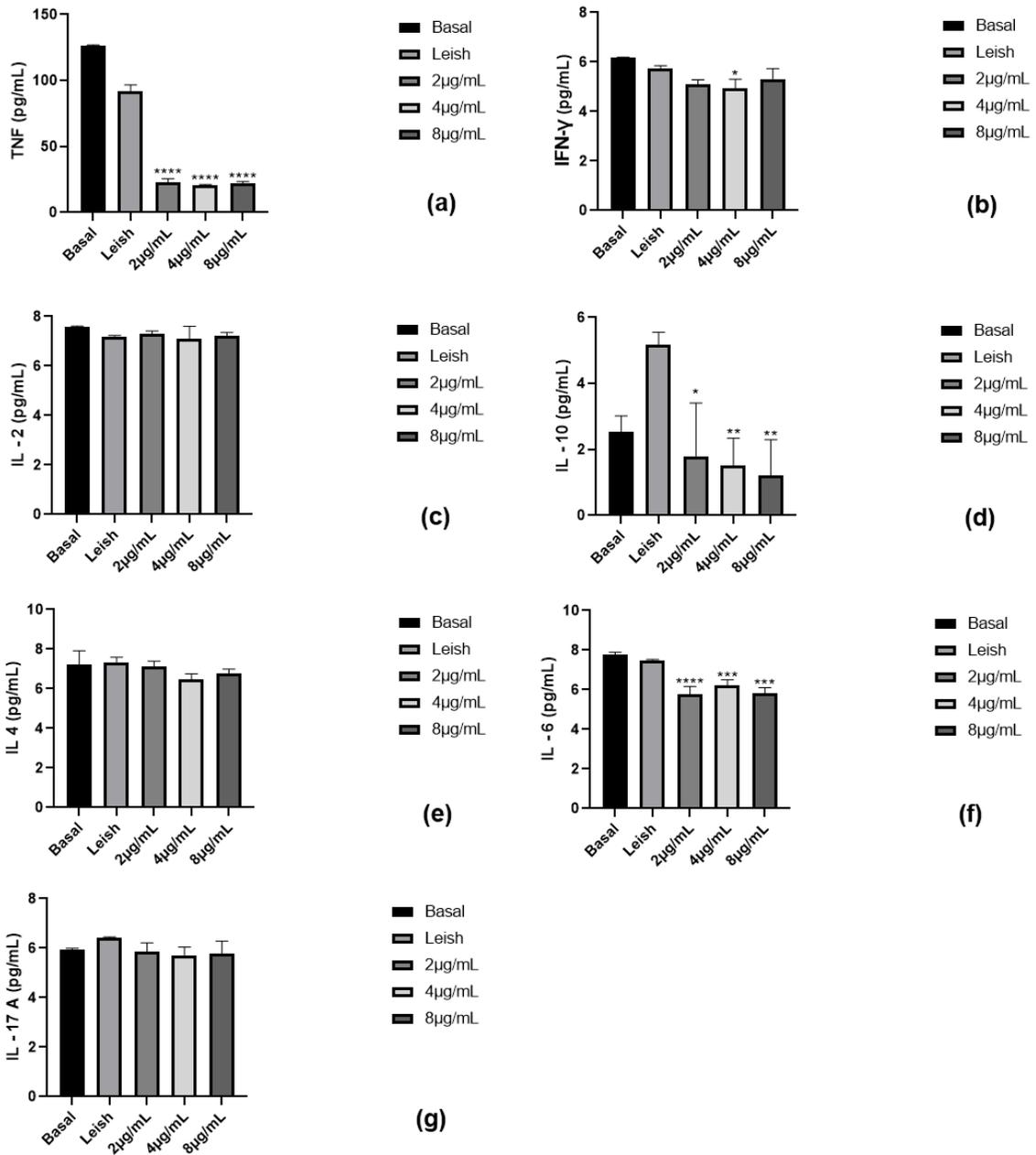
Foram feitas avaliações quanto ao efeito do composto ACW-02, nas concentrações 2, 4 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, na modulação da resposta Th1, Th2 e Th17 através da expressão das respectivas citocinas: TNF- α (Fator de necrose tumoral- α), IFN- γ (Interferon- γ), IL-2 (Interleucina-2), IL-10 (Interleucina-10), IL-4 (Interleucina-4), IL-6 (Interleucina-6) e IL-17A (Interleucina-17A). A resposta expressa pelo macrófago basal (não tratado e não infectado) e macrófago infectado

com *L. amazonensis* (não tratado) foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente (Figura 26).

A progressão da infecção causada pelo protozoário *Leishmania* está diretamente relacionada à resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, principalmente a imunidade mediada por células T e a expressão de citocinas pró-inflamatórias e/ou anti-inflamatórias, que podem resultar em um quadro assintomático, autocura, ou leishmaniose crônica. A imunidade celular gerada pelo Th1 é considerada o principal mediador da resistência à *Leishmania*, pois está associada à secreção de citocinas pró-inflamatórias (ex. TNF- α , IFN- γ , IL-2) que ativam os macrófagos, levando à inativação do parasito (GABRIEL et al., 2019; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017; MIRZAEI et al., 2021).

Porém, de acordo com os resultados obtidos em nossos experimentos, há uma diminuição significativa na expressão de TNF- α (Figura 26a) com a adição do composto acridínico ACW-02, desde a menor até a maior concentração avaliada (2-8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $p < 0,0001$). O efeito obtido pela diminuição da expressão de uma citocina Th1 pode favorecer uma ação anti-inflamatória, tendo em vista que interfere na ativação macrofágica esperada para o desempenho da atividade antileishmania, auxiliando na progressão da doença (GOMES et al., 2012).

Figura 26 - Avaliação da produção de citocinas



Fonte: Autoria (2024). Legenda: Avaliação da resposta imune Th1 ((a) TNF- α , (b) IFN- γ , (c) IL-2), Th2 ((d) IL-10, (e) IL-4, (f) IL-6) e Th17 ((g) IL-17A). Basal: Macrófagos não infectados e não tratados. Leish: Macrófagos infectados com *L. amazonensis* e não tratados. Os asteriscos representam diferenças estatísticas entre macrófagos tratados e macrófagos infectados não tratados: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas da Turkey.

Além disso, também é observada uma leve diminuição na expressão de IFN- γ na concentração 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (* $p < 0,05$) (Figura 26b). O mesmo não é visto nas demais concentrações avaliadas (2 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Essa citocina, por sua vez, se destaca durante o processo inflamatório em resposta a infecção pela indução a produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, e secreção de citocinas pró-inflamatórias que exercem o papel de causar a morte das formas amastigotas intracelulares por dano oxidativo (GURJAR et al., 2022). Igualmente ao observado sob TNF- α , o efeito observado foi contrário ao desejado, porém de maneira mais branda. Adicionalmente, o efeito do composto na citocina IL-2 não foi significativo em todas as concentrações analisadas (Figura 26c).

Por outro lado, as citocinas expressas pelas células Th2 (ex. IL-4, IL-6, IL-10) estão relacionadas a uma ação anti-inflamatória, pois são capazes de suprimir o sistema imunológico do hospedeiro, causando depleção de macrófagos e, conseqüentemente, promovendo o desenvolvimento das formas intracelulares do parasito e a progressão da doença (MIRZAEI et al., 2021).

De acordo com nossos achados, observou-se a diminuição da expressão de IL-10 (Figura 26d), aproximando-se dos valores basais a partir da menor concentração testada (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $p < 0,05$), e progressivamente diminuindo com o aumento da concentração da molécula (4 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $p < 0,01$). De acordo com Oliveira Cardoso et al. (2021), achados demonstram que, em casos de leishmaniose visceral em humanos, o bloqueio ação da IL-10 promove: atividade de citocinas pró-inflamatórias, indução do aumento nos níveis de TNF- α e IFN- γ , produção de granuloma, ativação macrofágica e morte parasitária. Embora nossos estudos compreendam a experimentação em uma espécie de *Leishmania* mais conhecida por causar leishmaniose cutânea, um efeito semelhante é esperado subsequente a supressão da atividade da IL-10, tendo em vista que seu efeito anti-inflamatório será reduzido.

Além disso, há uma diminuição significativa na expressão de IL-6 em todas as concentrações avaliadas ($p < 0,001$) (Figura 26f). Essa citocina é produzida por muitos tipos de células e está envolvida em vários processos, bem como na resposta de fase aguda na maturação de células B e diferenciação de macrófagos. IL-6 é capaz de promover a diferenciação em Th2 e simultaneamente inibir Th1, por vias moleculares independentes. Seu papel principal é de bloquear as respostas pró-inflamatórias ao bloquear a expressão das citocinas responsáveis por esse efeito e pela supressão de recrutamento leucocitário ao local da infecção (ESPIR et al., 2014; HURST et al., 2001).

Assim, ao contrário dos resultados anteriores encontrados para citocinas Th1, a diminuição da expressão de uma interleucina anti-inflamatória favorecerá um efeito pró-inflamatório, ou seja, uma ação leishmanicida. Os resultados encontrados para a outra citocina avaliada, IL-4, não foram estatisticamente significantes.

Por fim, Th17 está envolvido na produção de IL-17, uma citocina altamente pró-inflamatória com efeitos significativos nas células do estroma, resultando no recrutamento de leucócitos e formando uma interação entre a imunidade inata e adaptativa (MIRZAEI et al., 2021; TESMER et al., 2008). Porém, de acordo com os resultados obtidos, o composto ACW-02 não apresenta atividade significativa sobre a citocina IL-17A (Figura 26g).

Em síntese, o composto ACW-02 exibiu a capacidade de alterar significativamente os níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-6 em relação aos valores obtidos para macrófagos infectados com *L. amazonensis* e não tratados. Esses, entretanto, foram antagônicos entre si, tendo em vista que a diminuição nos níveis de TNF- α e IFN- γ induzem um efeito pró-leishmania, e a redução de IL-10 e IL-6 provocam um efeito antileishmania. Desse modo, a fim de auxiliar nas conclusões relacionadas ao mecanismo desempenhado pelo composto em estudo, foi dada continuidade a avaliação dos efeitos moduladores pela análise da produção de espécies reativas.

3.3.6 Avaliação da produção de EROs e ERNs

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) é de relevância significativa para a progressão da doença. A ativação de macrófagos como resposta a um processo infeccioso induz a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila, espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico (NO). EROs e ERNs exibem alta capacidade microbicida, pois essas espécies podem gerar danos oxidativos às biomoléculas do parasito, como lipídios, proteínas e DNA, levando à perda da integridade da membrana, replicação defeituosa e, conseqüentemente, morte celular (KIMA, 2014; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

A literatura reporta o óxido nítrico como principal molécula efetora envolvida na morte parasitária. Nos macrófagos, o radical livre em questão é obtido pelo aminoácido L-arginina em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que é estimulada por IFN- γ ou TNF- α na presença de lipopolissacarídeo (LPS), ou por uma combinação de ambas as citocinas. Vários estudos reportam a superprodução de NO em murinos em estágios avançados da infecção por *L. amazonensis*. A ação leishmanicida é alcançada por meio de

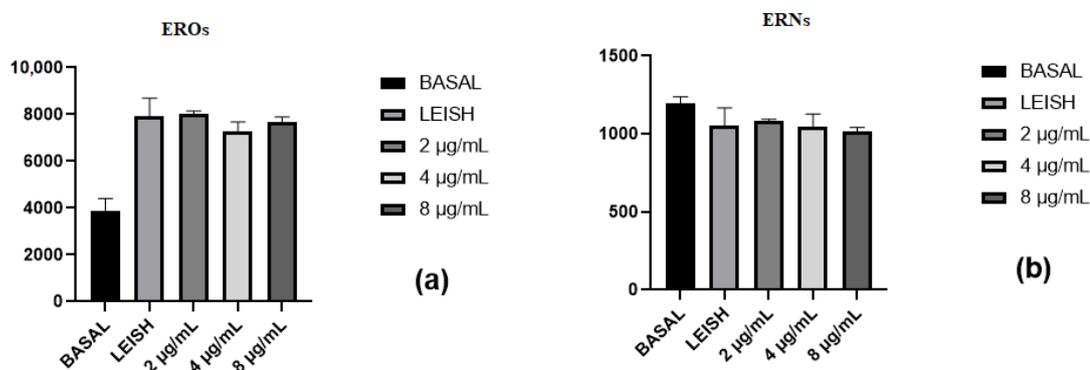
mecanismos que envolvem a inibição da respiração mitocondrial, inativação de peroxidases, inibição da glicólise, mutação no DNA, inibição do reparo e da síntese do DNA, S-nitrosilação, ADP-ribosilação, nitração de tirosina de proteínas, peroxidação de lipídios de membrana, entre outros (GENESTRA et al., 2003; GIUDICE et al., 2007; PERRELLA BALESTIERI et al., 2002; ROMA et al., 2016).

Por outro lado, menos aprofundamento é dado ao estudo do envolvendo as EROs, porém o ânion superóxido (O_2^-) apresenta um papel crucial no controle da infecção por *Leishmania*. Durante a fase inicial da infecção pelo parasito, o superóxido é produzido como parte da explosão oxidativa de macrófagos em resposta à fagocitose.

Referente a ação em espécies de *L. amazonensis*, estudos *in vitro* envolvendo macrófagos infectados demonstram que os seus efeitos das EROS são gerados por macrófagos, ativados com IFN- γ e LPS, e tratados com inibidor de ERK. Porém, estudos envolvendo a função de EROs produzidas durante o processo de fagocitose para eliminação do parasito e estudos *in vivo* ainda não foram abordados (CARNEIRO et al., 2016; MUKBEL et al., 2007; ROMA et al., 2016).

A fim de avaliar a capacidade do composto sintetizado em induzir a formação de espécies reativas, foram realizadas avaliações que mostraram que o composto sob avaliação, nas concentrações 2, 4 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não afetou significativamente a produção de EROs, quando comparados aos macrófagos infectados e não tratados, conforme mostrado na figura 27a. Da mesma forma, nas mesmas concentrações (2, 4 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$), ACW-02 não apresentou alteração significativa na produção de ERNs em comparação com macrófagos infectados e não tratados, conforme mostrado na figura 27b.

Figura 27 - Avaliação do efeito do composto ACW-02 na produção de espécies reativas



Fonte: Aatoria (2024). Legenda: Basal: Macrófagos não infectados e não tratados. Leish: Macrófagos infectados com *L. amazonensis* e não tratados. *Significativamente diferente dos macrófagos infectados e não tratados ($p < 0,05$). ANOVA seguida pelo teste de Turkey.

Desse modo, de acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que o composto ACW-02 não apresenta a capacidade de alterar a expressão de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por macrófagos infectados nas concentrações avaliadas. Tendo em vista que uma das vias responsáveis por induzir a produção desses radicais livres é por meio da ativação da resposta Th1, principalmente pela expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ , os achados são condizentes com os experimentos realizados para dosagem de citocinas, nos quais a molécula apresentou um efeito significativo na redução da produção dessas, em especial para TNF- α . Assim, o efeito desempenhado pelo ACW-02 em relação às citocinas influi de maneira oposta a superprodução de EROs e ERNs.

Portanto, os resultados, em conjunto, não demonstraram alteração nos componentes da imunidade adaptativa que justifiquem plenamente a realização de uma atividade imunomoduladora pelo ACW-02 nas concentrações avaliadas (2–8 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo necessário estudos mais aprofundados para validação dessa hipótese. Assim, a fim de compreender a totalidade dos mecanismos responsáveis pela realização da atividade antileishmania desempenhada pelo composto em estudo, estratégias *in silico* foram empregadas.

3.3.7 Ancoragem molecular

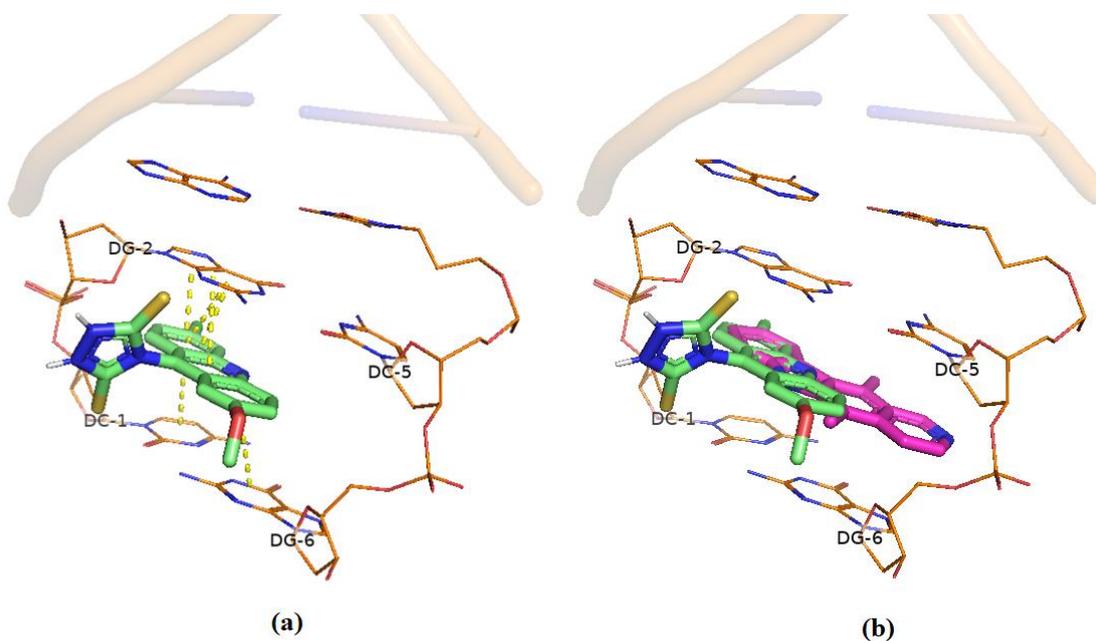
3.3.7.1 Interação com DNA

O núcleo acridínico, presente na estrutura do composto ACW-02, destaca-se como potencial *scaffold*. Sua atividade biológica pode ser atribuída à planaridade de suas estruturas aromáticas, que podem interagir por intercalação ou interações com os sulcos do DNA, interferindo nas propriedades celulares (GAO et al., 2010; JANOVEC et al., 2011; LIU et al., 2010).

No trabalho desenvolvido por Moura (2019), o composto ACW-02B foi avaliado quanto a sua capacidade de interagir com o DNA *in vitro* por absorção de UV-visível. O composto apresentou hipercroísmo de 47,23% e $K_b (M^{-1}) = 1,17 \times 10^6$ na presença de ctDNA, sendo essas características sugestivas de interação seja por intercalação ou por interação com os sulcos.

Assim, a fim de compreender melhor o modo de interação com o DNA, realizou-se a avaliação *in silico* com a macromolécula. Para tal, estudos de *docking* foram realizados com a molécula de DNA hexâmero d(CGATCG)₂ (PDB ID:1Z3F). Os resultados são mostrados na figura 28.

Figura 28 - Ancoragem molecular do composto (a) ACW-02 e (b) ligante co-cristalizado em DNA (PDB ID: 1Z3F).



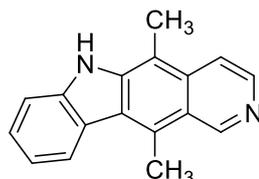
Fonte: Aatoria (2024). Legenda: (a) à esquerda, o ajuste molecular proposto de ACW-02 no DNA; interações hidrofóbicas com bases de DNA são mostradas em linhas tracejadas amarelas. (b) sobreposição de ambos compostos, elipticina (magenta) e ACW-02 (verde), no alvo.

A figura 28a mostra o conformero do ACW-02 com pontuação mais alta (71,77) após o estudo de ancoragem molecular. A porção acridínica do composto apresentou maior afinidade para se intercalar entre as bases nitrogenadas do DNA através do empilhamento de elétrons π - π . Essa capacidade inerente ao núcleo acridínico é justificada por sua estrutura composta por anéis aromáticos fundidos, de geometria plana, que favorece seu posicionamento entre o arranjo coplanar das bases nitrogenadas, formando interações hidrofóbicas por empilhamento de ligações π que estabilizam o complexo ligante-alvo. Esse complexo, é, no entanto, limitado pelo impedimento estérico realizado pela porção do anel triazolidínico, que apresenta grupamentos aceptores de elétrons (C=S) e doadores/aceptores de elétrons (-NH) que, além de apresentarem maiores raios atômicos, podem favorecer a estabilização do complexo supramolecular DNA-ligante, por meio de interações eletrostáticas ou não covalentes (NEPALI et al., 2014; SHI et al., 2015; ZHU et al., 2014).

O composto de referência utilizado foi obtido co-cristalizado ao alvo. Trata-se da elipticina (Figura 29), um alcaloide indólico isolado da *Ochrosia elliptica* e extensivamente estudado devido aos seus efeitos antitumorais e citotóxicos. A atividade desempenhada por esse

composto é atribuída ao seu tamanho, forma e planaridade, que permitem sua intercalação entre as bases de DNA (CANALS et al., 2005; ZSILA; SAMSONOV, 2018). Durante o docking molecular, a elipticina apresentou a pontuação de 75,68.

Figura 29 - Estrutura da elipticina



Fonte: Canals et al. (2005).

Assim, embora o ACW-02 tenha apresentado uma pontuação menor que a elipticina, eles mostraram grande semelhança em termos de pose e interações intermoleculares realizadas com o DNA (Figura 28b), destacando a capacidade do derivado de acridina para novas interações no receptor, tendo em vista que, conforme proposto nos estudos espectroscópicos apresentados por Moura (2019), a ancoragem molecular também indicou a capacidade de dupla interação com o DNA, sendo o fragmento de triazolidina capaz de interagir com as cadeias laterais da macromolécula.

Embora esses resultados reafirmem a capacidade do composto em interagir com o DNA, é provável que esse não seja o único mecanismo de ação realizado pelo composto em avaliação, uma vez que não há diferenças estruturais entre as moléculas de DNA do parasito e do hospedeiro que proporcionem seletividade ao composto, e, conseqüentemente, justifiquem a totalidade da ação leishmanicida. Por esse motivo, a possibilidade de novos alvos foi avaliada *in silico* para investigar prováveis mecanismos de ação complementares.

3.3.7.2 Interação com prováveis alvos leishmanicidas

A alta seletividade apresentada nos testes *in vitro* do ACW-02 contra *Leishmania amazonensis* subsidiou o estudo *in silico* de possíveis mecanismos de ação envolvidos na sobrevivência do parasito. Algumas vias metabólicas essenciais para sobrevivência do parasito, como: equilíbrio redox (tripanotiona redutase, TryR); regulação do superenrolamento do DNA pelas topoisomerasas I (Topo I); as enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol (esterol 14-alfa-dimetilase, CYP51) foram exploradas por *docking* molecular (ALMEIDA et al., 2021;

EMAMI; TAVANGAR; KEIGHOBADI, 2017; SERAFIM et al., 2018; MENEZES et al., 2019; TURCANO et al., 2018). Além disso, também destacamos cisteína proteases, como a cisteína protease B de *Leishmania amazonensis* (CPBLa), são alvos promissores de drogas contra doenças parasitárias, essenciais para os processos bioquímicos e sobrevivência dos parasitos (NASCIMENTO; AQUINO; SILVA-JÚNIOR, 2021). Assim, os modelos cristalográficos dos alvos selecionados para os estudos teóricos foram obtidos do PDB, com exceção do CPBLa, que foi construído por meio de modelagem por homologia. Validações por *redocking*, quando possível, foram realizadas e apresentaram resultados de RMSD aceitáveis para o estudo ($< 2\text{Å}$) (BELL; ZHANG, 2019). Os resultados obtidos se apresentam na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados do *docking* molecular nos alvos propostos

	4APN (TryR)	3L4D (CYP51)	2B9S (Topo I)	CPBLa
ACW-02	54,22	58,74	60,34	50,97
Referência*	67,58	78,77	63,98	47,77
RMSD	0,76	1,02	-	-

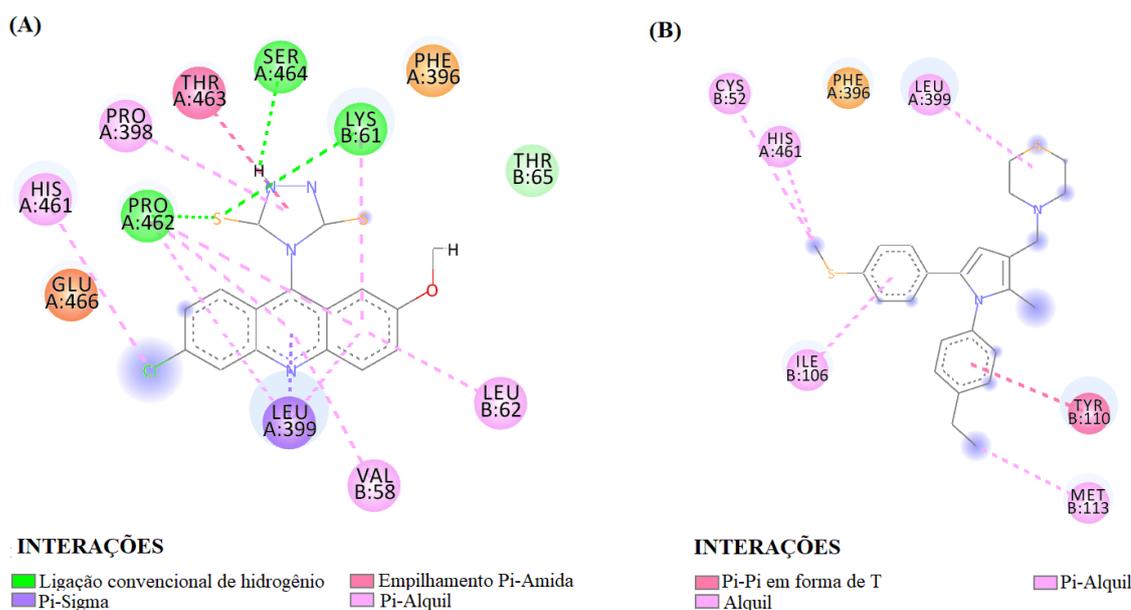
Fonte: Aatoria (2024). Legenda: *Ligante co-cristalizado em 4APN para TryR; ligante co-cristalizado em 3L4D para CYP51; Camptotecina para Topo I; e composto 1c para CPBLa (ALMEIDA et al., 2015).

Como apresentado na tabela 4, o ACW-02 apresentou pontuações abaixo dos compostos de referência utilizados no *docking*. No entanto, informações sobre os principais resíduos e interações polares intrínsecas à formação do complexo ligante-receptor foram reproduzidas e indicaram boas afinidades para o *docking* do ACW-02 nos alvos estudados. Características como planaridade e pontos de interações polares na porção derivada de triazolidina cíclica foram essenciais para o desempenho do *scaffold* neste estudo.

A TryR é uma enzima, exclusiva ao parasito, utilizada para neutralizar o peróxido de hidrogênio produzido pelos macrófagos durante a infecção (TURCANO et al., 2018). Essa apresenta-se como um potencial alvo farmacológico, de modo que estudos demonstram que os antimonialis, que são utilizados como primeira linha de tratamento para leishmaniose, agem interferindo no metabolismo da tripanotiona ao inibir a atividade da TryR (BATTISTA et al., 2020). Desse modo, o composto ACW-02 foi avaliado frente ao alvo tripanotiona redutase de

L. infantum (PDB ID: 4APN), juntamente com um derivado diarilpirrolíco (4-[[1-(4-etilfenil)-2-metil-5-(4-metilsulfanilfenil)pirol-3-il]metil]tiomorfolina), obtido juntamente com o alvo como ligante co-cristalizado. As interações são vistas na figura 30.

Figura 30 - *Docking* molecular do (A) ACW-02 e (B) ligante co-cristalizado no alvo TryR (PDB ID: 4APN).



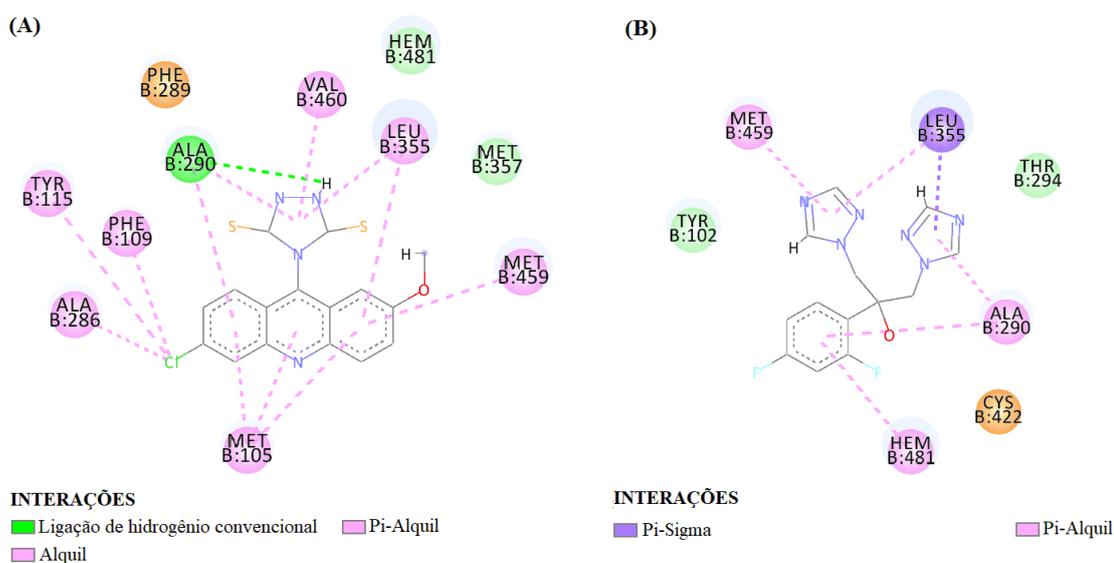
Fonte: Autoria (2024).

O composto ACW-02 apresentou a pontuação 54,22, enquanto o ligante co-cristalizado demonstrou maior afinidade ao alvo, com pontuação de 67,58. Porém, observam-se interações reproduzidas por ACW-02 que são reportadas como essenciais para inibição enzimática, como interações polares no resíduo do aminoácido Lys61 e hidrofóbicas nos resíduos de Val58 e Leu62 (ALMEIDA et al., 2021). Além dessas, outras interações foram realizadas entre o composto acridínico e o alvo, a exemplo da interação do tipo pi-alkil no aminoácido His461, que foi desenvolvida por ambos compostos em avaliação.

Já o esteroil 14-alfa-dimetilase do citocromo P450 (CYP51) é uma enzima responsável por catalisar a desmetilação do sistema de anéis na posição C14 da via do lanosterol. Essa enzima é essencial para sobrevivência e proliferação do parasito, tendo em vista que sua inibição leva ao acúmulo de intermediários de esteróis 14-metilados e profundas anormalidades da membrana plasmática, incluindo aumento da fluidez e falha em manter os microdomínios

ordenados da membrana (MUKHERJEE et al., 2020; TABREZ et al., 2021). Por ser indispensável e específico do parasito, avaliou-se a interação do derivado acridínico frente ao alvo esterol 14-alfa-dimetilase de *L. infantum* (PDB ID: 3L4D), juntamente com o ligante co-cristalizado fluconazol. Os resultados são mostrados na figura 31.

Figura 31 - *Docking* molecular do (A) ACW-02 e (B) fluconazol no alvo CYP51 (PDB ID: 3L4D).



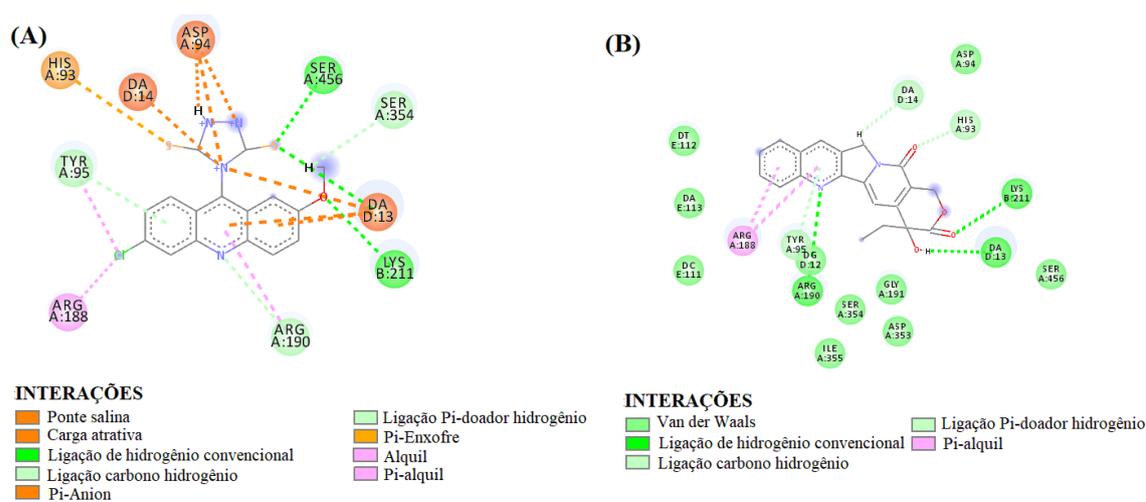
Fonte: Aatoria (2024).

Nesse alvo, o ACW-02 apresentou o *score* de 58,74, inferior ao fluconazol (78,77). Embora os resultados de pontuação apresentem uma diferença significativa, ambos apresentam interações semelhantes com o alvo, como: duas interações hidrofóbicas com o resíduo Leu355; duas interações pi-alkil com o resíduo Ala290, com uma adicional de hidrogênio convencional realizada pelo ACW-02; uma interação pi-alkil com o resíduo de aminoácido Met259. Acredita-se que, embora o derivado acridínico tenha desempenhado mais interações com o alvo farmacológico, o fluconazol pode ter realizado aquelas essenciais para sua inibição.

A topoisomerase, por sua vez, é uma enzima importante durante os processos celulares, pois age promovendo um relaxamento transitório na fita de DNA, a fim de evitar seu superenrolamento ou superhelicoidização. Como observado, o ACW-02 apresentou a capacidade de interagir com o DNA, e a associação desses dois mecanismos é comumente observada devido a vantagem da combinação desses mecanismos sinérgicos. Para isso, a enzima topoisomerase 1B de *L. donovani*. Pela ausência de um ligante co-cristalizado, a análise

comparativa foi realizada com a Camptotecina (CPT), dado seu mecanismo de ação elucidado como um inibidor da topoisomerase I (ALMEIDA et al., 2021). Assim, a interação de ambos com o alvo é mostrada na figura 32.

Figura 32 - *Docking* molecular do (A) ACW-02 e (B) camptotecina no alvo TOP1 (PDB ID: 2B9S).

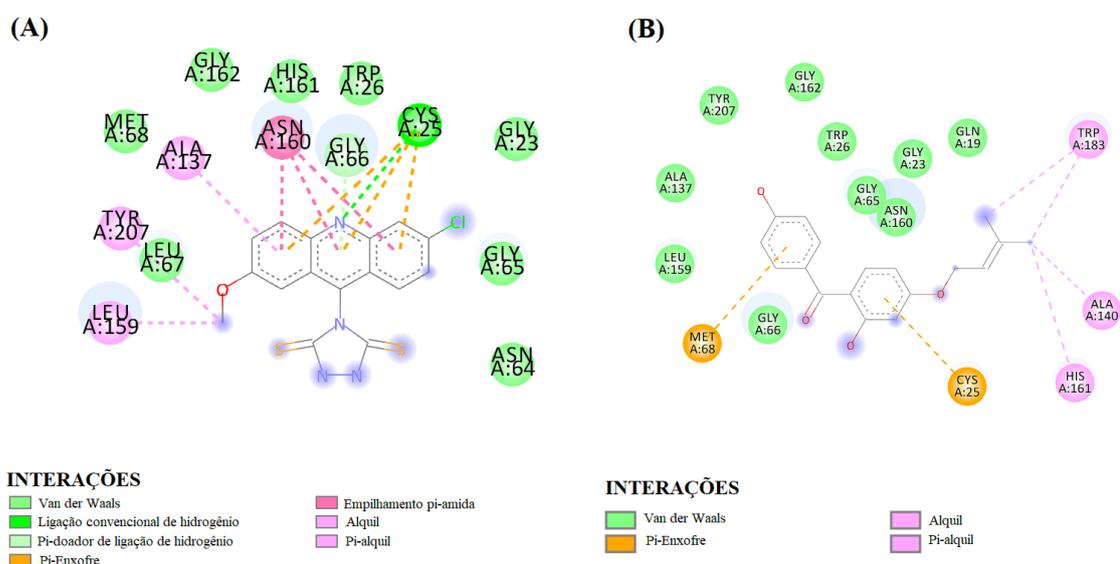


Fonte: Autoria (2024).

Os resultados obtidos para o ACW-02 e camptotecina foram próximos entre si, sendo as pontuações de 60,34 e 63,98, assim como as interações realizadas com o alvo. Inicialmente, observa-se que as interações polares intrínsecas da camptotecina no acoplamento com topoisomerase I de *L. donovani* foram reproduzidas com os resíduos Arg190 e Lys211 (MAMIDALA et al., 2016). Esses mesmos resíduos são alvo do ACW-02, além de outros aminoácidos que estão presentes interagindo com os compostos em ambos complexos, como: Arg188, Tyr95 e His93. Adicionalmente, observa-se que ambos compostos interagem com as bases nitrogenadas de adenina do DNA (DA13 e DA14). Assim como no *docking* com o DNA, a porção cíclica ligada à acridina induziu uma restrição estérica para um melhor empilhamento entre as bases do DNA, porém, este mesmo fragmento foi responsável por interações adicionais com a porção enzimática do topo I, o que justifica a semelhança entre os *scores* encontrados para ACW-02 e Camptotecina.

Por fim, analisou-se a afinidade do composto pela cisteína protease B de *Leishmania* spp. Essa é uma enzima proteolítica que está presente em todas as espécies, em todos os estágios do ciclo de vida do parasito, e apresenta um papel essencial na interação parasita-hospedeiro. Essa enzima é considerada como um fator de virulência, tendo em vista que a diminuição da sua expressão interfere no êxito da infecção em hospedeiros vertebrados (BERNARDES et al., 2017; BIVONA et al., 2019). Para determinação *in silico* do potencial como inibidor da cisteína protease, o ACW-02 foi avaliado frente uma enzima modelada por homologia molecular e comparado a um derivado da benzofenona, o composto 1c ((2-hidroxi-4-O-(3,3-dimetil)-alilbenzofenona) (ALMEIDA et al., 2015). Os resultados estão presentes na figura 33.

Figura 33 - *Docking* molecular do (A) ACW-02 e (B) composto 1c no alvo CPBLa



Fonte: Autoria (2024).

A análise de *docking* do ACW-02 no CPBLa (Figura 33A) possui várias interações que podem propor esse alvo para o fármaco. De início, o nitrogênio da acridina interage com o Cys25 por ligação de hidrogênio, e o anel aromático é posicionado para realizar interações de Van der Waals com o resíduo catalítico de His289. Além disso, as interações amida-empilhamento π são formadas com o resíduo Asn288 e π -alquil com Leu287 e Ala288. Finalmente, interações hidrofóbicas são observadas com resíduos de aminoácidos, como Gly151, Gly193 e Gly194. Interações semelhantes foram encontradas em análises de encaixe do composto padrão. Por fim, a pontuação do encaixe mais eficaz do ACW-02 em comparação

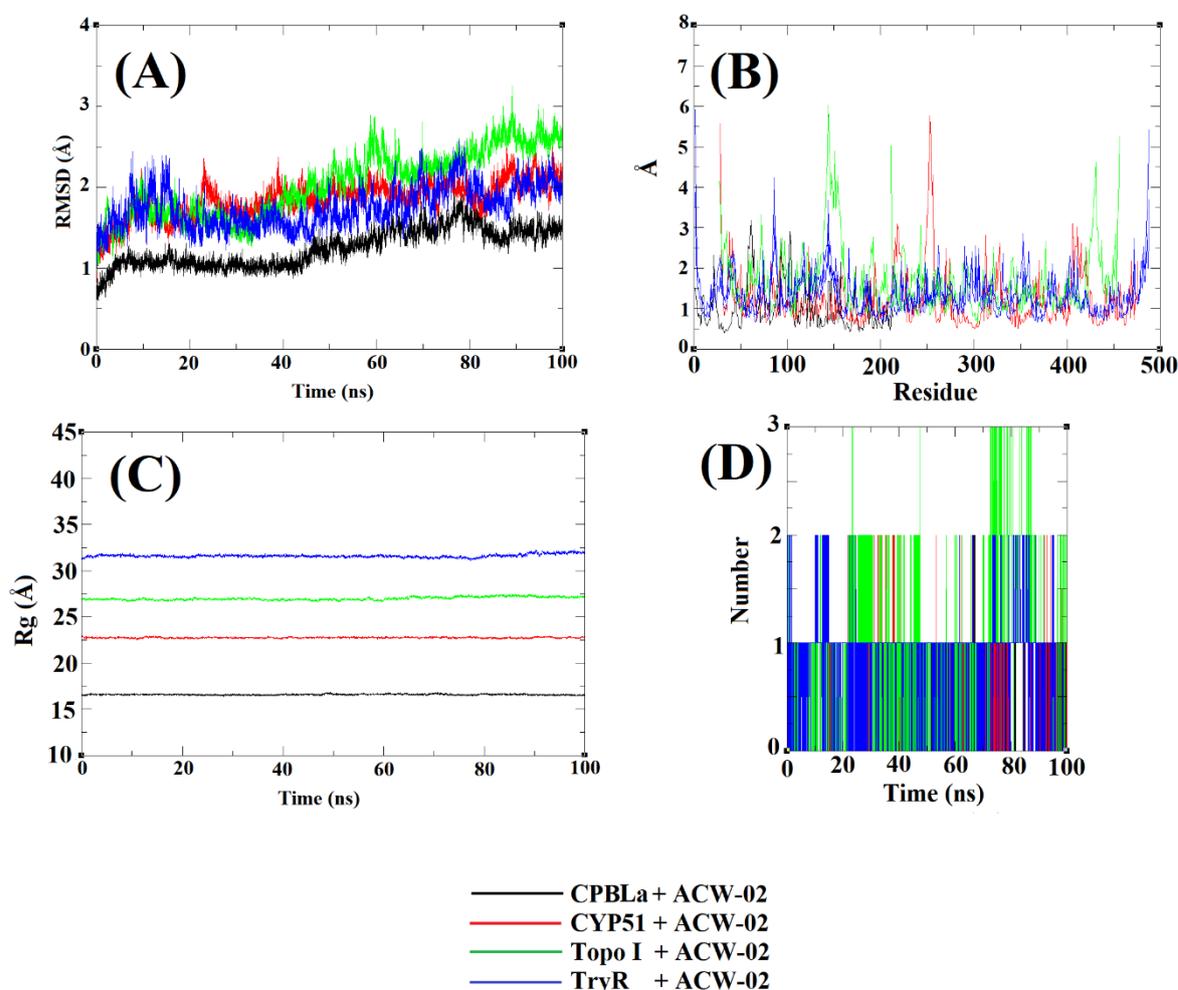
com o padrão (Figura 33B) (50,97 e 47,77, respectivamente) e as interações mais eficazes propõem o CPBLA como o possível alvo da droga.

Assim, para confirmar nossos achados, simulações de dinâmica molecular e cálculos de mecânica molecular/área de superfície de Poisson-Boltzmann (MM-PBSA) foram realizados e discutidos nos tópicos a seguir.

3.3.8 *Dinâmica molecular*

Simulações de dinâmica molecular foram realizadas em trajetória de 100 ns para confirmar o alvo da droga ACW-02. Os parâmetros avaliados foram: Raiz do desvio médio quadrático (RMSD), flutuação quadrática média da raiz (RMSF), raio de giro (Rg) e ligações de hidrogênio. Os resultados são mostrados na figura 34.

Figura 34 - Simulações de dinâmica molecular



Fonte: Aatoria (2024). Legenda: (A) gráfico de RMSD; (B) gráfico de RMSF; (C) gráfico de Rg; (D) gráfico de números de ligações de hidrogênio. Em preto estão os resultados para CPBLa, em vermelho CYP51, em verde Topo I; em azul TryR.

RMSD é o desvio observado entre dois átomos pesados para prever a estabilidade de uma proteína durante o curso da sua simulação. Quanto menores forem os desvios, mais estável a estrutura na proteína (AIER; VARADWAJ; RAJ, 2016; SNEHA; PRIYA DOSS, 2016). No gráfico de RMSD gerado em nossos experimentos (Figura 34A), é mostrado que o complexo de maior estabilidade é estabelecido pelo ACW-02 em interação com a enzima CBLa,

apresentando valores inferiores a 2 Å. Em tais experimentos, as poses são normalmente consideradas “quase nativas” se seu RMSD relativo à pose nativa for $\leq 2,0$ Å (BELL; ZHANG, 2019). Por outro lado, o complexo do composto ACW-02 com os demais alvos apresenta valores de até 3 Å.

O RMSF é a medida da flexibilidade de um átomo, ou grupo de átomos, durante o tempo de simulação, em relação a estrutura inicial. Assim, é um parâmetro útil para determinar o movimento da estrutura e determinar se há divergência em relação a estrutura inicial, pois maiores flutuações indicam que a simulação não está equilibrada. Ou seja, quanto menores as flutuações, mais estável o complexo (KHEZRI et al., 2018; MARTÍNEZ, 2015). Na figura 34B, observa-se o gráfico de RMSF dos complexos com os alvos escolhidos e esse revela menores flutuações dos resíduos para o complexo com CPBLa, sugerindo melhor estabilidade do complexo. Pode-se inferir, a partir disso, que a presença de ligantes não altera significativamente a estrutura do alvo (GORHAM; RODRIGUEZ; MORIKIS, 2014).

Por sua vez, o Rg é conceituado como a distribuição dos átomos de uma proteína em torno de seu eixo. Seu cálculo é um indicador significativo amplamente utilizado na previsão da atividade estrutural de uma macromolécula, especialmente a rigidez e compactação desta. Ao complexar com ligantes, há uma maior alteração estrutural na estrutura, levando a um maior Rg (FALSAFI-ZADEH; KARIMI; GALEHDARI, 2012; SNEHA; DOSS, 2016). Assim, na figura 34C, visualiza-se o gráfico e observa-se que, similarmente aos parâmetros previamente apresentados, a melhor compactação da proteína é vista no complexo com CPBLa (entre 15 e 16 Å), diferentemente dos demais complexos que apresentaram valores acima de 15 Å. De acordo com Idris et al. (2020), valores abaixo de 17 Å indicam maior rigidez e compactação da proteína, apresentando assim uma estrutura mais próxima a de referência.

Por fim, realizou-se a análise da quantidade de ligações de hidrogênio. Esse parâmetro prediz a força das interações realizadas na formação do complexo. Interações devido a ligações de hidrogênio desempenham um papel crucial na estabilização da macromolécula (PANIGRAHI, 2008). O composto apresentou interações por ligações de hidrogênio semelhantes ao longo da trajetória com os alvos, de modo que foram formados até 2 complexos com CPBLa, CYP51, TryR e até 3 para Topo I. Assim, esse resultado estabelece uma maior estabilidade ao complexo com Topo I por intermédio desse parâmetro.

Em conclusão, os resultados de dinâmica molecular estão de acordo com os resultados encontrados no *docking* molecular, nos quais o composto ACW-02 desempenhou melhores interações com os alvos de CBLa e Topo I. A reunião desses achados auxilia na compreensão

das variáveis envolvidas na formação do complexo fármaco-receptor e na determinação dos alvos mais interessantes para estudos posteriores. Portanto, o cálculo de MM-PBSA foi realizado para análise mais aprofundada da interação do ACW-02 com os dois melhores alvos encontrados nesses estudos.

3.3.9 Cálculos de mecânica molecular/área de superfície de Poisson-Boltzmann

O método de Poisson-Boltzmann de área de superfície é uma abordagem utilizada para estimar a energia livre da ligação (ΔG) de pequenos ligantes a macromoléculas biológicas, de maneira mais confiável e precisa, quando comparada ao *docking* molecular. A realização desse cálculo é baseada em simulações de dinâmica molecular do complexo receptor-ligante e permite, em conjunto com a determinação da energia livre, estipular outros parâmetros, como a energia da área de superfície acessível a solventes (SASA), solvatação polar, eletrostática e de Van der Waals (GENHEDEN; RYDE, 2015; WANG et al., 2019).

Assim, os cálculos de MM-PBSA, usando as simulações de MD, foram usados para reavaliar as energias de afinidades e determinar as forças atrativas envolvidas na formação dos complexos ACW-02 frente aos alvos propostos. Os resultados encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 - Energia de ligação e parâmetros de interação calculados por MM-PBSA

PARÂMETRO (kJ.mol ⁻¹)	CPBLa	2B9S (Topo I)
ΔG_{bind}	-103,127 ± 8,108	-42,171 ± 21,364
Energia de SASA	-13,148 ± 0,786	-10,663 ± 1,693
Energia de solvatação polar	61,091 ± 5,204	65,340 ± 23,628
Energia eletrostática	0,682 ± 3,597	-1,870 ± 19,594
Energia de Van der Waals	-151,752 ± 7,790	-94,978 ± 25,516

Fonte: Aatoria (2024).

Conforme previamente observado em estudos de *docking* molecular, a energia de afinidade do ACW-02 frente a CPBLa por MM-PBSA ($\Delta G_{bind} = -103,13 \text{ kJ mol}^{-1}$) foi superior ao complexo com outros alvos propostos, sendo nessa análise, em relação ao Topo I ($\Delta G_{bind} = -42,171 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Os demais parâmetros estimam a interações responsáveis pela formação e estabilização dos complexos. A partir disso, observa-se que as interações de van der Waals são essenciais para formação do complexo para ambos os alvos (-151,75 e -94,978 kJ mol⁻¹ para CBLa e Topo I, respectivamente), quando comparadas às forças eletrostáticas (0,682 e -1,870 978 kJ mol⁻¹ para CBLa e Topo I, na respectiva ordem). Para o alvo CBLa, que apresentou menor energia, ou seja, maior estabilidade por interação de van der Waals, é possível visualizar a relevância desse tipo de interação na imagem bidimensional gerada a partir do *docking* realizado (Figura 33).

Adicionalmente, observa-se que a solvatação polar (61,09 e 65,34 kJ mol⁻¹) e a energia SASA (-13,148 e -10,663 kJ mol⁻¹) apresentam baixa solvatação, indicando uma permanência maior do ligante em um ambiente hidrofóbico livre de moléculas de água.

Por fim, os resultados obtidos pelos cálculos de MM-PBSA corroboram com os resultados previamente obtidos por *docking* e dinâmica molecular e apontam o CPBLa como um dos principais alvos do derivado ACW-02. A exemplo disso, no trabalho de Eberle e colaboradores (2021), avaliou-se a capacidade da mepacrina, fármaco acridínico antiprotozoário, em inibir 3CL^{pro}, uma cisteína protease de SARS-CoV-2. Os resultados *in vitro* e *in silico* foram promissores para o reposicionamento desse fármaco, demonstrando resultados de IC₅₀ de 7,8 µM frente ao alvo e características por *docking* e dinâmica molecular que embasaram esse resultado indicando potenciais resíduos responsáveis pela interação.

Devido as propriedades imunoreguladoras da cisteína protease B de *Leishmania spp.* e sua direta atuação como um fator de virulência das espécies de *Leishmania*, podemos sugerir a atividade inibitória de ACW-02 sob essa proteína como um possível mecanismo de ação que justifique os efeitos imunomoduladores observados *in vitro*, em especial ao se analisar o efeito microbicida desse composto ao diminuir a taxa de macrófagos infectados, média de *Leishmanias* por macrófago e taxa de infecção. Estudos demostram que a supressão da expressão de cisteína proteases diminui a infectividade de diferentes espécies de *Leishmania* em diferentes modelos experimentais, em especial pela inibição do subtipo catepsina B, que torna o parasito mais suscetível a morte pelas células do sistema imune do hospedeiro (BART et al., 1997; GOMES et al., 2017; HIDE; BAÑULS, 2008; MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004).

Adicionalmente, essas enzimas são notoriamente mais abundantes em formas amastigotas por se concentrarem majoritariamente em volumosos lisossomas, denominados megassomas (PEREIRA et al., 2011; SILVA-LÓPEZ, 2010). Em concordância com essa

particularidade, nossos estudos demonstraram uma melhor inibição do ACW-02 no crescimento de formas amastigotas em relação às promastigotas, auxiliando no embasamento dessa suposição.

Desse modo, os achados *in silico* demonstram uma correlação viável com os estudos *in vitro* realizados e auxiliam na elucidação mecanística ao fornecer resultados preliminares coerentes com os previamente obtidos.

3.4 Conclusão

Os compostos derivados do núcleo acridínico compreendem promissores agentes biologicamente ativos, em especial como quimioterápico. Visando a obtenção de um derivado acridínico como potencial candidato a fármaco leishmanicida, esse trabalho se propôs a sintetizar e avaliar *in silico* e *in vitro* a atividade um derivado triazolidínico-acridínico (ACW-02). A avaliação *in vitro* do ACW-02 frente formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis* demonstrou a potencialidade do composto como um antiamastigota ($IC_{50} = 6,57 \mu\text{g mL}^{-1}$), associada a um baixo potencial tóxico e interessantemente estimulador frente macrófagos J774, ocasionando uma redução na taxa de infecção e sugerindo uma possível atividade imunomoduladora.

A fim de determinar a influência do composto diretamente nos componentes do sistema imunológico, estudos direcionados foram realizados. Entretanto, as alterações na expressão de citocinas e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio não foram conclusivas o suficiente para estabelecer o efeito imunomodulador como justificativa para a atividade antileishmania.

Desse modo, com o objetivo de elucidar possíveis mecanismos moleculares envolvidos na atividade antileishmania do composto ACW-02, foram realizados estudos teóricos de *docking* e dinâmica molecular em alvos farmacológicos essenciais para a *Leishmania* (DNA, TryR, Topo I, CPBLa e CYP51). Os resultados demonstraram melhor afinidade e estabilidade na formação do complexo do ACW-02 com Topo I e CPBLa, que são exclusivos ao parasito. Complementarmente, um estudo mais aprofundado sobre esses alvos por cálculo de MM-PBSA reafirmou o CPBLa como potencial alvo farmacológico. Esse alvo, por sua vez, se destaca por desempenhar um efeito imunomodulador, estando diretamente relacionado ao potencial virulento do parasito na relação com o hospedeiro, e pode justificar os resultados de diminuição da taxa de infecção do candidato a fármaco *in vitro*.

Assim, como perspectivas desse trabalho, novos estudos que auxiliem na elucidação mecanística que possam justificar o efeito leishmanicida do composto, seja *in silico*, *in vitro* ou *in vivo*, são visados, especialmente a fim de esclarecer *in vitro* sua atividade frente outras espécies e frente ao alvo CPB de *L. amazonensis*. Além disso, objetiva-se a expansão da série química para obtenção de novos derivados que possam se apresentar mais ativos.

4 CAPÍTULO 2 – SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS COM POTENCIAIS ATIVIDADES LEISHMANICIDA E TRIPANOCIDA

4.1 Objetivos

4.1.1 *Objetivos gerais*

Sintetizar e avaliar *in silico* e *in vitro* o potencial antiparasitário de compostos espiro-acridínicos frente tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*.

4.1.2 *Objetivos específicos*

Os objetivos específicos desse estudo envolveram:

- a) sintetizar os compostos intermediários e finais;
- b) avaliar a atividade leishmanicida das moléculas frente formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*;
- c) determinar o efeito tripanocida frente formas amastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*;
- d) avaliar a citotoxicidade dos derivados espiro-acridínicos em macrófagos RAW 264.7, células Vero, fibroblastos L929 e hemácias;
- e) determinar a interação frente DNA por meio de espectroscopia de emissão de fluorescência;
- f) realizar um estudo teórico de possíveis mecanismos de ação *in silico* por *docking* molecular e dinâmica molecular;
- g) realizar estudos de predição farmacocinética *in silico*.

4.2 Metodologia

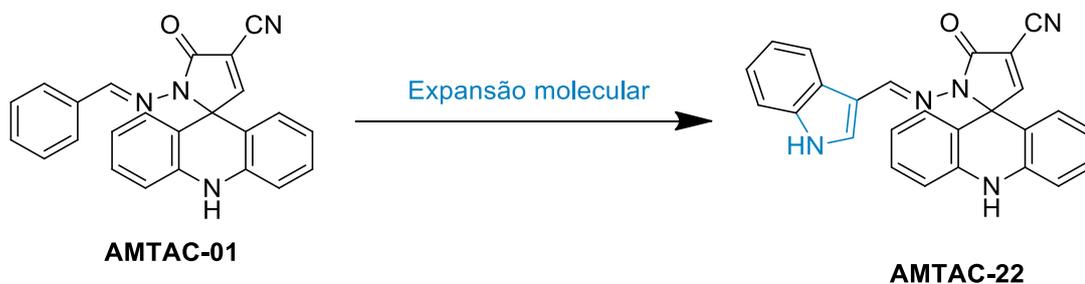
4.2.1 Delineamento da pesquisa

Compostos espiro-acridínicos compreendem estruturas farmacologicamente promissoras, apresentadas inicialmente por Almeida e colaboradores (2016), e avaliadas com direcionamento para atividades biológicas, especialmente como um agente quimioterápico (GOUVEIA et al., 2018; MENEZES et al., 2019; SILVA, D. K. F. et al., 2020; SOUSA DUARTE et al., 2020). Dentre esses estudos, ressaltamos o estudo desenvolvido por Almeida e colaboradores (2021), previamente mencionado no referencial teórico (tópico 2.4.1), no qual se avaliou a capacidade leishmanicida dessa série de moléculas e demonstrou o composto AMTAC-01 como uma das moléculas mais ativas contra formas promastigotas ($IC_{50} = 2,039 \mu\text{g mL}^{-1}$) e amastigotas ($IC_{50} = 4,964 \mu\text{g mL}^{-1}$) de *Leishmania infantum*.

A molécula AMTAC-01, por sua vez, trata-se do composto inicial da série utilizado como arcabouço para o planejamento e desenvolvimento de novos compostos espiro-acridínicos. Devido ao resultado promissor, esse foi utilizado como composto de partida para o planejamento desse estudo. Utilizando-se da estratégia de expansão molecular pela inserção de um anel pirrólico acoplado ao anel benzênico, obtendo-se o composto espiro-acridínico indólico (AMTAC-22), previamente sintetizado por Pinheiro Segundo (2020) (Esquema 3).

Diante disso, esse estudo objetivou avaliar ambos compostos frente diferentes espécies de *Leishmania sp.* e cepas de *Trypanosoma cruzi* a fim de determinar a influência da modificação molecular no efeito antiparasitário exercido.

Esquema 3 - Planejamento para obtenção do composto espiro-acridínico indólico

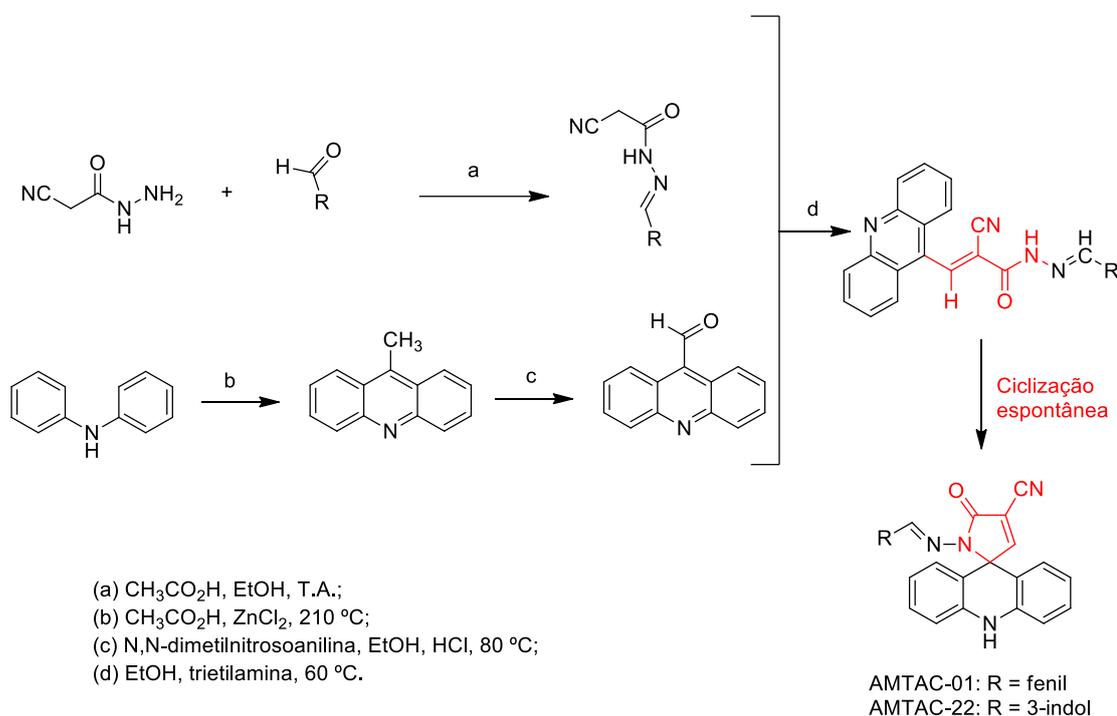


Fonte: Autoria (2024).

4.2.2 Síntese dos compostos espiro-acridínicos

A obtenção dos compostos acridínicos ocorreu por uma rota sintética do tipo paralela e convergente. A síntese iniciou pela preparação paralela dos derivados *N*-acilhidrazônicos e do núcleo acridina-9-carboxaldeído, com posterior condensação para obtenção do produto final, característico por desempenhar uma ciclização espontânea em sua estrutura (Esquema 4).

Esquema 4 - Esquema geral para obtenção dos derivados espiro-acridínicos



Fonte: Autoria (2024).

4.2.2.1 Síntese dos intermediários *N*-acilhidrazônicos (JR_s)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foram adicionados 0,1500 g de 2-cianoacetohidrazida e o respectivo aldeído, obtidos comercialmente pela Sigma-Aldrich, na equivalência molar de 1:1, em meio etanólico (7 mL) e ácido, por meio da adição de 5 gotas de ácido acético. Os aldeídos aromáticos utilizados foram os seguintes: benzaldeído e 3-indol-carboxaldeído. A reação foi deixada sob agitação magnética e temperatura ambiente, e acompanhada por meio de cromatografia de camada delgada analítica. Ao fim da reação,

realizou-se a filtração do produto, com posterior lavagens sucessivas com etanol e água destilada para purificação do produto.

4.2.2.2 Síntese do núcleo acridínico

4.2.2.2.1 Síntese da 9-metilacridina (AC-01)

Em um balão de fundo redondo de 250 mL, foram adicionados 5 g de difenilamina, 5 mL de ácido acético e aproximadamente 10 g de cloreto de zinco. A reação foi mantida sob agitação magnética e em uma temperatura de aproximadamente 210°C, durante 8 horas. Após esse período, a reação foi tratada com uma solução recém-preparada de ácido sulfúrico a 20% e, em seguida, alcalinizada com a adição de hidróxido de amônio concentrado até pH 8. O obtido após o tratamento foi, em seguida, filtrado. O retido foi purificado por solubilização em acetato de etila, que foi em seguida rotaevaporado, obtendo-se o AC-01 (Esquema 5).

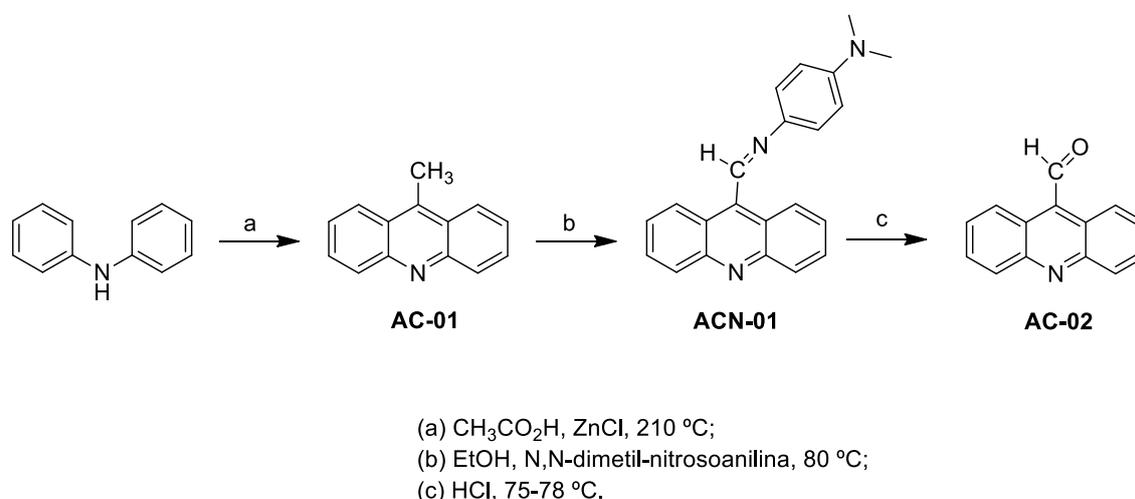
4.2.2.2.2 Síntese do *N*-(acridina-9-ilmetileno)-*N,N*-dimetilbenzeno-1,4-diamino (ACN-01)

Em um balão redondo de 250 mL, foram adicionados 0,9 g do AC-01, e 1,7646 g de *N,N*-dimetil-4-nitrosoanilina, em meio etanólico (20 mL). O sistema reacional foi deixado em agitação magnética e refluxo, a uma temperatura de aproximadamente 80 °C, durante 8 horas. Ao fim da reação, essa foi filtrada e lavada sucessivamente com etanol aquecido, obtendo-se o ACN-01 (Esquema 5).

4.2.2.2.3 Síntese da acridina-9-carboxaldeído (AC-02)

Em um balão de fundo redondo de 250 mL, foram adicionados 3 g do ACN-01 e 60 mL de HCl 6 M, em agitação magnética e aquecimento (75-78 °C), durante o período de 6 horas. Ao fim, a reação foi resfriada a temperatura ambiente e filtrada, tendo seu precipitado lavado com 50 mL de uma solução de HCl 2M, sendo novamente o precipitado solubilizado em uma solução de HCl/H₂O até pH 2. A solução foi filtrada e, a fase aquosa, adicionou-se NaHCO₃ até atingir o pH 8, ocasionando a precipitação dos cristais de AC-02 (Esquema 5).

Esquema 5 - Esquema de síntese para obtenção do núcleo acridínico



Fonte: Aatoria (2024).

4.2.2.3 Síntese dos compostos finais (AMTACs)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, adicionou-se 0,1000 g de AC-02 e o respectivo intermediário JR, na equivalência de 1:1, em meio etanólico (7 mL) e básico, pela adição de trietilamina (5 gotas). A reação foi deixada sob agitação magnética e a temperatura de refluxo do etanol (aproximadamente $78\text{ }^\circ\text{C}$), sendo acompanhada por meio de cromatografia de camada delgada analítica. Ao fim da reação, realizou-se a filtração do produto, com posterior lavagens sucessivas com água destilada para sua purificação.

4.2.3 Determinação de pureza dos compostos sintetizados

A pureza dos derivados espiro-acridínicos foi determinada por pureza de pico em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A separação cromatográfica foi realizada com um cromatógrafo líquido Perkin® Elmer Flexar equipado com uma bomba quaternária 200 Q/410 e um detector de matriz de diodo LC 200 (DAD). A fase estacionária consistiu de uma coluna Waters® Symmetry® C-18 ($250 \times 4,6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) mantida a $30\text{ }^\circ\text{C}$. Os eluentes foram água (10%) e (B) metanol (90%). Os cromatogramas foram adquiridos a 270nm. a pureza de pico foi determinada pelo software IRIS - Spectral Processing Software.

4.2.4 Avaliação da atividade antileishmania frente *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*

4.2.4.1 Avaliação da atividade antipromastigota

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/00LTB 0016) e *Leishmania infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263), que expressam o gene da beta-galactosidase de *E. coli* (SILVA SANTOS et al., 2019), foram mantidas a 26 °C em meio Schneider (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, hemina (2,5 µg mL⁻¹), 1% de antibióticos (100 UI mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina) e 50 µg mL⁻¹ de higromicina. Parasitos em fase exponencial de crescimento foram empregados em todos os procedimentos experimentais.

Para a avaliação da atividade leishmanicida sobre as formas promastigotas, os parasitos foram contados e diluídos em meio Schneider's suplementado, numa concentração de 1 x 10⁶ promastigotas/mL (1 x 10⁵ promastigotas/poço) e incubados durante 72 h, numa temperatura de 26°C, na presença de diferentes concentrações dos compostos espiro-acridínicos (0,78 a 100 µg/mL). Como controle, foram utilizados parasitos incubados apenas com meio de cultura, meio de cultura sem parasitos e meio de cultura contendo os compostos. Após o período de incubação, foi adicionada a solução de CPRG (clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo), seguida de nova incubação por 10 minutos, a 22°C. A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC.

A ação leishmanicida dos compostos foi avaliada mediante a redução da atividade da beta-galactosidase nas culturas tratadas em comparação com a cultura controle sem tratamento. A anfotericina B foi empregada como controle positivo. Os valores de IC₅₀ foram determinados por meio de análise de regressão não linear utilizando o *software* Prisma Graphpad 8.0.1. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

4.2.4.2 Avaliação da atividade anti-amastigota

A determinação da atividade sobre formas amastigotas foi realizada por meio da infecção de macrófagos RAW 264.7 (0,2 x 10⁵ células/poço) com formas promastigotas infectantes (15 parasitos/célula) e tratados com os compostos em teste. Após um período de 24 horas, o substrato CPRG foi adicionado e a quantificação da inibição do crescimento parasitário foi realizada por meio de espectrofotometria. A concentração que inibe 50% do crescimento do

parasito (IC₅₀) foi o parâmetro utilizado para estimar a inibição do crescimento, e foi determinada a partir dos valores de inibição do crescimento por meio de análise de regressão não linear, utilizando o *software* Prisma Graphpad 8.0.1. A anfotericina B foi empregada como controle positivo. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.2.5 Avaliação da atividade tripanocida

4.2.5.1 Avaliação da atividade sobre células de vertebrado infectadas com Trypanosoma cruzi

O ensaio da beta-galactosidase, conforme descrito por Buckner e colaboradores (1996) e modificado por Romanha et al. (2010), foi empregado para avaliar o efeito tripanocida dos compostos sobre as formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* de forma simultânea. Este método utiliza a cepa Tulahuen de *T. cruzi*, a qual expressa o gene da beta-galactosidase de *Escherichia coli*.

Para a condução dos ensaios, fibroblastos de camundongos da linhagem L929 foram semeados em placas de 96 poços e incubados duante o período de 24 horas a 37° C para permitir a adesão e a subsequente infecção com 10 parasitos/célula. Após 2 horas, o meio contendo os parasitos extracelulares foi substituído por meio novo e a placa novamente incubada a 37° C por 48 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi renovado, sendo adicionados os compostos em concentrações decrescentes, a partir de 100 µg mL⁻¹, até atingir o IC₅₀. Após 96 horas de incubação, o substrato CPRG foi adicionado às amostras, que foram então incubadas a 37°C. Após um período de incubação adicional de 16 a 20 horas, a leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro, utilizando um filtro de 570 nm. O fármaco benzonidazol foi utilizado como controle positivo (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12, 1,56; 0,78 µg/mL). Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do crescimento parasitário e a IC₅₀ foi determinada por interpolação linear (HUBER; KOELLA, 1993).

4.2.5.2 Determinação do efeito sobre tripomastigotas de Trypanosoma cruzi

As formas tripomastigotas da cepa Y (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) foram obtidas a partir da infecção *in vitro* da linhagem de células L929 mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e glutamina 2 mM. A fim de avaliar o efeito tripanocida, as formas tripomastigotas foram distribuídas em placas de 96 poços, 100.000 tripomastigotas por poço, juntamente com diferentes concentrações dos compostos espiro-acridínicos (100; 50; 25; 12,5;

6,25; 3,12, 1,56; 0,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e incubadas durante 24 horas, a uma atmosfera de 5% de CO_2 , a 37°C. o indicador de viabilidade celular alamarBlue® foi adicionado em uma concentração final de 10%, e a placa foi reincubada a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO_2 por 24 a 48 horas. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro, utilizando-se dois comprimentos de onda. Como controles, foram utilizados poços contendo parasitos sem tratamento, poços contendo meio de cultura com alamarBlue® a 10%, poços contendo apenas meio de cultura e poços contendo parasitos tratados com o fármaco de referência, benzonidazol (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12, 1,56; 0,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados foram expressos como a diferença na porcentagem de redução entre os parasitos tratados e não tratados, conforme a equação sugerida pelo fabricante do alamarBlue® (Invitrogen Corporation). A concentração letal para 50% dos tripomastigotas (LC_{50}) foi determinada por interpolação linear (HUBER, W.; KOELLA, 1993).

4.2.6 Determinação da citotoxicidade

4.2.6.1 Citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7

Células RAW 264.7 foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade celular pelo ensaio do MTT ((3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5- diphenyltetrazolium bromide). As células RAW 264.7 ($0,2 \times 10^5$ unidades/poço) foram distribuídas em placas de 96 poços e incubadas durante o período de 24 horas, a 37°C e 5% CO_2 , para adesão. Os compostos AMTAC-01 e AMTAC-22 foram adicionados em oito concentrações, que variaram de 0,78 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e incubados por 48 horas. Após incubação com os compostos, adicionou-se 20 μL de MTT por poço, a 5 mg mL^{-1} em PBS. Duas horas depois, o meio de cultura foi descartado e 100 μL de DMSO por poço foram adicionados para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 570 nm. A concentração capaz de inibir a viabilidade celular em 50% (CC_{50}) foi calculada por análise de regressão não linear usando-se o *software* Prisma Graphpad 8.0.1. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.2.6.2 Citotoxicidade em células Vero

O cultivo das células Vero se deu em garrafa de culturas, em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, conservado em estufa incubadora a 5% de CO_2 a 37° C (Thermo Scientific Forma Series II Water Jacket (LBCM/CPqAM)), sendo o meio de cultura trocado duas vezes por semana.

A avaliação nessas células se deu pelo teste do MTT. As células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 6×10^5 células/poço e incubadas em atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C, durante 24 horas. Após esse período, retirou-se o sobrenadante dos poços e adicionaram-se os compostos em teste nas concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25; e 6,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, levando-se a placa para incubação durante 72 horas. Subsequentemente, retirou-se novamente o sobrenadante e, aos poços, adicionou-se a mesma quantidade de meio RPMI e 10 μL do reagente MTT, numa concentração de 5 mg mL^{-1} . Após 3 horas de cultivo, o MTT foi retirado e adicionou-se 100 μL de DMSO por poço para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada utilizando o leitor de ELISA Benchmark Plus (Bio-Rad), Califórnia, EUA (490 nm).

A concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% ($\text{CC}_{50\text{VERO}}$) das células Vero foi determinada por análise de regressão linear dos dados obtidos pelo *software* SPSS 8.0 para Windows. Cada teste foi feito em 2 experimentos independentes, com culturas distintas e em quadruplicata para cada experimento.

4.2.6.3 Citotoxicidade em fibroblastos L929

As células L929, mantidas em meio completo RPMI (Invitrogen) a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO_2 , foram distribuídas em placas de 96 poços ($0,04 \times 10^5$ células/poço) e incubadas por 72 horas para permitir a adesão e o desenvolvimento celular. Após esse período, os compostos (0,78 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram adicionados e as placas foram novamente incubadas a 37°C e 5% de CO_2 . Posterior as 96 horas de incubação com os compostos, 20 μL da solução de MTT a 5 mg mL^{-1} em PBS foram adicionados a cada poço. Duas horas depois, o meio de cultura foi descartado e 100 μL de DMSO foram adicionados a cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância foi medida a 570 nm. Como controle negativo, células sem tratamento foram utilizadas, e como controle de toxicidade do veículo dos compostos, foi utilizado DMSO a 1%. Todos os ensaios foram realizados em duplicata, e a concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) foi determinada por interpolação linear (HUBER; KOELLA, 1993).

4.2.6.4 Citotoxicidade em hemácias

A determinação da atividade dos compostos sintetizados em hemácias se deu em sangue periférico humano do tipo O+. Os eritrócitos foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato, ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias em volume de 80 μL . Adicionou-se a esse os derivados diluídos em concentrações seriadas num volume de 20 μL de PBS (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e realizou-se a incubação a 37° C, durante 1 hora, em estufa B.O.D. Após esse período, adicionou-se 200 μL de PBS a fim de interromper a reação, e as suspensões foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi submetido a espectrofotometria (espectrofotômetro modelo Biosystems ELx800, Curitiba, PR, Brasil) a 540 nm, a fim de determinar a atividade hemolítica.

Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e duplicata amostral. Os resultados foram expressos em concentração hemolítica média (HC_{50}) considerando o controle positivo como 100% de hemólise, e como controle negativo a ausência de composto.

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

4.2.7 Determinação do índice de seletividade

A partir dos resultados obtidos de atividade antiamastigota e antipromastigota nas cepas de *L. infantum* e *L. amazonensis*, bem como de atividade tripanocida sobre amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, estimou-se os respectivos valores de IC_{50} e LC_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento). Os testes relacionados a toxicidade efetuada pelos compostos forneceram valores de $\text{CC}_{50\text{MAC}}$ (concentração citotóxica para 50% dos macrófagos), $\text{CC}_{50\text{VERO}}$ (concentração citotóxica para 50% das células Vero), $\text{CC}_{50\text{FIB}}$ (concentração citotóxica para 50% dos fibroblastos) e HC_{50} (concentração citotóxica para 50% das hemácias).

Esses valores possibilitaram a determinação do índice de seletividade (IS) dos compostos às formas de *Leishmania sp.* e *T. cruzi* avaliadas. Para tal, realizou-se a razão entre os valores de citotoxicidade fornecidos pelos valores de IC_{50} e LC_{50} .

4.2.8 Interação com DNA

O DNA de esperma de salmão (ssDNA, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) foi utilizado para o ensaio de interação com DNA. Para preparação da solução estoque de ssDNA consistiu em tampão Tris HCl (0,1 M, pH 8,0) e ssDNA, que foi mantida a uma temperatura de 8° C por 24 horas para estabilização. Após esse intervalo, a solução foi submetida à sonicação por 30 minutos, e sua concentração foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar de 6600 M⁻¹ cm⁻¹ a 260 nm (WOLFE; SHIMER; MEEHAN, 1987). A pureza da solução de ssDNA foi avaliada pela relação entre os valores de absorbância em 260 e 280 nm, utilizando o espectrofotômetro GeneQuant 1300.

Paralelamente, a solução estoque do composto AMTAC-22 foi realizada por meio da sua dissolução em dimetilsulfóxido e, para a preparação das soluções-testes, essas foram diluídas em tampão Tris HCl (0,1 M, pH 8,0). Ademais, a solução-estoque da sonda de brometo de etídio (BE) a uma concentração de 1 mM, sendo subsequentemente diluída em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 8,0). A concentração da sonda foi ajustada para 3 µM e a do ssDNA para 30 µM. Após uma incubação de 10 minutos a 25 °C, as medições foram conduzidas em uma cubeta de quartzo retangular com um caminho óptico de 1 cm, utilizando o espectrofluorímetro JASCO FP-6300 (Tóquio, Japão). A sonda BE foi avaliada na ausência e presença do ssDNA e, posteriormente, em interação com o AMTAC-22. Esses, por sua vez, foram obtidos usando o comprimento de onda de excitação de 526 nm e a varredura de emissão entre 550-700 nm.

Os ensaios foram realizados em duplicata. As soluções foram homogeneizadas, permitindo uma estabilização de 10 minutos no sistema tamponado. Em seguida, foram submetidas à análise de fluorescência. O comportamento de supressão de emissão foi avaliado utilizando a equação (3) de Stern-Volmer (Ksv) (LAKOWICZ, 2006):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + Ksv [Q] \quad (3)$$

Os valores de F₀ e F representam as intensidades de fluorescência na ausência e na presença dos derivados, respectivamente. Por sua vez, Ksv é a constante de supressão linear e [Q] denota a concentração do composto. Assim, o gráfico da intensidade de emissão relativa (F₀/F) em função de [Q] foi empregado para determinar a constante por meio da regressão linear do gráfico. Os dados de ligação foram obtidos utilizando o *software* OriginPro 8.5.

4.2.9 Estudo in silico de ancoragem molecular

A fim de efetuar os estudos *in silico* de *docking* molecular, as seguintes estruturas cristalográficas foram selecionadas: DNA (PDB ID: 1Z3F e 102D), esterol 14-alfa dimetilase de *L. infantum* (PDB ID: 3L4D) e de *T. cruzi* (PDB ID: 3KSW), tripanotiona redutase de *L. infantum* (PDB ID: 2JK6) e de *T. cruzi* (PDB ID: 1GXF), triosefosfato isomerase de *L. mexicana* (PDB ID: 1IF2) e *T. cruzi* (PDB ID: 1CI1), topoisomerase I de *L. donovani* (PDB ID: 2B9S) e topoisomerase 2 de *T. cruzi* (PDB ID: 8GCC), cisteíno protease B de *L. amazonensis* e cruzaina de *T. cruzi* (PDB ID: 1AIM). Os alvos foram obtidos do Research Collaboratory of Structure Bioinformatics Protein Data Bank, com exceção do cisteíno protease B de *L. amazonensis* (CPBLA), cujo o modelo da estrutura cristalográfica foi desenvolvido por modelagem por homologia, conforme apresentado anteriormente no tópico “3.2.8.1 Modelagem por homologia”.

Semelhantemente ao exposto no tópico “3.2.8.2 Docking molecular”, devido à escassez de modelos tridimensionais específicos para as espécies de *Leishmania* avaliadas *in vitro* (*L. amazonensis* e *L. infantum*) e baseando-se na homologia da estrutura primária e a conservação genética entre essas espécies (TSCHOEKE et al., 2014), alvos pertencentes às espécies *L. mexicana* e *L. donovani* foram incluídas nesse estudo.

Os compostos espiro-acridínicos tiveram suas estruturas desenhadas e cálculos de conformação realizados no *software* MarvinSketch 23.16. Subsequentemente, esses foram submetidos a cálculos de otimização geométrica no *software* ArgusLab 4.0.1. Posteriormente, as estruturas foram submetidas a simulação através do programa Gold 5.8.1, no qual os resultados foram expressos como *fitness score*. As interações formadas foram analisadas com auxílio do Discovery Studio R7 Client.

Aos alvos obtidos complexados a ligantes co-cristalizados, foi realizada a redocagem como método de validação. Esse método consiste em submeter o ligante co-cristalizado com o alvo em questão aos estudos de *docking* molecular e observar se as interações com os resíduos de aminoácidos chave e a orientação espacial do ligante são preservados, de modo a comprovar a capacidade preditiva do modelo *in silico*. Um baixo valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*), igual ou abaixo de 2,0 Å, é amplamente aceito como a distinção entre o sucesso e o fracasso em reproduzir um modo de ligação conhecido (YUSUF et al., 2008). Desse modo, neste trabalho foi aceito como metodologia validada todo resultado que apresentar valor de $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$.

4.2.10 Simulação de dinâmica molecular

Após a obtenção dos resultados de *docking* molecular, os complexos do AMTAC-01 nos alvos CPBLa e topoisomerase 1 de *L. donovani* (PDB ID: 2B9S), juntamente com os do composto AMTAC-22 com as estruturas cristalizadas de CYP51 de *T. cruzi* (PDB ID: 3KSW) e triosefosfato isomerase de *T. cruzi* (PDB ID: 1CI1) foram submetidos a simulações de dinâmica molecular utilizando o *software* GROMACS®. A metodologia utilizada para a realização desse estudo teórico segue conforme exposto no tópico “3.2.8.3 Simulação de dinâmica molecular”.

4.2.11 Predição farmacocinética in silico

As predições farmacocinéticas foram realizadas por meio da utilização de plataformas *online*, disponibilizadas de maneira gratuita e, que apresentam graficamente resultados mais propícios para discussões e correlações. Foram esses: o SwissADME, desenvolvido pela Swiss Institute of Bioinformatics na Suíça (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) o pkCSM (PIRES, D. E. V.; BLUNDELL; ASCHER, 2015), e o XenoSite (MATLOCK; HUGHES; SWAMIDASS, 2015). Os parâmetros avaliados incluíram a predição de propriedades de absorção, log P, *druglikeness*, inibidores de isoformas de CYP450, entre outros.

4.3 Resultados e discussão

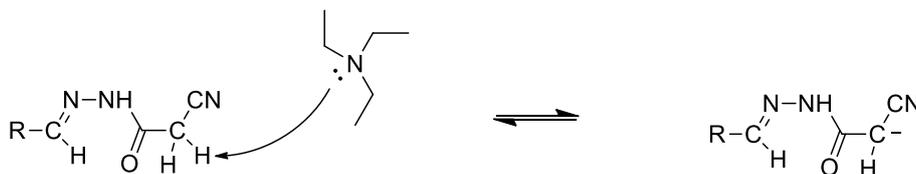
4.3.1 Obtenção dos derivados espiro-acridínicos

Os compostos AMTAC-01 e AMTAC-22, previamente sintetizados e apresentados por Almeida e colaboradores (2016) e Pinheiro Segundo (2020), respectivamente, foram ressintetizados a fim de avaliar suas propriedades antiparasitárias. Conforme descrito pelos autores previamente citados, a obtenção dos intermediários *N*-acilhidrazônicos (JR-09 e -19 para AMTAC-01 e -22, respectivamente) ocorre por um mecanismo reacional de condensação seguida de desidratação. Paralelamente, realizou-se a síntese do núcleo acridina-9-carboxaldeído, que consiste em três etapas: a obtenção da 9-metilacridina (AC-01), *N*¹-(acridin-9-ilmetileno)-*N*⁴,*N*⁴-dimetilbenzeno-1,4-diamina (ACN) e, por fim, o núcleo acridina-9-carboxaldeído (AC-02). O mecanismo reacional que justifica a formação dos produtos é bem elucidado pela literatura e é detalhadamente apresentado nos trabalhos desenvolvidos por Moura (2009) e Silva (2018).

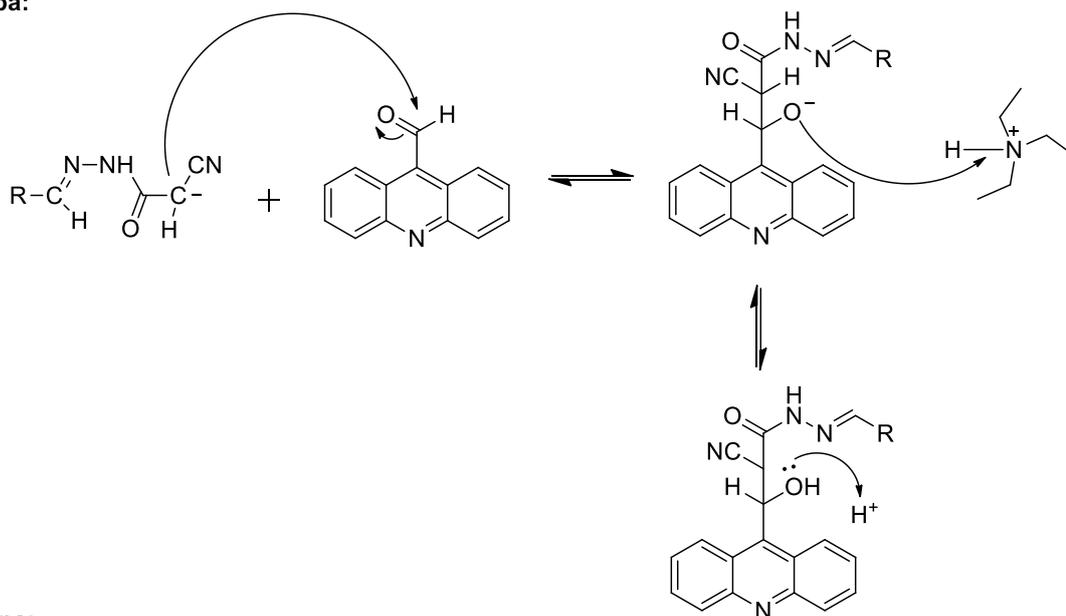
Por fim, a obtenção dos produtos finais da síntese consiste em uma reação de condensação do tipo Knoevenagel. Essa ocorre pela reação entre um composto carbonilado e outro contendo o grupo metileno ativo, que resulta na formação do aducto com ligação dupla carbono-carbono. Desse modo, a primeira etapa da reação se caracteriza pela ionização do derivado *N*-acilhidrazônico em meio básico. Nas etapas subsequentes, ocorre uma condensação seguida de desidratação, com a formação do composto que, subsequentemente, sofre uma ciclização espontânea no carbono 9 da acridina, obtendo-se os compostos finais contendo o núcleo espiro-acridínico (Esquema 6) (CUNHA; SANTANA, 2012; GOUVEIA, 2017).

Esquema 6 - Mecanismo reacional para obtenção dos derivados espiro-acridínicos (AMTACs)

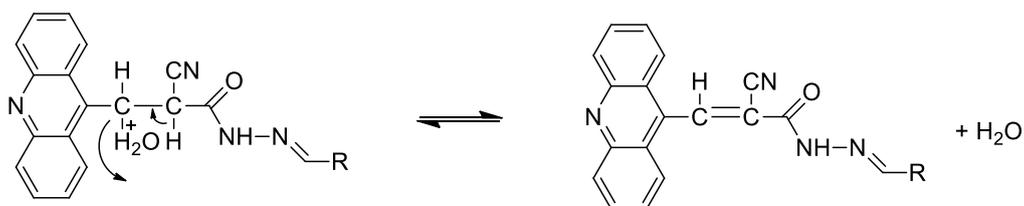
1º Etapa:



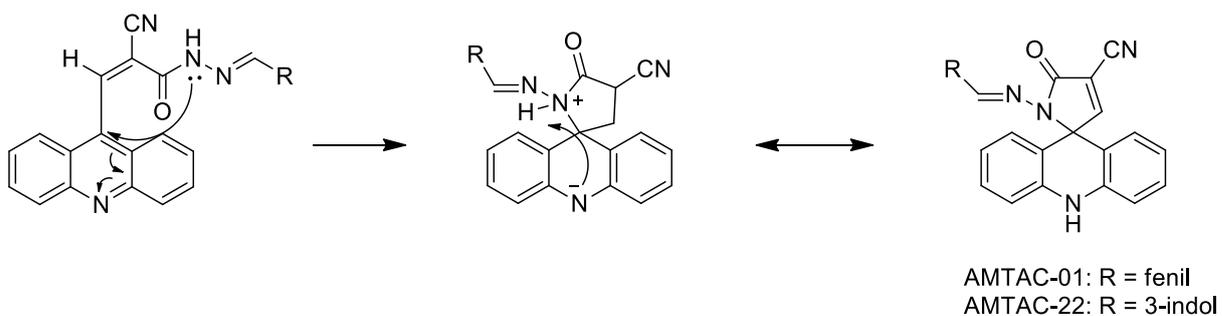
2º Etapa:



3º Etapa:



4º Etapa: Ciclização espontânea



Fonte: Adaptado de Pinheiro Segundo (2020).

Para melhor visualização das características físico-química dos derivados em estudo, segue na tabela 6 os dados obtidos e apresentados por Almeida e colaboradores (2016) e Pinheiro Segundo (2020). As informações ausentes nesses trabalhos foram investigadas em laboratório a partir dos compostos resintetizados e adicionadas a respectiva tabela.

Tabela 6 - Características físico-químicas e estruturais dos derivados espiro-acridínicos

Parâmetro	AMTAC-01	AMTAC-22
Nome químico	(E)-1'-(benzilidenoamino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila	(E)-1'-(((1H-indol-3-il)metileno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila
Fórmula molecular	C ₂₄ H ₁₆ N ₄ O	C ₂₆ H ₁₇ N ₅ O
Massa molecular	376,41 g mol ⁻¹	415,45 g mol ⁻¹
Aparência física	Pó verde	Pó amarelo
Rendimento reacional	79,82%	53,24%
Faixa de fusão	217-222 °C	267-270 °C
Log P	4,62	3,12
Espectroscopia de Infravermelho (KBr; cm ⁻¹)	3291,85 (NH), 175,12 (C=O), 1614,95 (C=N), 1486,49 (C=C).	3350 (NH), 2241 (CN), 1702 (C=O)
Espectrometria de massas (m/z)	Massa calculada: 376,1324 Massa encontrada: 377,1240	Massa calculada: 415,4461 Massa encontrada: 415,8606
Espectroscopia de ressonância magnética de hidrogênio (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	δ = 9,85 (1H, s, NH); 8,56 (1H, s, CH); 8,39 (1H, s, CH); 7,34 (4H, m, aromático); 7,27 (2H, m, aromático); 7,01 (4H, t, aromático) J = 7.6 Hz; 6.83 (2H, t, aromático) J = 7.6 Hz; 2.49.	δ = 11,49 (s, 1H, NH); 9,79 (s, 1H, NH); 8,93 (s, 1H, CH); 8,45 (s, 1H, N=CH); 7,62 (m, 2H, indol); 7,34 (m, 1H, indol); 7,26 (m, 2H, indol); 7,11 (m, 2H, espiro-acridínico); 7,05 - 6,93 (m, 4H, espiro-acridínico); 6,85 (m, 2H, espiro-acridínico).
Espectroscopia de ressonância magnética	δ = 161,30 (C=O); 161,30 (C=C espiro); 148,05 (C=N); 139,11 (=C-	; δ = 161,6 (C, C=O); 160,8 (C, C=C); 148,8 (C, Ar); 139,2 (C, Ar); 137,2 (C, Ar); 131,7 (C,

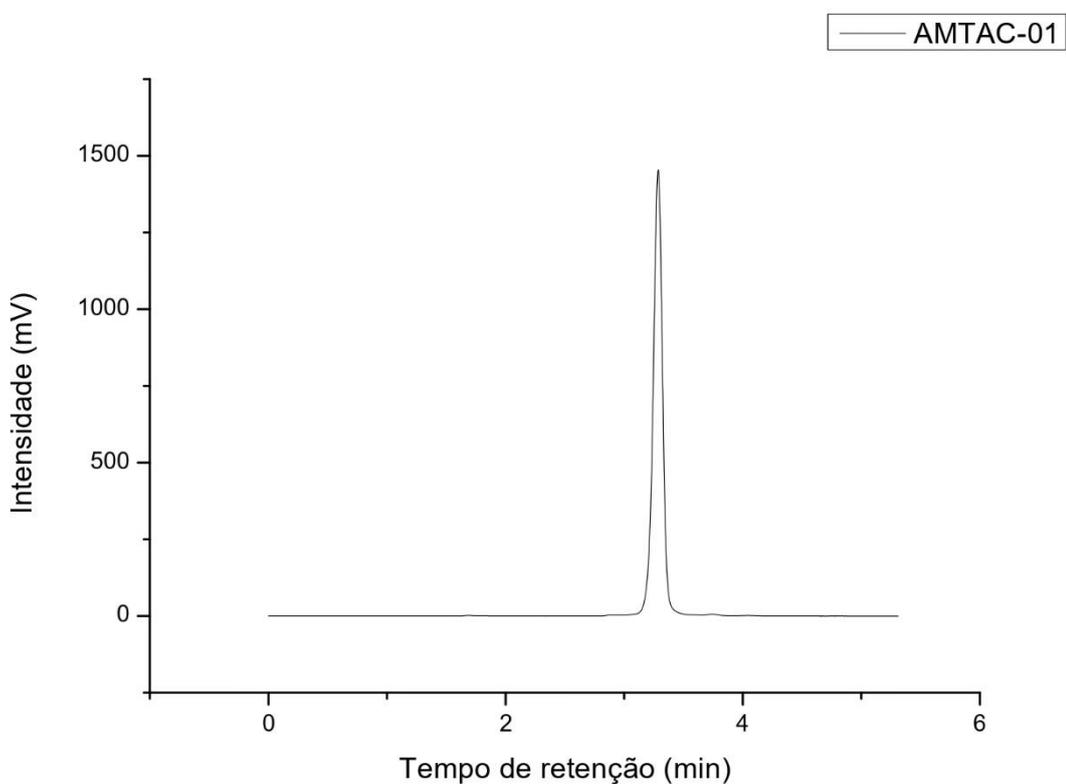
<i>de carbono (75 MHz, DMSO-d6, ppm)</i>	NH); 134,05 (C=C fenil); 131,08 (C=C fenil); 130,63 (C=C acridina); 129,33 (C=C fenil); 127,50 (C=C fenil); 127,30 (C=C acridina); 120,89 (C=C acridina); 115,44 (C=C acridina); 112,81 (C=C espiro); 111,81 (C=C acridina); 108,60 (C≡N); 69,24 (Cq).	Ar); 130,2 (C, Ar); 127,3 (C, Ar); 124,1 (C, Ar); 123,1 (C, Ar); 122,1 (C, Ar); 120,6 (C, Ar); 115,4 (C, Ar); 112,9 (C, CN); 111,8 (C, Ar); 110,0 (adjacente a CN); 69,7 (Cq).
--	--	--

Fonte: Almeida e colaboradores (2016); Pinheiro Segundo (2020); Aatoria (2024).

Adicionalmente, os compostos foram avaliados quanto a pureza por cromatografia líquida de alta eficiência para proceder para os ensaios *in vitro*. Desse modo, determinou-se a pureza do pico cromatográfico, o qual é calculado mediante a comparação dos espectros normalizados na ascensão e descida do pico, a uma altura de pico selecionada de forma global, eficientemente identificando qualquer impureza que corresponda a mais de 1% do composto principal (SOUSA et al., 2024). O equipamento utilizado (Perkin® Elmer Flexar) indica como puros os picos automaticamente calculados que resultem num valor entre 1 e 1,5.

Desse modo, o cromatograma do composto AMTAC-01 apresentou a presença majoritária de um único pico com pureza de 1,07 (Figura 35). Adicionalmente, realizando-se o cálculo manual do percentual de pureza baseando-se nos valores de área dos picos presentes em 270 nm, levando-se em consideração o pico presente no tempo de retenção de 3,29 minutos, obteve-se o valor de pureza de 98,56% (Tabela 7).

Figura 35 – Cromatograma do derivado AMTAC-01



Fonte: Aatoria (2024).

Tabela 7 - Picos da amostra de AMTAC-01 detectados por CLAE

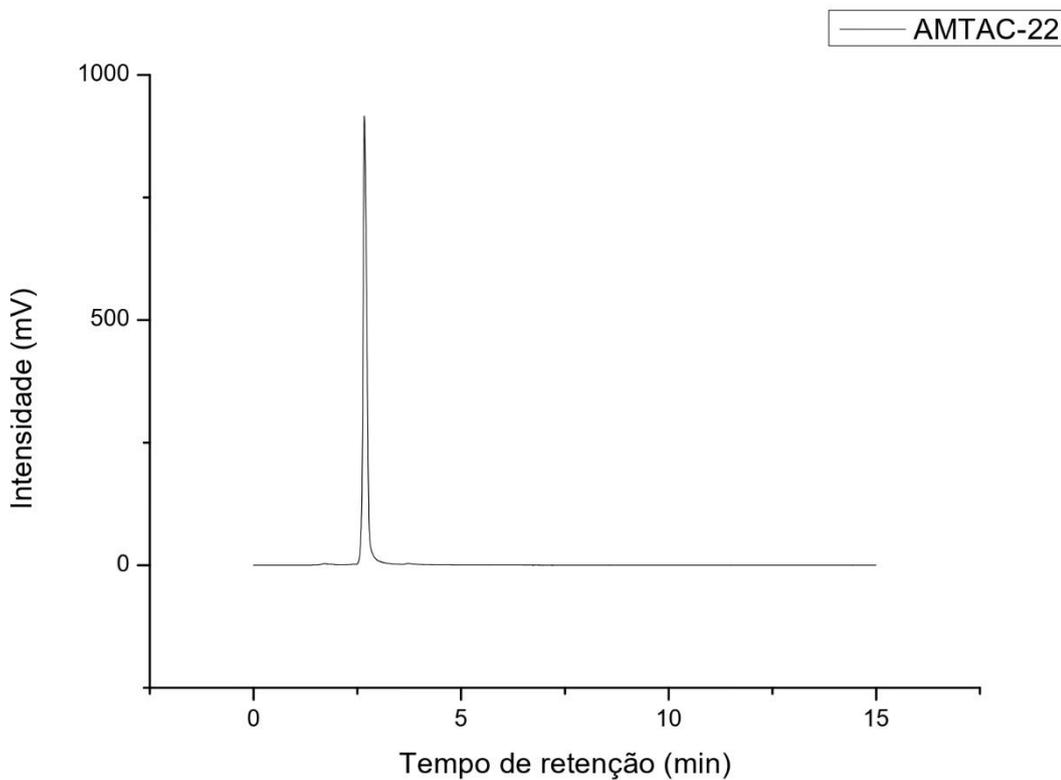
Canal	Tempo de retenção (min)	Área do pico
270:5:395:10	1,69	6748,6
270:5:395:10	2,96	26738,9
270:5:395:10	3,29	8092821,9
270:5:395:10	3,74	70486,8
270:5:395:10	4,04	14580,9

Fonte: Aatoria (2024).

A análise do AMTAC-22 revelou a presença de um pico predominante com valor de 1,27, constantando, por meio desse, a pureza da amostra (Figura 36). Adicionalmente, realizou-se também o cálculo do percentual de pureza do mesmo. Para tal, selecionaram-se as áreas dos

picos de absorção analisadas em 230 nm e determinou o pico presente no tempo de retenção de 2,67 minutos como majoritário, obtendo-se o resultado de 98,39% de pureza (Tabela 8).

Figura 36 - Cromatograma do derivado AMTAC-22



Fonte: Aatoria (2024).

Tabela 8 - Picos da amostra de AMTAC-22 detectados por CLAE

Canal	Tempo de retenção (min)	Área do pico
230:10:400:10	1.44640973	635.026019
230:10:400:10	1.70630754	21466.0462
230:10:400:10	1.75579505	7637.1391
230:10:400:10	1.84211645	7807.64224
230:10:400:10	1.89748775	8741.19652
230:10:400:10	2.39917958	10960.4564
230:10:400:10	2.67003037	6110201.01
230:10:400:10	3.72803102	42484.264

Fonte: Aatoria (2024).

4.3.2 Avaliação do potencial antileishmania

Os compostos AMTAC-01 e AMTAC-22 foram avaliados frente formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, ambas expressando beta-galactosidase pela presença do gene da β -galactosidase (β -gal) integrado em seu locus cromossômico 18S rRNA (ssu) (SANTOS et al., 2019). Essas espécies responsáveis pelas manifestações clínicas cutânea e visceral, respectivamente. A fim de determinar a seletividade dos compostos aos parasitos, esses também foram avaliados quanto a citotoxicidade em hemácias, macrófagos e células Vero. Os resultados alcançados por meio desses testes *in vitro* estão presentes na tabela 9.

Tabela 9 – Avaliação antileishmania *in vitro* dos compostos espiro-acridínicos

PARÂMETRO		AMTAC-01	AMTAC-22	ANFOTERICINA B
<i>L. amazonensis</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	IC _{50pro}	2,2 ± 0,07	1,3 ± 0	0,14 ± 0,01
	IC _{50ama}	4,3 ± 3,2	3,6 ± 2,5	0,07 ± 0,007
<i>L. infantum</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	IC _{50pro}	1,4 ± 0	1,3 ± 0	0,1 ± 0,05
	IC _{50ama}	8,8 ± 0,5	13,1 ± 1,8	0,2 ± 0,16
HC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		> 400	> 400	22,41
CC _{50MAC} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		2,4 ± 0,4	1,5 ± 0	1,5 ± 0,8
CC _{50VERO} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		0,51	0,56	97,67
IS (<i>L. amazonensis</i>)	HC ₅₀ /IC _{50pro}	> 181,8	> 307,7	160,1
	CC _{50MAC} /IC _{50pro}	1,1	1,2	10,7
	CC _{50VERO} /IC _{50pro}	0,2	0,9	697,6
	HC ₅₀ /IC _{50ama}	> 93	> 111,1	320,1
	CC _{50MAC} /IC _{50ama}	0,6	0,4	21,4

	CC _{50VERO} /IC _{50ama}	0,1	0,1	1395,2
IS (<i>L. infantum</i>)	HC ₅₀ /IC _{50pro}	> 285,7	> 307,7	224,1
	CC _{50MAC} /IC _{50pro}	1,7	1,2	15
	CC _{50VERO} /IC _{50pro}	0,3	0,4	976,7
	HC ₅₀ /IC _{50ama}	> 45,4	> 30,5	112,05
	CC _{50MAC} /IC _{50ama}	0,3	0,1	7,5
	CC _{50VERO} /IC _{50ama}	0,06	0,04	488,3

Fonte: Aatoria (2024). Legenda: IC_{50ama} = concentração capaz de inibir em 50% o crescimento das formas amastigotas. IC_{50pro} = concentração capaz de inibir em 50% o crescimento das formas promastigotas. HC₅₀ = concentração capaz de promover 50% hemólise. CC_{50MAC} = concentração citotóxica que inibe 50% da viabilidade em macrófagos RAW 264.7. CC_{50VERO} = concentração citotóxica que inibe 50% da viabilidade de células Vero. IS = índice de seletividade.

A partir da determinação do potencial leishmanicida do composto espiro-acridínicos selecionados frente as formas de *L. amazonensis* constatou-se uma boa atividade antileishmania, obtendo-se valores de IC₅₀ variando de 1,3 a 4,3 µg mL⁻¹. Nota-se, entretanto, uma maior atividade de ambos compostos frente promastigotas, com um índice de seletividade para essas formas de 1,95 e 2,77, em comparação ao resultado alcançado frente às amastigotas (IC_{50ama}/IC_{50pro}), para os compostos AMTAC-01 e -22, respectivamente. Sendo, nesse aspecto, o composto AMTAC-22 o mais ativo para ambos estágios evolutivos. Todavia, o fármaco de referência utilizado como controle positivo, a anfotericina B, apresentou inibição do crescimento parasitário em concentrações significativamente inferiores (IC_{50pro} = 0,07 µg mL⁻¹ e IC_{50ama} = 0,14 µg mL⁻¹).

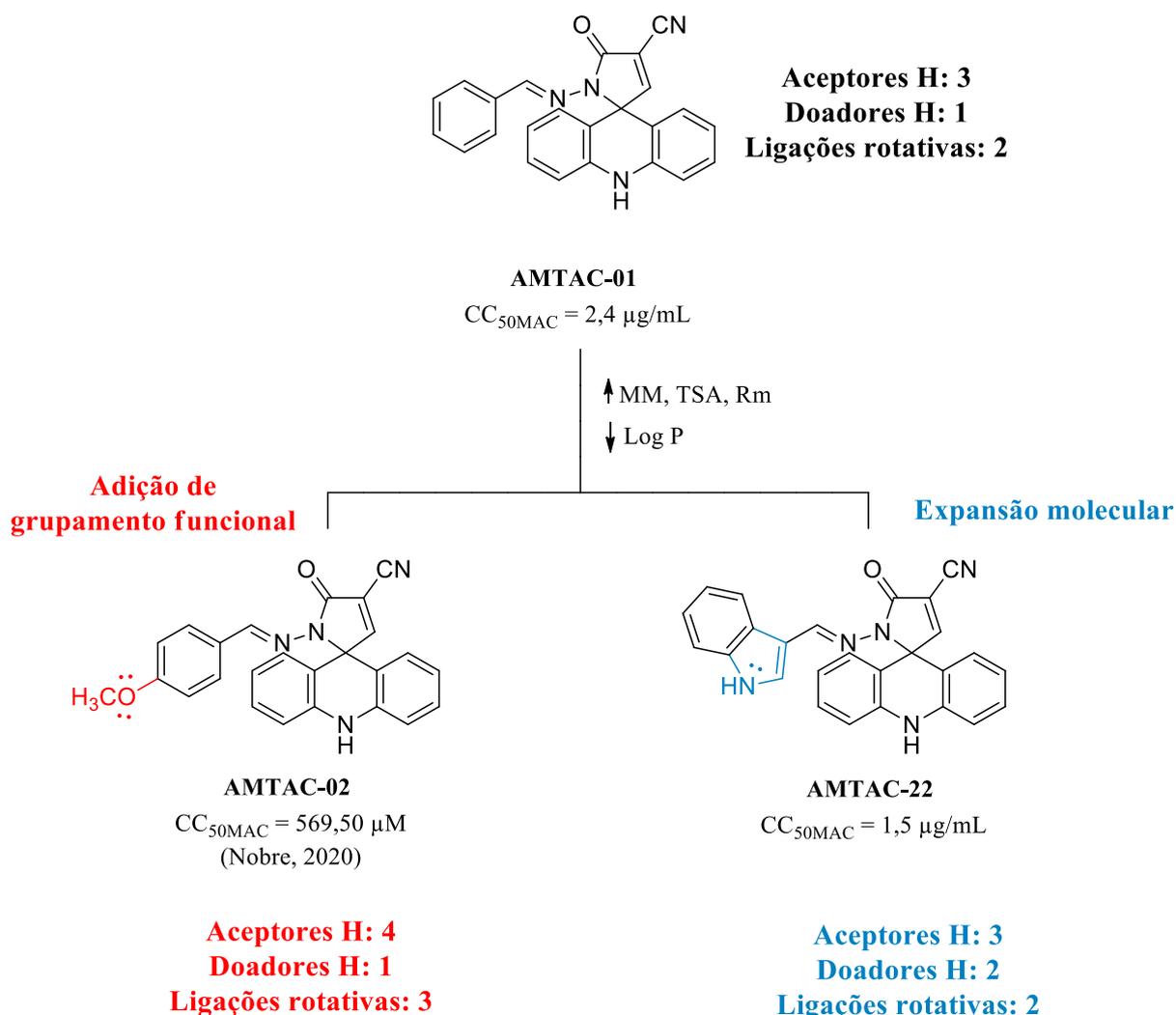
Os derivados em análise não demonstraram toxicidade às hemácias humanas na maior concentração avaliada (400 µg mL⁻¹), entretanto, ambas apresentaram considerável inibição da viabilidade celular de macrófagos (CC₅₀ = 2,4 e 1,5 µg mL⁻¹ para AMTAC-01 e -22, respectivamente) e células Vero (CC₅₀ = 0,51 e 0,56 µg mL⁻¹ para AMTAC-01 e -22, na devida ordem), resultando em baixos índices de seletividade ao parasito.

Os macrófagos, como anteriormente mencionados, são as principais células do sistema imune responsáveis pelo controle da infecção, sendo cruciais para determinação da progressão ou regressão da doença. Portanto, a inviabilização dessas células afeta diretamente na

capacidade de defesa contra o parasito pelo hospedeiro. As células Vero, por sua vez, tratam-se de células epiteliais dos rins de mamíferos, e são importantes linhagens modelo para o estudo de efeitos nefrotóxicos (FRANÇA et al., 2014). Assim, a alta toxicidade apresentada pelos espiro-acridínicos a essas células não influi diretamente na progressão da doença, mas pode ser indicativa de toxicidade às células do hospedeiro e limita consideravelmente sua administração.

Um comportamento semelhante é observado no trabalho desenvolvido por Nobre (2021) ao avaliar o derivado AMTAC-02 (-OCH₃), que constitui a mesma série de compostos acridínicos aqui apresentados. Embora diferentes cepas (MHOM/BR/PH8) e metodologias (ensaio de MTT e contagem por câmara de Neubauer) tenham sido utilizados em relação ao presente ensaio (MHOM/MA/67/ITMAP-263 e medição da expressão de β-gal, respectivamente), resultados proporcionais entre estágios do parasito para os compostos AMTAC -01, -02 e -22 foram constatados. Os resultados descritos pela autora apresentam valores de IC₅₀ de 0,73 e 13,50 μM para as formas promastigotas e amastigotas, respectivamente. Semelhantemente, o composto não apresentou hematotoxicidade (HC₅₀ > 400 μM) e indicou toxicidade às células Vero (CC_{50VERO} = 2,86 μM, IS [CC_{50VERO}/IC_{50AMA}] = 0,21). Entretanto, não demonstrou toxicidade aos macrófagos (CC_{50MAC} = 569,50 μM), diferentemente dos derivados espiro-acridínicos em estudo. Embora as diferenças estruturais sejam limitadas, determinados parâmetros podem ser ressaltados a fim de estabelecer uma relação estrutura-atividade relacionada a toxicidade em macrófagos e são apresentados na figura 37.

Figura 37 - Análise estrutural dos compostos AMTAC-01, -02 e -22.



Fonte: Autoria (2024).

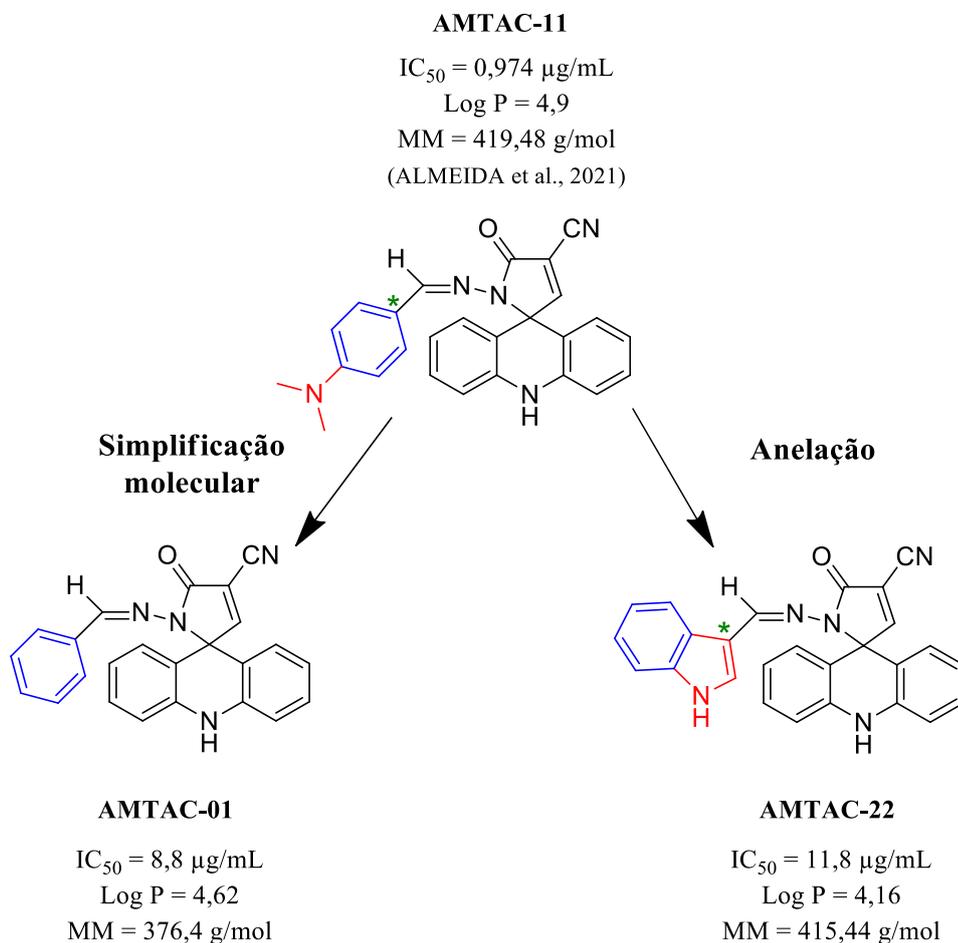
Conforme exposto na figura 37, as diferenças entre os compostos consistem na maior liberdade conformacional e na quantidade de grupamentos aceptores e doadores de ligações de hidrogênio do composto AMTAC-02 em relação aos demais. A presença de um carbono hibridizado em sp₃ adicional nessa estrutura, presente no grupamento metóxila, confere ao sistema uma menor rigidez em relação ao AMTAC-22, o que pode afetar diretamente sua capacidade de se encaixar e interagir no sítio ativo. Além disso, a inclusão do grupo funcional metóxila, por meio de um bioisosterismo não clássico a partir do AMTAC-01, proporciona à estrutura um átomo de oxigênio com dois pares de elétrons livres aptos a atuar como doadores de elétrons ou aceptores de ligações de hidrogênio.

Ainda, embora o AMTAC-22 apresente o grupamento NH no anel indólico, o qual também possui pares de elétrons livres, esses apresentam-se mais aprisionados ao sistema de ressonância do sistema aromático, tornando esse grupamento funcional predominantemente um doador de ligações de hidrogênio. Assim, essas parecem ser características estruturais importantes para a interação com os sítios de ligação presentes no macrófago, tendo em vista que a adição de um grupamento aceptor de H ao AMTAC-02, em relação ao AMTAC-01, diminuiu a toxicidade, enquanto a adição de um grupamento doador de H ao AMTAC-22, também em comparação ao AMTAC-01, tornou o derivado mais tóxico.

No que se refere à ação dos AMTACs sobre *L. infantum*, os compostos demonstraram maior afinidade sobre as formas promastigotas ($IC_{50pro} = 1,4$ e $1,3 \mu g mL^{-1}$ para AMTAC-01 e -22, respectivamente), embora também tenham se mostrado ativos contra amastigotas em baixas concentrações ($IC_{50ama} = 8,8$ e $13,1 \mu g mL^{-1}$ para AMTAC-01 e -22, na respectiva ordem). Desse modo, observa-se que os compostos apresentaram atividade antipromastigota semelhante, porém no que diz respeito à atividade antiamastigota, o derivado AMTAC-01 apresentou menor valor de IC_{50} . Entretanto, ambos compostos ainda apresentaram baixo valor no índice de seletividade para as formas morfológicas do parasito quando utilizados como parâmetro os resultados de CC_{50} em macrófagos e células Vero, e não toxicidade frente hemácias.

O artigo publicado por Almeida e colaboradores (2021) reporta a avaliação de compostos da série AMTAC frente *L. infantum* (MHOM/BR/2008/RN-0), pela metodologia de ensaio com MTT. Nesse, a melhor atividade antipromastigota e antiamastigota é atribuída ao composto AMTAC-11 ($IC_{50} = 1,109$ e $0,974 \mu g mL^{-1}$, respectivamente), sendo, portanto, esse comparável em termos de potencial antipromastigota aos derivados AMTAC-01 e -22 em análise, porém consideravelmente mais ativo contra amastigotas. Realizando-se uma breve relação estrutura-atividade com base nesses resultados (Figura 38), nota-se que, partindo do AMTAC-11, a modificação molecular não é benéfica para atividade antiamastigota.

Figura 38 - Relação estrutura-atividade dos compostos espiro-acridínicos frente amastigotas de *L. infantum*



Fonte: Aatoria (2024).

Observa-se que, em relação ao composto avaliado por Almeida et al. (2021), o AMTAC-01 apresenta como propriedade um menor Log P e massa molecular, fatores que podem exercer influência direta sobre a biodisponibilidade da molécula em questão. Além disso, a introdução de um grupamento amino terciário no anel aromático confere ao AMTAC-11 a capacidade de estabelecer uma interação adicional por meio de ligação de hidrogênio, atuando como aceptor.

Por outro lado, o AMTAC-22, além de apresentar um menor valor de Log P e MM em relação ao AMTAC-11, apresenta uma restrição conformacional e aumento do volume molecular, que podem interferir no encaixe do composto no sítio de ligação do alvo. Vale ressaltar que a alteração da posição onde ocorreu a condensação durante a formação do intermediário *N*-acilhidrazônico de cada composto pode também alterar a complementariedade

da estrutura do composto com o alvo. Como é indicado na figura 38 pela presença dos asteriscos em verde, no AMTAC-11 a condensação ocorre no anel benzênico, enquanto que no derivado AMTAC-22, acontece na porção pirrólica que compõe o anel indólico.

Além disso, como mencionado anteriormente, a presença do grupamento amina em um sistema aromático reduz a disponibilidade dos elétrons livres do átomo e, conseqüentemente, sua capacidade de exercer interações como acceptor de ligações de hidrogênio. Esses fatores combinados podem justificar o maior valor de IC₅₀ do AMTAC-22 em relação aos demais espiro-acridínicos.

Ainda em relação a AMTAC-11 avaliada por Almeida e colaboradores (2021), não é possível a realização do comparativo da citotoxicidade a células de mamíferos, tendo em vista que o trabalho não aborda o efeito em macrófagos e células Vero. Entretanto, é realizada a avaliação em PBMC e hemácias, no qual o composto não apresentou toxicidade até as maiores concentrações testadas.

Logo, os resultados obtidos demonstram a potencialidade dos compostos AMTAC-01 e AMTAC-22 como leishmanicidas, porém com importantes limitações advindas da toxicidade por esses desempenhadas. Contudo, ressalta a importância de compreender o modo de ação desses compostos a fim de contornar esses obstáculos.

4.3.3 Avaliação do potencial tripanocida

Com o objetivo de compreender mais profundamente o impacto sobre tripanosomatídeos de outros gêneros, foram realizadas investigações com compostos espiro-acridínicos frente duas cepas de *T. cruzi*, abrangendo a análise tanto em amastigotas quanto em tripomastigotas. Os resultados alcançados são apresentados na tabela 10.

Tabela 10 - Avaliação da atividade tripanocida dos compostos AMTAC-01 e -22

COMPOSTO	IC ₅₀ sobre o parasito ¹ (µg mL ⁻¹)	LC ₅₀ sobre tripomastigotas ² (µg mL ⁻¹)	CC ₅₀ sobre L929 ³ (µg mL ⁻¹)	Índice de Seletividade ⁴
AMTAC-01	2,2 ± 0,3	5,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2	0,7
AMTAC-22	2,3 ± 0,1	2,9 ± 0	1,6 ± 0,4	0,7
Benzonidazol	0,4 ± 0,07	4,6 ± 0,2	540 ± 57	1.350

Fonte: Aatoria (2024). ¹Concentração do composto que reduz o crescimento parasitário da cepa Tulahuen em 50% (amastigotas e tripomastigotas). ²Concentração do composto letal para 50% dos tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. ³Concentração do composto que inibe a viabilidade das células L929 em 50%. ⁴CC₅₀ do composto sobre as células L929 dividido pelo IC₅₀ do composto sobre o parasito (cepa Tulahuen).

A avaliação dos compostos espiro-acridínicos sobre o parasito envolve a análise da atividade desses compostos em relação aos amastigotas e tripomastigotas, que foram incubados em células do hospedeiro vertebrado, que, nesse caso, compreende os fibroblastos. Essa cepa, em específico, é sensível aos medicamentos comercialmente disponíveis. Desse modo, o benzonidazol, principal fármaco utilizado para o tratamento da doença de Chagas, apresentou um ótimo IC₅₀ de 0,4 µg mL⁻¹. Não obstante, os compostos em análise também demonstraram boa atividade antiparasitária, com valores de IC₅₀ de 2,2 e 2,3 µg mL⁻¹ para AMTAC-01 e AMTAC-22, respectivamente.

Entretanto, o mesmo padrão de toxicidade às células do hospedeiro é visualizado ao se analisar o efeito dos compostos espiro-acridínicos sobre fibroblastos L929. Os compostos demonstraram apresentar baixos valores de 1,5 e 1,6 µg mL⁻¹, resultando num índice de seletividade de 0,7 para ambos. Em contrapartida, o fármaco de referência apresenta uma maior tolerância ao resultar num valor de CC₅₀ de 540 µg mL⁻¹ frente a essas células e, conseqüentemente, num índice de seletividade de 1.350.

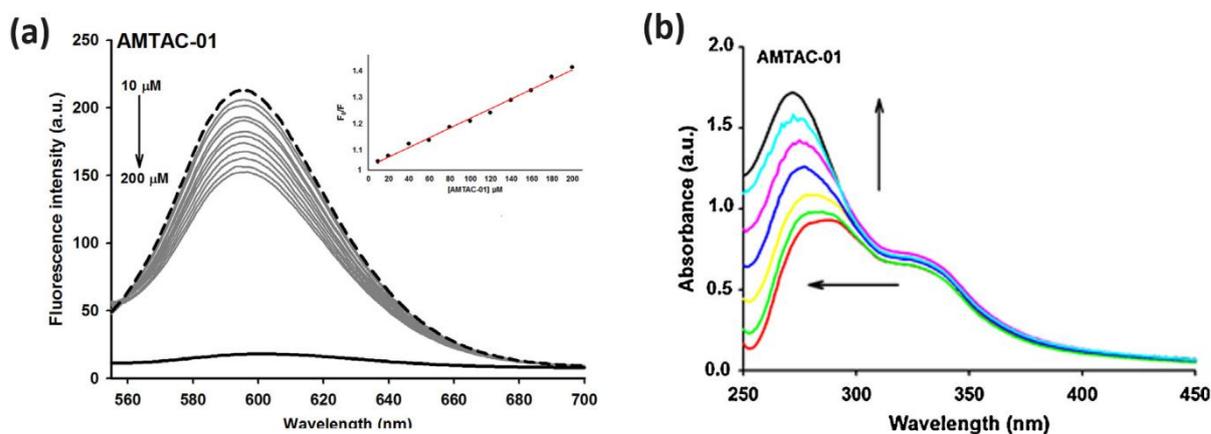
Por outro lado, ao avaliar os compostos diretamente sobre formas morfológicas de tripomastigotas isoladas, o derivado AMTAC-22 apresentou um valor de IC₅₀ mais desejável do que o benzonidazol (2,9 e 4,6 µg mL⁻¹, respectivamente). A cepa utilizada para essa avaliação caracteriza-se por apresentar média resistência ao tratamento farmacológico (DINIZ et al., 2018), o que ressalta a potencialidade do AMTAC-22 e um possível mecanismo de ação diferente aos fármacos tripanocidas.

Além disso, o composto AMTAC-22 demonstrou ser mais ativo que o arcabouço da série, o AMTAC-01. A expansão molecular resultante da modificação estrutural que originou no composto espiro-acridínico indólico pode fundamentar o estabelecimento de uma relação estrutura-atividade, considerando que a substituição do benzilideno pelo indol confere a estrutura: diminuição na lipofilia (Log P = 4,62 para AMTAC-01, e 4,16 para AMTAC-22), que pode favorecer acesso a um sítio ativo de caráter mais hidrofílico e menor deposição em regiões hidrofóbicas, além de apresentar influências na farmacocinética, como melhoria na solubilidade e difusão; aumento da massa molecular (MM = 376,4 e 415,4, para AMTAC-01 e -22, respectivamente), juntamente com o aumento no volume da estrutura, que podem favorecer o melhor encaixe da molécula no alvo, e também conferir a estrutura maior capacidade de interagir especificamente com o sítio ativo desejado; adição de um grupamento doador de hidrogênio (-NH), que, como mencionado anteriormente, podem ser importantes no estabelecimento de um complexo mais estável com o sítio ativo; dentre outras propriedades físico-químicas, como o aumento no parâmetro de área de superfície polar total e refratividade molar, e estruturais, como a alteração da disposição do anel benzênico dentro do sítio ativo.

4.3.4 Interação com DNA

A fim de determinar a capacidade do composto AMTAC-22 em interagir com DNA, avaliou-se por fluorescência a possibilidade desse deslocar o brometo de etídeo (BE), a sonda fluorescente, quando intercalado entre os pares de base do DNA. O AMTAC-01, por sua vez, foi anteriormente avaliado por Almeida e colaboradores (2016) frente ctDNA nas concentrações de 10 a 200 μM , nas quais apresentou deslocamento hipocrômico do complexo BE-ctDNA em 39% na maior concentração testada. O cálculo da constante de deslocamento de Stern-Volmer, por sua vez, resultou em um valor de $1,87 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, confirmando a interação com DNA. Adicionalmente, essa avaliação foi realizada por uma técnica complementar de absorção de UV-Vis, que confirmou os resultados anteriores e forneceu dados para o cálculo da constante de ligação (K_b), de $2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, característico de compostos que intercalam com o DNA. Segue na figura 39 os espectros para melhor visualização.

Figura 39 - Espectros de (a) fluorescência e (b) absorção de UV-Vis do AMTAC-01

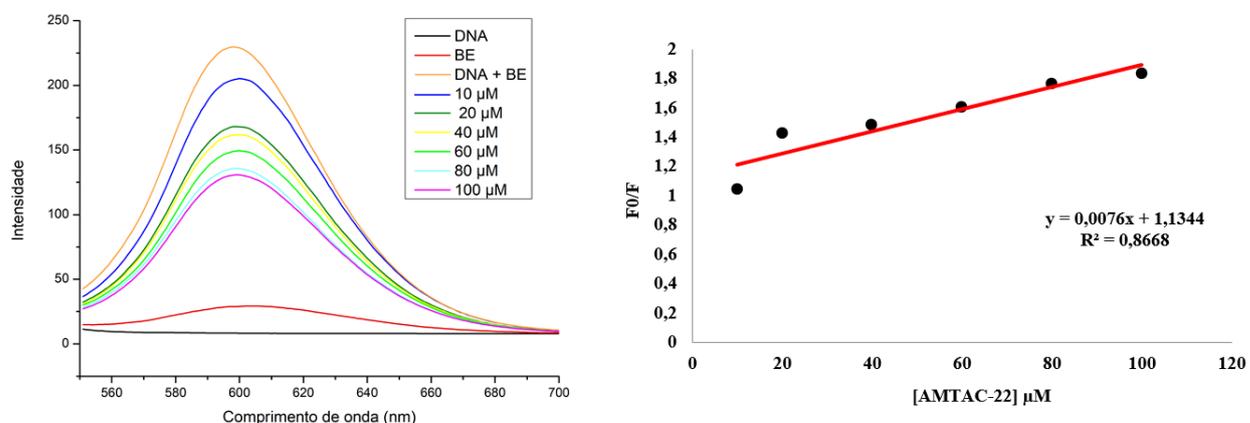


Fonte: Almeida et al. (2016).

Desse modo, tendo em vista a capacidade do derivado não-substituído em intercalar com o DNA e possivelmente apresentar esse como um dos seus possíveis mecanismos de ação, investigou-se o comportamento do derivado indólico.

O AMTAC-22 foi avaliado nas concentrações de 10 à 100 μM. Como visualizado no espectro presente na figura 40, a macromolécula isolada de DNA não emite fluorescência quando excitada, similarmente ao BE, que quando livre, não apresenta fluorescência significativa devido ao efeito de supressão pelas moléculas do solvente. Entretanto, quando estão em complexo emitem uma fluorescência intensa devido a intercalação que o BE realiza entre os pares de bases do DNA. Desse modo, ao interagir com o DNA, a molécula sob teste desloca o BE, resultando na alteração da intensidade da fluorescência do complexo DNA-BE (ALMEIDA et al., 2016; ZHANG et al., 2010).

Figura 40 - Interação do AMTAC-22 com DNA por fluorescência



Fonte: Aatoria (2024).

No espectro apresentado na figura 40, observa-se uma modificação na fluorescência do complexo DNA-BE à medida que diferentes concentrações de AMTAC-22 são adicionadas, indicando que o deslocamento aumenta com a concentração do composto. Até a concentração de 100 μM de AMTAC-22, ocorre um deslocamento de aproximadamente 56% do complexo, valor superior ao relatado por Almeida et al. (2016) para o AMTAC-01 (39% em 200 μM). Essa alteração fornece uma base para auxiliar na determinação do modo de interação do composto com o DNA, uma vez que compostos intercalantes geralmente resultam em uma diminuição na emissão de fluorescência do complexo DNA-BE em mais de 50%, enquanto valores inferiores indicam outros mecanismos de interação, como a interação com os sulcos do DNA (KHORASANI-MOTLAGH et al., 2013; LING et al., 2008).

Adicionalmente, baseando-se nos valores de intensidade de fluorescência obtidos, realizou-se o cálculo da constante de supressão fluorescente (K_{sv}) pela equação de Stern-Volmer, a partir do qual foi obtido o resultado de $K_{sv} = 1,74 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Esse valor, considerado moderadamente alto, é indicativo da força da interação formada entre o AMTAC-22 com o DNA. Para alguns pesquisadores, no entanto, o K_{sv} por si só não é conclusivo para classificar o composto como intercalante, embora o valor na ordem 10^4 seja bastante sugestivo (ALSAEDI et al., 2021; ASEMAN et al., 2019; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

Diante desses resultados, também podemos analisar a inclinação do gráfico de Stern-volmer baseando-se no modelo de equação linear, no qual o valor de R foi igual a 0,8668, representando uma boa relação linear. Isso indica um único mecanismo de extinção, seja

dinâmico ou estático (ASEMAN et al., 2019). Entretanto, de acordo com Khorasani-Motlagh e colaboradores (2013), um valor de K_{sv} de 10^4 M^{-1} é muito alto para caracterizar um deslocamento por um mecanismo dinâmico, indicando que esse seja estático. Esse tipo de mecanismo ocorre pela formação de um complexo mais estável com DNA e ocorre por modos de interação como a intercalação e interação com os sulcos (GENG et al., 2023; JOHARI-AHAR et al., 2023; ZHOU et al., 2022).

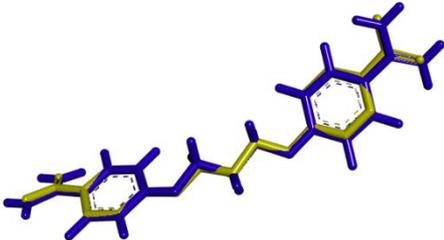
Em conclusão, os resultados do ensaio indicam que o composto AMTAC-22 interage de forma eficaz com o DNA, exibindo uma afinidade maior do que o AMTAC-01, e sugerindo um possível modo de interação por intercalação entre as bases do DNA. No entanto, essa análise não é conclusiva para esse fim, sendo necessários estudos adicionais. Desse modo, para complementar e esclarecer o possível mecanismo de interação, foram realizados estudos de *docking* molecular de ambas acridinas frente duas macromoléculas de DNA cristalizadas.

4.3.5.1 *Docking* molecular em DNA

Moléculas contendo o núcleo acridínico são classicamente classificadas como intercaladoras de DNA devido ao sistema poliaromático, assim como explanado no tópico 2.4. No entanto, no caso dos compostos espiro-acridínicos, o processo de ciclização espontânea durante a etapa de síntese dos produtos finais ocasiona a quebra da aromaticidade do anel central do núcleo acridínico, gerando uma estrutura mais flexível que, por consequência, afeta a planaridade inerente ao núcleo acridínico que é essencial para esse se interpor entre as bases de DNA e formar interações hidrofóbicas.

Assim, devido a inconclusão dos resultados *in vitro*, os estudos de *docking* molecular foram realizados utilizando dois alvos cristalizados de DNA que favorecem diferentes mecanismos de interação com a macromolécula: intercalação de DNA (PDB ID: 1Z3F) e interação com o sulco menor do DNA (PDB: 102D). A metodologia utilizada para simulação em cada alvo foi validada pelo redocking, que compreende o confronto da conformação do ligante redocado com o ligante co-cristalizado. Para ambos, o resultado de RMSD foi abaixo de 2 Å (BELL; ZHANG, 2019). Segue na tabela 11 as estruturas sobrepostas com o respectivo RMSD em cada alvo.

Tabela 11 - Validação dos alvos de DNA por *redocking*

ALVO	LIGANTE	Estruturas sobrepostas ^a	RMSD
1Z3F	Elipticina		0,47
102D	Propamidina		0,24

Fonte: Aatoria (2024). Legenda: (a) Ligante redocado em azul e ligante co-cristalizado em amarelo.

Como visto nas imagens contidas na tabela 11, a diferenciação entre os ligantes redocado e co-cristalizado foi mínima e, principalmente para propamidina, que ocorre pela rotação livre inerente as ligações de caráter sp^3 , conferindo um maior grau de liberdade a estrutura, porém mantendo-a dentro dos parâmetros de aceitabilidade. Assim, após a validação do método, os compostos foram analisados frente aos alvos escolhidos e a determinação das afinidades ocorreu pela mensuração do *Fitness Score*. Seguem na tabela 12 os resultados alcançados.

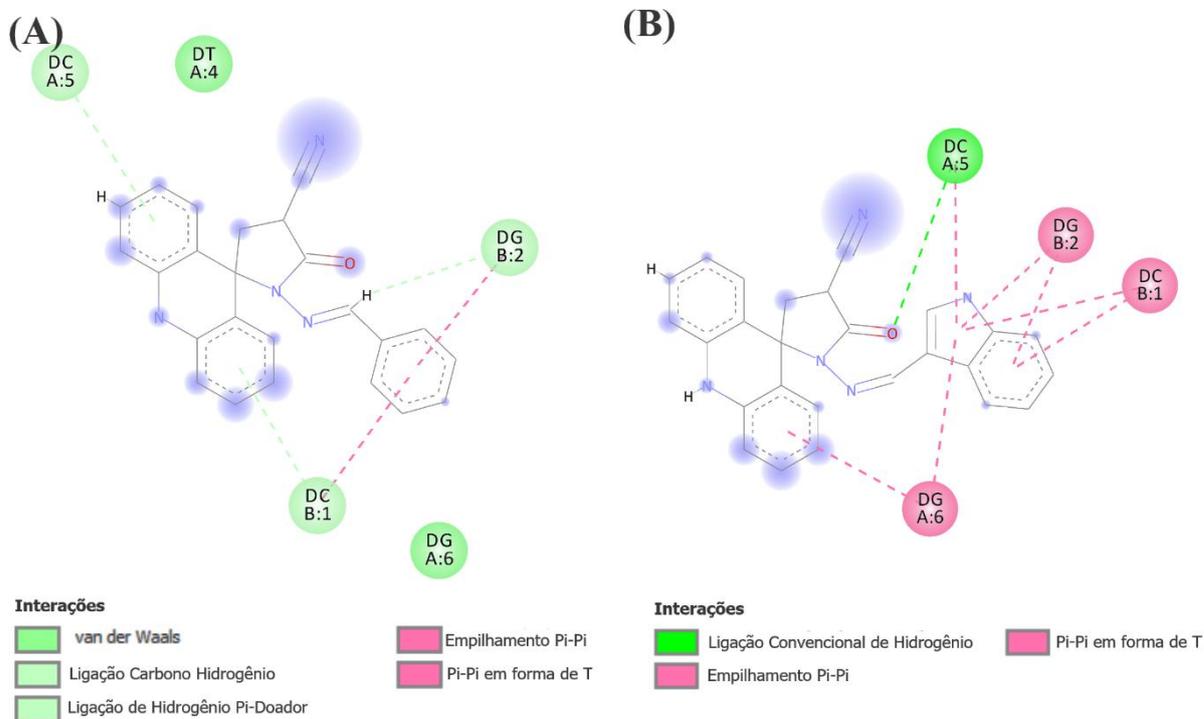
Tabela 12 - *Docking* molecular dos compostos espiro-acridínicos em DNA

COMPOSTO	1Z3F	102D
AMTAC-01	57,71	53,96
AMTAC-22	72,03	58,11
Ligante	85,43	75,82

Fonte: Aatoria (2024).

Embora nenhum dos compostos tenha apresentado um *score* superior à dos ligantes co-cristalizados, esses resultados, juntamente com as interações formadas, permitem identificar os modos de ação favorecidos. No alvo 1Z3F, a molécula de DNA adota uma conformação que facilita a inserção da molécula entre as bases nitrogenadas, levando à formação do complexo. Assim, sendo as interações hidrofóbicas as de maior importância para o estabelecimento de uma intercalação (RESCIFINA et al., 2014), observa-se, na figura 41, que o AMTAC-01 às estabeleceu duas interações de empilhamento pi-pi e pi-pi em forma de T com as bases Guanina2 e Citosina1, respectivamente. Por outro lado, o AMTAC-22 estabeleceu 6 interações desses tipos com Guanina2, Citosina1, Guanina6 e Citosina5. Essas, por sua vez, justificam o maior score apresentado pelo AMTAC-22 (72,03) em relação ao AMTAC-01 (57,71), tendo em vista que o ligante co-cristalizado, a elipticina (85,43), está envolvido na formação de 10 interações do tipo empilhamento pi-pi com as bases supracitadas (Anexo 4).

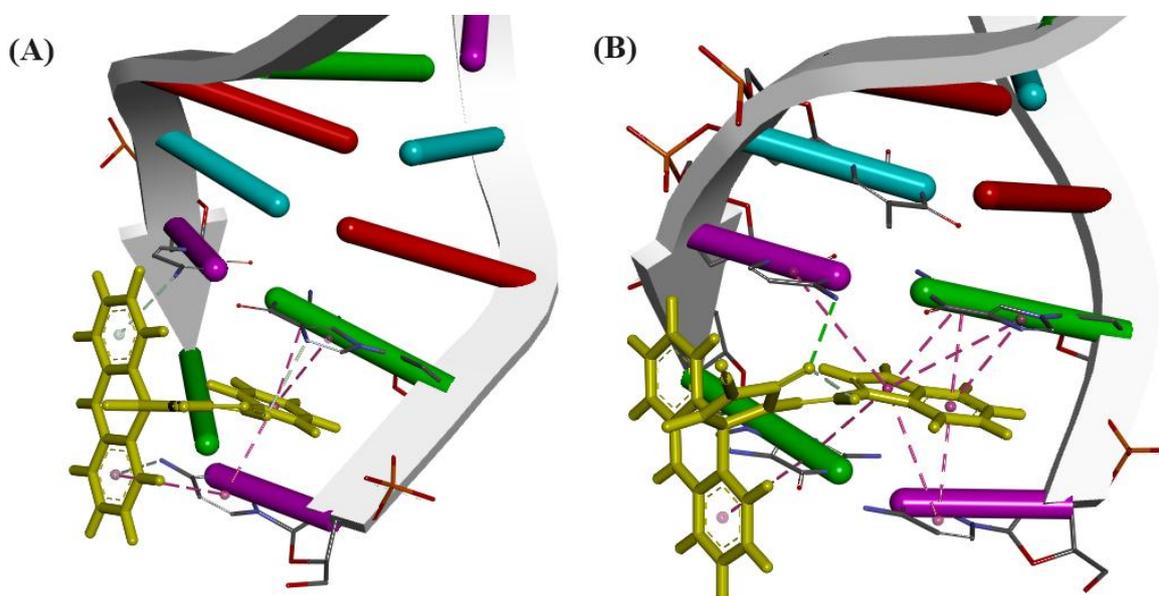
Figura 41 - *Docking* molecular dos compostos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo de DNA (PDB ID: 1Z3F).



Fonte: Autoria (2024).

Portanto, observa-se na figura 42 que ambos compostos estabilizaram o complexo por intercalação através de interações formadas pelos anéis aromáticos benzênico (AMTAC-01) e indólico (AMTAC-22), ao invés dos anéis acridínicos que, para o composto -01, desenvolveu interações do tipo ligação de carbono-hidrogênio ou ligação de hidrogênio pi-doador, possivelmente conforme o motivo supracitado. Desse modo, conforme a ancoragem molecular realizada nesse alvo, sugere-se a capacidade dos AMTACs em intercalar em DNA, porém não por intermédio do anel acridínico. Para melhor visualização do posicionamento das moléculas no alvo, segue na figura 42 os complexos na forma tridimensional.

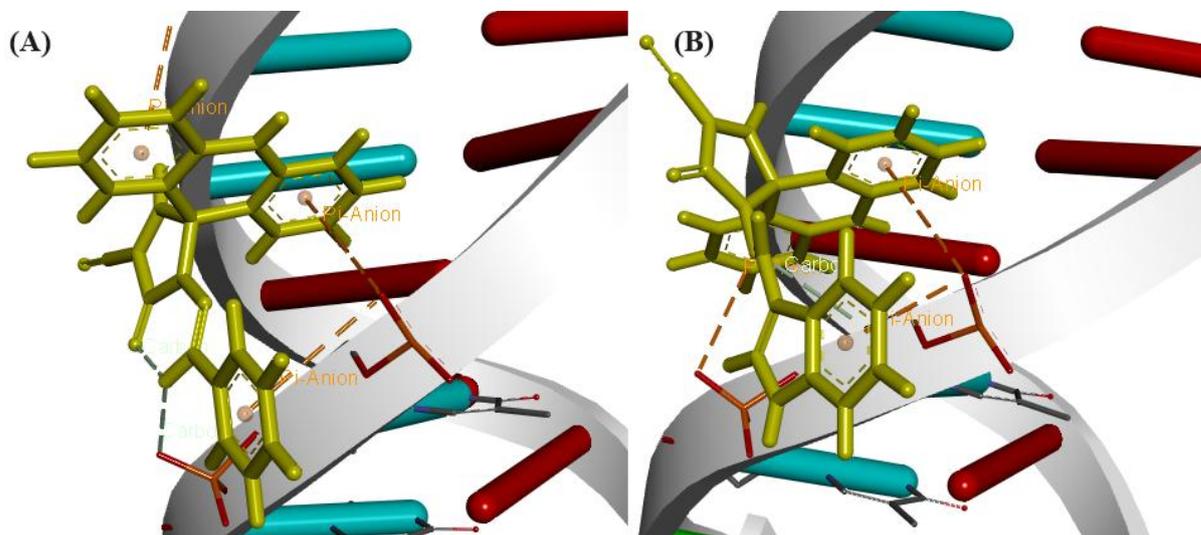
Figura 42 - Disposição dos compostos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo 1Z3F



Fonte: Aatoria (2024).

Em contrapartida, os resultados no PDB 102D, que permite analisar possíveis interações com os sulcos, os derivados espiro-acridínicos apresentam valores aproximados, de 53,96 e 58,11 para AMTAC-01 e -22, respectivamente. A partir da visualização da disposição e estabilização dessas moléculas no alvo (Figura 43), é possível observar que as interações junto às paredes dos sulcos são desenvolvidas majoritariamente pelo anel acridínico por meio de interações pi-ânion.

Figura 43 - Interações dos compostos espiro-acridínicos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 aos sulcos do DNA (PDB ID: 102D)



Fonte: Aatoria (2024).

Desse modo, de acordo com os resultados obtidos por meio da ancoragem molecular e dos ensaios *in vitro*, observamos uma concordância entre os achados e sugerimos o modo de interação do AMTAC-22 com o DNA predominantemente por intercalação, semelhantemente às conclusões obtidas por Almeida e colaboradores (2016) para o AMTAC-01 após avaliação por fluorescência e absorção no UV-Vis. Porém, ressaltamos, de acordo com o que se avaliou por meio do *docking* molecular, a possibilidade de uma concomitante interação com os sulcos devido a flexibilidade conformacional apresentada em determinadas porções da estrutura.

Semelhantemente, corroborando com os achados de intercalação pelas AMTACs, os estudos realizados por Gouveia e colaboradores (2018) demonstram o efeito de outros nove derivados espiro-acridínicos frente ctDNA pela análise da absorção no UV-Vis. Os resultados apresentados pelos autores mostram que, sete desses apresentaram valores de K_b entre 10^5 e 10^6 M^{-1} , característico de compostos intercaladores (IHMELES; OTTO, 2005), enquanto apenas o derivado AMTAC-11 apresentou um padrão mais característico de compostos que interagem aos sulcos devido a maior quantidade de átomos ionizáveis (R_3N) e carbonos sp^3 ($K_b = 1,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$). A estrutura do AMTAC-11 pode ser vista na figura 16.

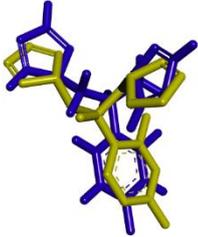
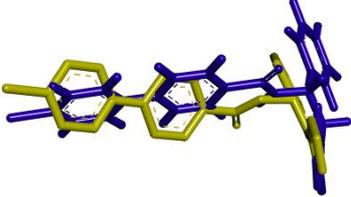
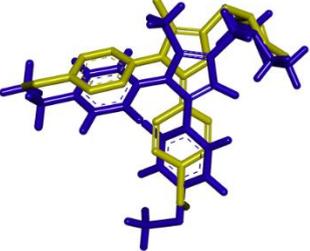
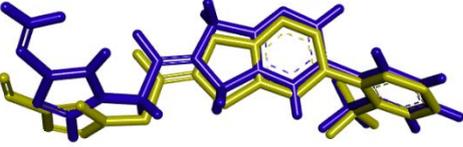
No entanto, apesar da capacidade apresentada dos compostos espiro-acridínicos de interagir com o DNA, majoritariamente por intercalação, esse mecanismo unicamente não

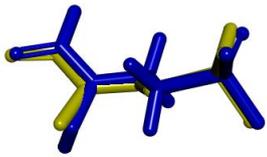
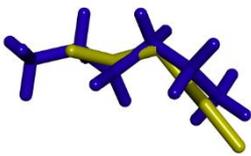
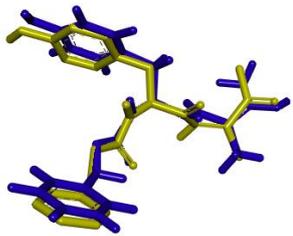
justifica a totalidade da atividade antiparasitária apresentada pelos compostos, principalmente ao avaliarmos a melhor performance dos derivados espiro-acridínicos frente determinadas espécies e estágios morfológicos. Porém, esse mecanismo pode esclarecer a toxicidade apresentada às células do hospedeiro, tendo em vista que o perfil intercalador não é seletivo entre células nucleadas.

4.3.5 Estudo teórico de possíveis mecanismos de ação

A fim de elucidar o possível mecanismo de ação que, juntamente com a intercalação ao DNA possa estar envolvido nas ações leishmanicida e tripanocida dos compostos AMTAC-01 e AMTAC-22, estudos teóricos de mecanismo de ação por *docking* molecular foram realizados. Para isso, selecionaram-se dez alvos farmacológicos essenciais para sobrevivência dos parasitos: estero1 14-alfa-dimetilase de *L. infantum* e *T. cruzi* (CYP51, PDB ID: 3L4D e PDB ID: 3KSW), tripanotiona redutase de *L. infantum* e *T. cruzi* (TryP, PDB ID: 4APN e PDB ID: 1GXF), topoisomerase 1 em complexo com DNA de *L. donovani* e topoisomerase 2 de *T. cruzi* (Topo, PDB ID: 2B9S e PDB ID: 8GCC), triose-fosfato isomerase de *L. mexicana* e de *T. cruzi* (TFI, PDB ID: 11F2 e PDB ID: 1CI1), cisteína protease B de *L. amazonensis* (CPBLa) e cruzaina de *T. cruzi* (CP57/51, PDB ID: 1AIM). Todos os alvos mencionados, com exceção do Topo de *L. donovani* e o CPBLa, apresentam em sua estrutura o ligante co-cristalizado e foram validados por meio do *redocking*, no qual apresentaram valores de RMSD de referência abaixo de 2 Å, considerados aceitáveis para o estudo (BELL; ZHANG, Yang, 2019). Assim, os valores obtidos na validação, juntamente com as estruturas dos ligantes co-cristalizado (amarelo) e redocado (azul) sobrepostas, estão presentes na tabela 13.

Tabela 13 - Validação dos alvos por *redocking*

ALVO	LIGANTE	Estruturas sobrepostas ^a	RMSD (Å)
3L4D	Fluconazol		1,52
3KSW	((4-(4-clorofenil)-N-[2-(1H-imidazol-1-il)-1-feniletíl]benzamida) (VNF)		1,79
4APN	4-[[1-(4-etilfenil)-2-metil-5-(4-metilsulfanilfenil)pirrol-3-il]metil]tiomorfolina (JV0)		1,09
1GXF	Quinacrina mostarda		1,53
8GCC	2-{3-[(Z)-iminometil]-1H-1,2,4-triazol-1-il}-1-{(3M)-3-[2-(trifluorometil)fenil]-6H-pirrol[3,4-b]piridin-6-il}etan-1-ona (CT1)		0,99

1IF2	Ácido [2(formil-hidroxi-amino)-etil]-fosfônico (IPP)		0,31
1CI1	Hexano		1,71
1AIM	Benzoil-tirosina-alanina-fluorometilcetona (ZYA)		0,66

Fonte: Aatoria (2024). Legenda: (a) Ligante redocado em azul e ligante co-cristalizado em amarelo.

Assim, havendo as metodologias sido validadas, foram realizadas as simulações de ancoragem molecular nos alvos selecionados, mensurando a afinidade do composto por um parâmetro no qual é diretamente proporcional, o *Fitness Score*.

4.3.5.1 Docking molecular nos alvos estero1 14-alfa-dimetilase (CYP51)

A afinidade dos compostos espiro-acridínicos frente ao alvo CYP51 de *L. infantum* e de *T. cruzi* foi determinada *in silico*, juntamente com os ligantes co-cristalizados (fluconazol e VNF), e os resultados estão presentes na tabela 14.

Tabela 14 - Resultados do *docking* molecular frente CYP51

COMPOSTO	<i>L. infantum</i> (PDB: 3L4D)	<i>T. cruzi</i> (PDB: 3KSW)
AMTAC-01	57,36	78,85
AMTAC-22	52,63	93,27
Ligante	67,13	80,97

Fonte: Aatoria (2024).

Os resultados observados frente ao alvo de *L. infantum* demonstram que os compostos AMTAC-01 e AMTAC-22 apresentaram boas afinidades, porém não superiores ao ligante co-cristalizado (67,13). No entanto, no alvo de *T. cruzi*, o composto AMTAC-22 se destacou devido ao seu *score* de afinidade superior ao ligante VNF (93,27 e 80,97, respectivamente), que, por sua vez, apresentou um *score* aproximado ao composto AMTAC-01 (78,85). Para melhor discussão e compreensão dos resíduos de aminoácidos envolvidos na estabilização dos complexos, segue a tabela 15.

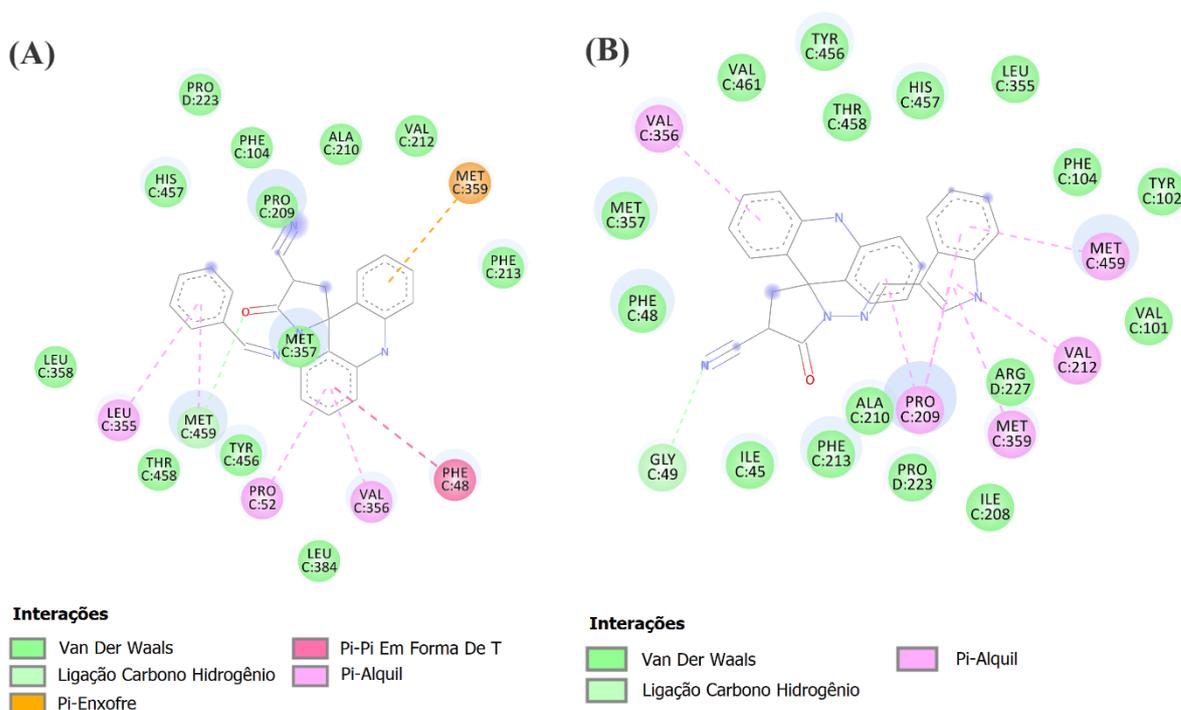
Tabela 15 - Resíduos dos alvos CYP51 que interagem com as moléculas em estudo

COMPOSTO	<i>L. infantum</i> (PDB: 3L4D)	<i>T. cruzi</i> (PDB: 3KSW)
AMTAC-01	Leu355, Met459, Pro52, Val356, Phe48, Met359.	Tyr103, Hem488, Ala291, Met106, Met460, Phe290.
AMTAC-22	Val356, Pro209, Met359, Val212, Met459.	Ala291, Hem488, Tyr103, Met106, Phe290, Val109, Leu208.
Ligante	Ala290, Thr294, Cys422, Leu355, Met459.	Val114, Met284, Ala115, Phe110, Ala287, Hem488, Leu356, Cys422, Ala291.

Fonte: Aatoria (2024).

Ao realizarmos uma análise comparativa focada nos resultados para *Leishmania*, nota-se que os compostos adotaram diferentes orientações dentro do alvo (Figura 44), favorecendo interações com diferentes resíduos de aminoácidos. Verifica-se que todos os derivados apresentam interação de seus anéis aromáticos com o resíduo Met459, porém de diferentes modos, sendo eles por: pi-alquil (AMTAC-01, distância: 4,98 Å; AMTAC-22, distância: 4,84 Å; Fluconazol, distância: 5,72 Å) e ligação de carbono-hidrogênio (AMTAC-01, distância: 2,76 Å; Fluconazol, distância: 3,43 Å). Dessa forma, é importante destacar que o AMTAC-01 e o fluconazol estabelecem duas interações com esse resíduo, contribuindo assim para a maior estabilidade do complexo. Além disso, o composto AMTAC-01 também apresenta uma interação adicional em comum com o ligante, no resíduo Leu355, as quais são estabilizadas por interações pi-alquil (AMTAC-01, distância: 5,33 Å; Fluconazol, distância: 5,30 Å) e pi-sigma (Fluconazol, distância: 5,12 Å). Portanto, esses dois resíduos parecem desempenhar um papel importante na ação proteica, e a inibição de ambas pode justificar o melhor resultado observado para o AMTAC-01 em comparação com o AMTAC-22. O *docking* do fluconazol no alvo encontra-se no anexo 5.

Figura 44 - Interações formadas por (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo CYP51 de *Leishmania infantum*

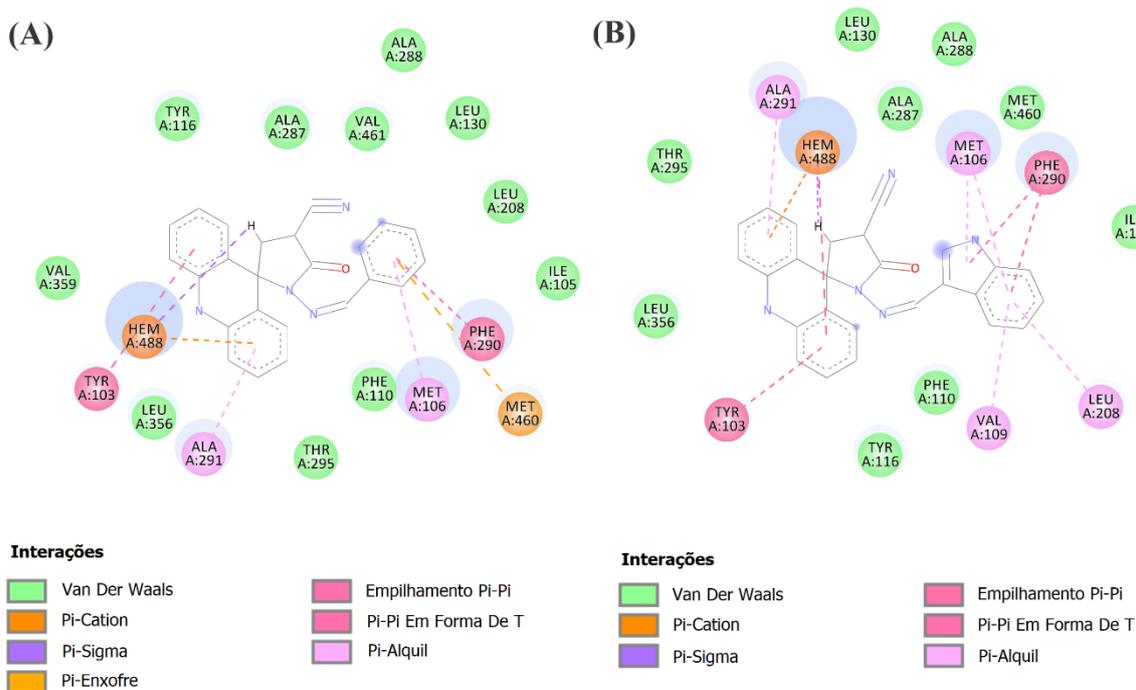


Fonte: Autoria (2024).

Além disso, podemos destacar as interações aos resíduos de aminoácidos Val356, ambos realizados pelos AMTACs por pi-alquil (distâncias 4,84 e 5,39 Å para 01 e 22, respectivamente), e ao resíduo Met359, por interação pi-enxofre pelo AMTAC-01 e pi-alquil pelo AMTAC-22.

Por outro lado, no alvo CYP51 de *T. cruzi*, os AMTACs demonstram disposições semelhantes dentro do alvo, apresentando em comum interações em quatro resíduos de aminoácidos: Tyr103, Ala291, Met106, Phe290 (Figura 45). Além disso, também é comum a todos a interação com Hem488, uma porfirina do grupo heme constitutiva a proteína (LEPESHEVA et al., 2010), no qual são realizadas as seguintes interações: AMTAC-01 (pi-cátion, pi-sigma), AMTAC-22 (pi-cátion, pi-sigma e empilhamento pi-pi) e o ligante co-cristalizado VNF (duas interações pi-alquil). O VNF se posiciona de modo diferente no alvo, apresentando, em comum com os AMTACs, duas interações com aminoácido Ala291, sendo uma pi-alquil, igualmente aos AMTACs, e outra por ligação de carbono-hidrogênio.

Figura 45 - Interações dos compostos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo CYP51 de *T. cruzi*



Fonte: Autoria (2024).

Para o composto AMTAC-22, observa-se a formação de diversas interações por intermédio do anel indólico presente na sua estrutura, o qual interage com Met106 por meio de duas interações pi-alquil (distâncias: 4,31 e 4,17 Å), Phe290 por duas interações de empilhamento pi-pi (distâncias 4,30 e 3,82 Å), Leu208 por pi-alquil (distância: 5,15 Å) e Val109 por pi-alquil (distância: 5,05 Å). Ressaltando que, interações com Met106 e Phe290 também são realizadas pelo anel benzilidênico do AMTAC-01, porém em menor quantidade e maior distância (5,75 e 5,11 Å, respectivamente). Portanto, infere-se que a substituição de anéis foi benéfica para inibição *in silico* do CYP51 de *T. cruzi*, de modo a torná-lo um alvo promissor para atividade tripanocida evidenciada pelo composto nos estudos *in vitro*.

4.3.5.2 *Docking* molecular nos alvos tripanotiona redutase

O estudo teórico da atividade frente ao alvo tripanotiona redutase de *L. infantum* e *T. cruzi* foi determinada para os compostos em avaliação a partir da obtenção das enzimas cristalizadas no Protein Data Bank, juntamente com seus ligantes. Os resultados obtidos após a simulação encontram-se na tabela 16.

Tabela 16 - Resultados do *docking* molecular frente TryR

COMPOSTO	<i>L. infantum</i> (PDB: 4APN)	<i>T. cruzi</i> (PDB: 1GXF)
AMTAC-01	68,98	74,34
AMTAC-22	79,52	89,95
Ligante	89,24	89,29

Fonte: Aatoria (2024).

Os *scores* alcançados quando avaliados frente o alvo de *L. infantum* mostram que os compostos AMTACs não apresentaram uma afinidade tão expressiva quanto o derivado pirrólico JV0. Esse ligante é composto por numerosas ligações simples que conferem a estrutura uma liberdade conformacional, diferentemente dos compostos espiro-acridínicos (Anexo 7). Apesar disso, determinados resíduos de aminoácidos pertencentes ao sítio ativo são alcançados pelos átomos constituintes das estruturas químicas em estudo, possibilitando a formação de interações com todos os compostos em análise. Para melhor visualização, segue a tabela 17.

Tabela 17 - Resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações com os alvos de TryR

COMPOSTO	<i>L. infantum</i> (PDB: 4APN)	<i>T. cruzi</i> (PDB: 1GXF)
AMTAC-01	Tyr110, Cys52	Trp22, Met114
AMTAC-22	Tyr110, Ser14, His461, Glu466	Trp22, Met114, Glu19
Ligante	Met113, Tyr110, Cys52, Ile106, Leu399	Trp22, Met114, Thr118, Asp117

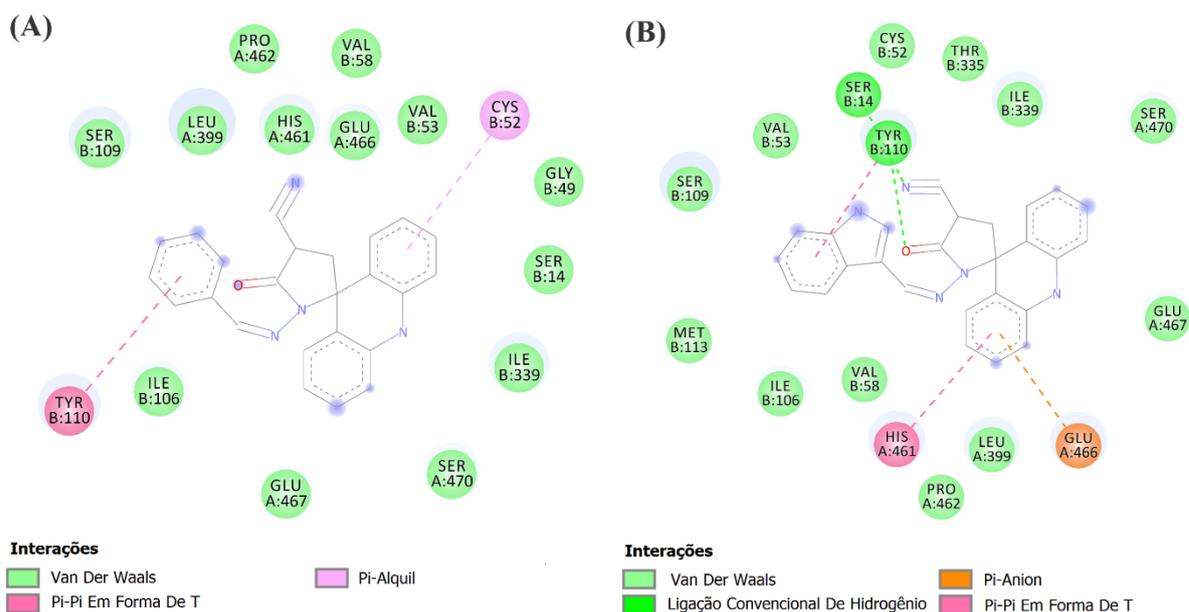
Fonte: Aatoria (2024).

Constata-se que a interação com o Tyr110 ocorre para os três compostos, pela formação de interações pi-pi em forma de T (AMTAC-01, AMTAC-22 e JV0) e ligação convencional carbono hidrogênio (AMTAC-22). Esse aminoácido, por sua vez, é ressaltado na literatura como de importância para formação de complexos fármaco-receptor e é de essencial importância para ligação do co-fator enzimático, o FAD. Portanto, TryR é dependente de FAD e a utilização do seu sítio de ligação na enzima como alvo farmacológico é uma estratégia viável, pois a ligação de um fármaco antagonista ao local inviabiliza a atividade enzimática oxidorrredutora (BAIOCCO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2012; VENKATESAN; SHUKLA; DUBEY, 2010).

Adicionalmente, a interação com o resíduo Cys52 ocorre por meio de uma interação pi-alquil para o derivado AMTAC-01, e por duas interações do tipo pi-enxofre pelo ligante JV0. Esse aminoácido, por sua vez, é reportado como essencial para enzima (ALMEIDA et al., 2021; APUY et al., 2004; OTERO et al., 2006).

Desse modo, apenas os dois resíduos de aminoácidos supracitados estiveram presentes no complexo formado com o AMTAC-01 que, embora essenciais, transparecem em seu valor de *score* (68,98) inferior em relação aos demais. O AMTAC-22, por sua vez, assumiu um diferente posicionamento no alvo e a capacidade de interagir com outros aminoácidos (Ser14, His461 e Glu466) por interações de van der Waals, pi-anion e pi-pi em forma de T, alcançando um valor de pontuação melhor (79,52), porém não superior ao ligante co-cristalizado (89,24) (Figura 46).

Figura 46 - Interações formadas entre (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo 4APN



Fonte: Aatoria (2024).

No que se refere ao alvo TryR de *T. cruzi*, essa enzima apresenta uma relevância significativa como alvo quimioterápico. Embora essa enzima seja comum a outros parasitos, o *T. cruzi* não possui a enzima glutatona redutase, portanto, para manter um ambiente intracelular redutor, o TryR é responsável por preservar seus principais tióis, bis-(glutationil) espermidina [tripanotiona (T(SH)₂)] e mono (glutationil) espermidina (Gsp), em seu estado tiol (MEIERING *et al.*, 2005; PRESTI, LO *et al.*, 2015).

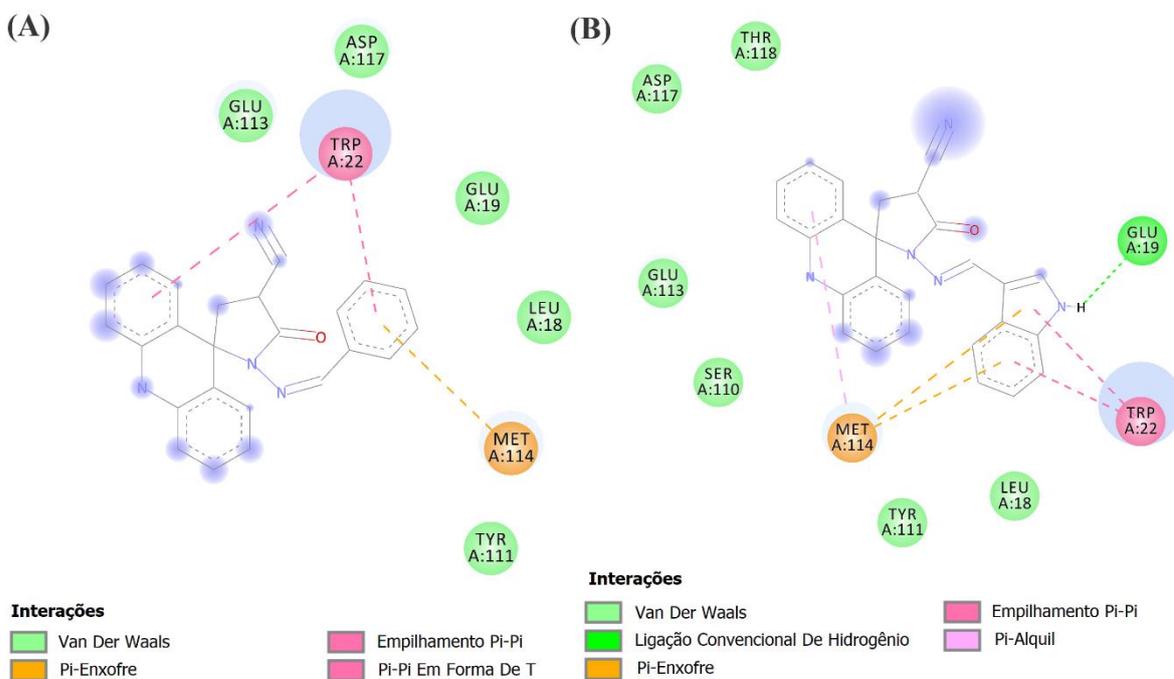
Desse modo, ao avaliar os complexos formados com o alvo de *T. cruzi*, observam-se *scores* aproximados entre o AMTAC-22 e o ligante co-cristalizado quinacrina (mepacrina), também um derivado acridínico. Assim, todos os compostos acridínicos avaliados apresentaram interações com os resíduos Met114 e Trp22. A Met114 é considerada como um resíduo importante, pois contribui para a correção hidrofóbica em um lado do sítio ativo (BOND *et al.*, 1999), e realiza: uma interação pi-enxofre com o anel benzênico do AMTAC-01 (distância: 5,94 Å); três interações pi-enxofre (distâncias: 6,94 e 7,99 Å) e uma pi-alquil (distância: 5,61 Å) com os anéis aromáticos do AMTAC-22; e três interações com a quinacrina, sendo duas pi-enxofre (distâncias: 6,35 e 8,11 Å) e uma alquil (distância: 4,66 Å).

Adicionalmente, diversas interações são observadas no resíduo Trp22. O AMTAC-01 desenvolve dois empilhamentos pi-pi com distâncias de 4,10 Å com o anel benzênico e 7,06 Å

com o anel acridínico. Semelhantemente, o AMTAC-22 formou duas interações do mesmo tipo, ambas pelo anel indólico, porém mais aproximadas ao aminoácido, com distâncias de 3,97 e 4,41 Å. No entanto, o anel acridínico da quinacrina intermedia a formação de três interações de empilhamento pi-pi com Trp22. Além disso, o Trp22 também interage com o hidrogênio do carbono terciário da quinacrina por uma interação pi-sigma.

Desse modo, o anel acridínico da quinacrina apresenta um papel importante na formação e estabilização do complexo, sendo o responsável por estabelecer cinco interações com o alvo. Como mencionado anteriormente no tópico “2.4.2”, a literatura reporta a atividade tripanocida *in vitro* da quinacrina e a capacidade de inibir a tripanotona redutase (HAMMOND; HOGG; GUTTERIDGE, 1985; JACOBY et al., 1996). Assim, embora tenha sido perdida a aromaticidade no anel acridínico central dos compostos espiro-acridínicos, esses apresentaram resultados promissores no *docking*, interagindo com os principais aminoácidos e, no caso do AMTAC-22, apresentando um *score* ligeiramente acima do ligante co-cristalizado, especialmente pela presença do anel indólico (Figura 47).

Figura 47 - Ancoragem molecular dos derivados (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo TryR de *T. cruzi*



Fonte: Autoria (2024).

Complementarmente, o grupamento aminico do anel indólico do AMTAC-22 foi responsável por formar uma interação convencional de carbono hidrogênio com o resíduo de Glu19, reportado por Bond e colaboradores (1999) como um importante aminoácido no funcionamento e diferenciação da enzima. Por conseguinte, essa interação de baixo distanciamento (3,60 Å) pode justificar o melhor *score* obtido pelo espiro-acridínico indólico.

4.3.5.3 *Docking molecular nos alvos topoisomerase*

A determinação do potencial inibitório das isoformas de topoisomerase 1 e 2 de *Leishmania* e *T. cruzi*, respectivamente, foi realizada por meio da simulação de ancoragem molecular e os resultados obtidos estão dispostos nas tabelas 18 e 19.

Tabela 18 - Resultados do docking molecular frente isoformas de Topoisomerase I e II

COMPOSTO	<i>L. donovani</i> (PDB: 2B9S)	<i>T. cruzi</i> (PDB: 8GCC)
AMTAC-01	53,99	70,84
AMTAC-22	47,61	82,07
Ligante	52,56	86,03

Fonte: Aatoria (2024).

Tabela 19 - Resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com os compostos avaliados

COMPOSTO	<i>L. donovani</i> (PDB: 2B9S)	<i>T. cruzi</i> (PDB: 8GCC)
AMTAC-01	Lys211, Arg190, Arg188, Tyr95	Ala472, Arg460, Glu479
AMTAC-22	Lys211, Arg190, Gly191, Tyr95	Arg460, Glu479, Arg460, Pro458, Phe457, Lys413, Pro412
Ligante	Arg188, Arg190, Lys211, His93	Arg460, Glu479, Leu464, Cys477, Ala476

Fonte: Aatoria (2024).

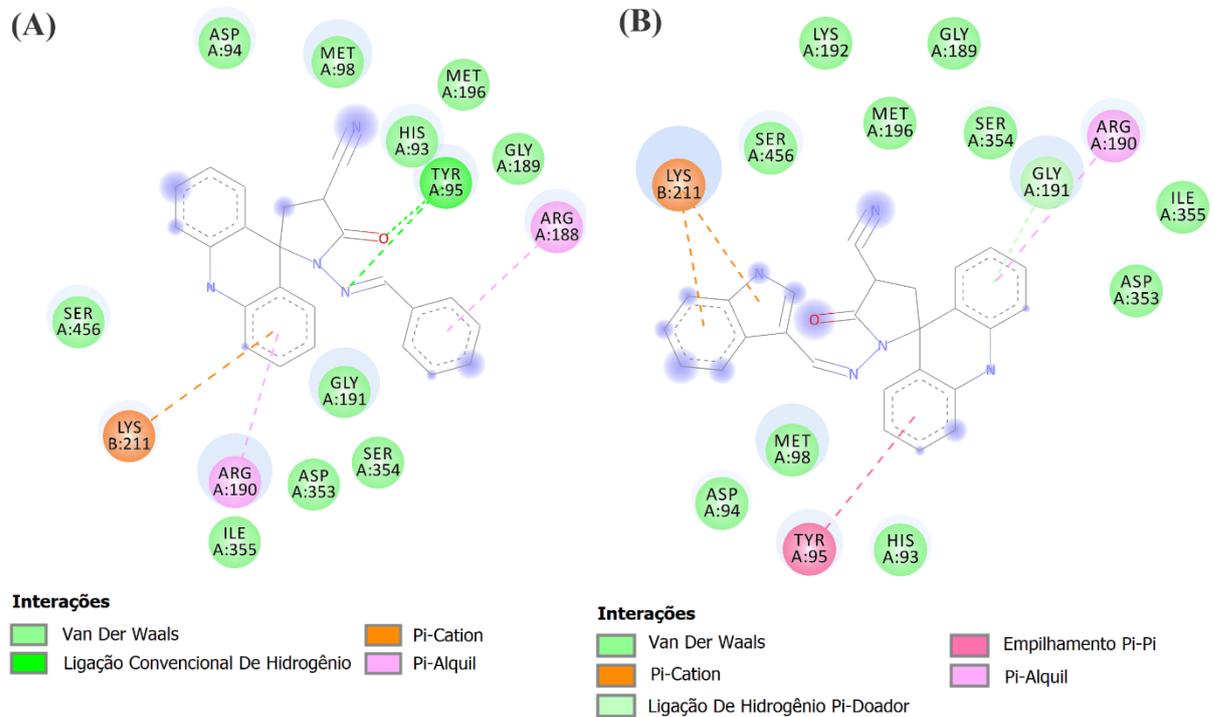
O alvo 2B9S, de topoisomerase I de *Leishmania donovani*, é obtido pela plataforma do PDB na ausência de um ligante co-cristalizado, de modo que impossibilita a realização do *redocking* para validação do estudo. Devido a isso, a camptotecina foi utilizada como composto de referência para esse estudo (ALMEIDA et al., 2021). Esse fármaco trata-se de um alcaloide inibidor de topoisomerase I, utilizado na terapia anticâncer. Embora seja direcionado para células tumorais, sua ação como inibidor de topoisomerase I de *Leishmania sp.* já é descrita na literatura, onde são reportados estudos *in vitro* que demonstram um EC₅₀ de 0,7 µM frente topoisomerase I de *L. donovani*, em comparação ao obtido para topoisomerase I humana de 2,42 µM (MAMIDALA et al., 2016; PRADA et al., 2013). Desse modo, esses dados fornecem embasamento para utilização desse fármaco para essa finalidade.

São enfatizados, por Almeida e colaboradores (2021), os aminoácidos Lys211 e Arg190 como de importância para inibição enzimática, estando envolvidos no mecanismo inibitório da camptotecina (MAMIDALA et al., 2016). De acordo com os achados, os compostos em análise apresentaram interações com os resíduos citados, ocorrendo do seguinte modo: para o derivado AMTAC-01, houve a interação com Lys211 por pi-cátion e Arg190 por pi-alquil; AMTAC-22 formou duas interações com Lys211 por pi-cátion e Arg190 por pi-alquil; e Camptotecina estabilizou o complexo com uma ligação de hidrogênio com Lys211 e três interações com Arg190, sendo duas pi-alquil e uma ligação convencional de hidrogênio, apresentando-se em concordância com os estudos de Almeida et al. (2018).

Não obstante, os compostos espiro-acridínicos (Figura 48) apresentam interação com o aminoácido Tyr95. Essa é formada pelo AMTAC-01 por intermédio de duas ligações convencionais de hidrogênio, conferindo melhor estabilidade ao complexo quando comparada ao AMTAC-22, que interagiu com o mesmo resíduo por uma interação hidrofóbica. Adicionalmente, o AMTAC-01 gerou uma interação intermolecular do tipo pi-alquil frente ao aminoácido Arg188, também comum a camptotecina, que interage da mesma maneira.

Desse modo, destacamos o composto espiro-acridínico não-substituído como de potencial para inibição de topoisomerase I, tendo em vista sua capacidade de estabelecer complexos estáveis com aminoácidos essenciais para enzima.

Figura 48 - Interações realizadas pelos compostos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo topoisomerase 1 de *L. donovani*



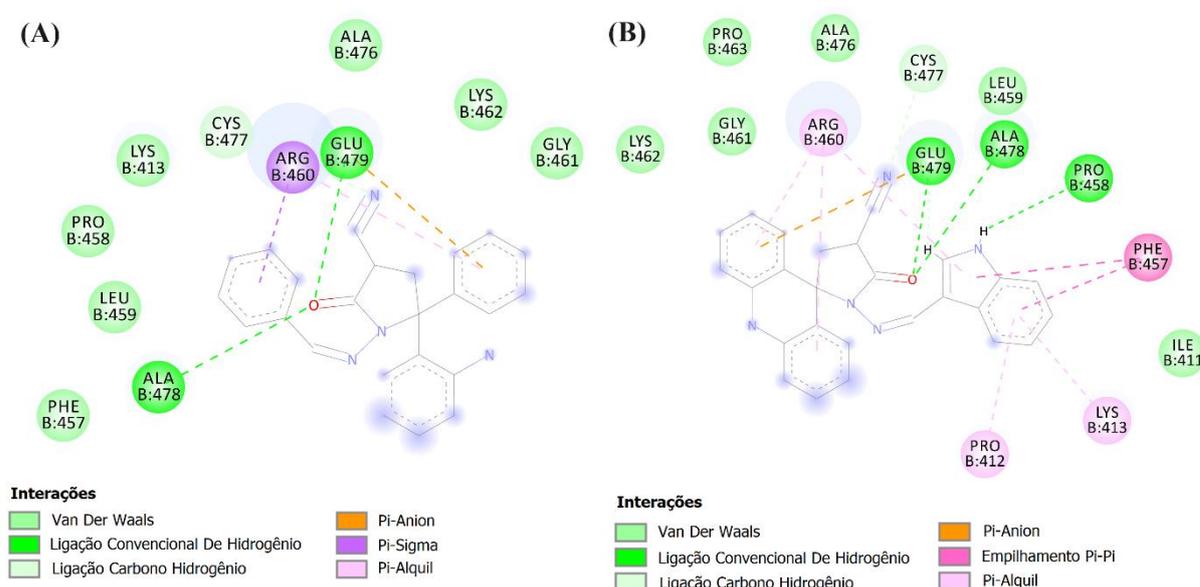
Fonte: Autoria (2024).

Devido a indisponibilidade da estrutura tridimensional cristalizada de topoisomerase I de *T. cruzi* no PDB, as simulações foram conduzidas utilizando a topoisomerase II desse parasito, sendo o PDB de código 8GCC selecionado para este propósito. As diferentes isoformas da topoisomerase desempenham a função de promover um relaxamento transitório às fitas de DNA durante os processos de replicação, transcrição e recombinação. Entretanto, distinguem-se pelo fato de que as enzimas do tipo 1 causam a quebra de apenas uma fita do DNA, possibilitando que a outra cadeia se movimente ao seu redor para liberar a tensão, enquanto as do tipo 2 provoca a quebra de ambas fitas do DNA e permitem a passagem de outra molécula de DNA na região (KOUR et al., 2024).

Desse modo, os compostos espiro-acridínicos, juntamente com o ligante co-cristalizado CT1, tiveram suas afinidades analisadas frente ao alvo em questão. Realizando-se um comparativo entre os complexos formados pelo AMTAC-01 e o AMTAC-22, observa-se que o AMTAC-22 estabeleceu a formação de três ligações convencionais de hidrogênio, enquanto

apenas duas foram formadas pelo AMTAC-01. A disposição oposta dentro do sítio ativo do alvo favoreceu a criação de interações de diferentes aminoácidos com o anel indólico da molécula, a exemplo das interações formadas com Pro412, Lys413 e Arg460 por pi-alquil, Phe457 por duas interações de empilhamento pi-pi, e uma ligação convencional de hidrogênio com o resíduo Pro458 (Figura 49).

Figura 49 - Interações realizadas pelos compostos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo topoisomerase II de *T. cruzi*

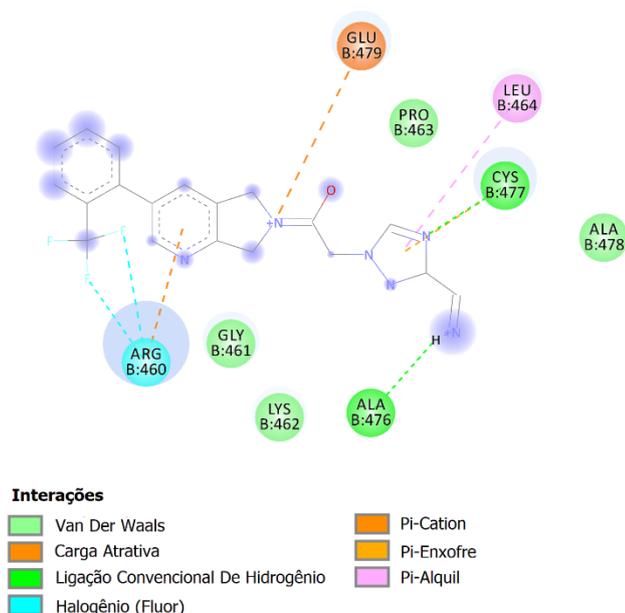


Fonte: Aatoria (2024).

No entanto, embora tenha desempenhado uma quantidade menor de interações no sítio ativo do alvo, o ligante CT1 é um derivado cianotriazólico que se liga de modo covalente ao alvo (RAO et al., 2023). Durante o processo de *docking* molecular não há a formação da ligação covalente, embora o método tenha sido validado pela obtenção de um RMSD de 0,99 Å, encontrando-se dentro dos limites de aceitabilidade. Observa-se para o CT1, no entanto, uma modificação na hibridização do grupamento amida devido a ressonância dos elétrons π , de modo que há a transferência da ligação π da carbonila para o nitrogênio, que passa a assumir a carga positiva. Essa alteração confere a estrutura a capacidade de formar uma interação forte do tipo carga atrativa com o resíduo de Glu479, fazendo com que, embora não haja a formação

da ligação covalente, o ligante CT1 ainda estabeleça um complexo com o maior *score* de afinidade (86,03) (Figura 50).

Figura 50 - Formação do complexo entre CT1 e topoisomerase II de *T. cruzi*



Fonte: Autoria (2024).

4.3.5.4 *Docking* molecular nos alvos triose-fosfato isomerase

O triose-fosfato isomerase (TFI) é uma enzima essencial no metabolismo energético, visto que catalisa a isomerização gliceraldeído-3-fosfato e do di-hidroxiacetona fosfato na quinta etapa da via glicolítica. Embora seja uma enzima constitutiva em humanos, apresenta apenas 52% de similaridade sequencial com as enzimas homólogas de *L. mexicana* e *T. cruzi*, um fator-chave para seletividade do candidato à fármaco (AGUILERA et al., 2016; GONZÁLEZ-MORALES et al., 2023). Desse modo, dada sua importância crucial na produção de energia, bem como suas características enzimáticas e estruturais bem compreendidas, o TFI emerge como um potencial alvo parasitário para fármacos (KUSHAWAHA et al., 2012).

Assim, os compostos espiro-acridínicos foram avaliados quanto a possível inibição desses alvos por ancoragem molecular. Os resultados apresentam-se na tabela 20.

Tabela 20 - Resultados do *docking* molecular frente triose-fosfato isomerase

COMPOSTO	<i>L. mexicana</i> (PDB: 1IF2)	<i>T. cruzi</i> (PDB: 1CI1)
AMTAC-01	47,47	50,21
AMTAC-22	56,66	58,38
Ligante	50,23	31,44

Fonte: Autoria (2024).

Verifica-se, nas interações formadas nos alvos de *L. mexicana* e *T. cruzi*, a afinidade de ambos compostos espiro-acridínicos, principalmente o AMTAC-22, que obteve melhores valores de *score* em relação aos ligantes co-cristalizados (IPP e hexano). Assim, para melhor compreensão dos aminoácidos envolvidos na formação dos complexos, segue a tabela 21.

Tabela 21 - Resíduos de aminoácidos de triose-fosfato isomerase envolvidos na interação com os derivados espiro-acridínicos

COMPOSTO	<i>L. mexicana</i> (PDB: 1IF2)	<i>T. cruzi</i> (PDB: 1CI1)
AMTAC-01	Ala236, Val214, Lys239, Val177	Tyr102, Arg71, Thr70, Glu112
AMTAC-22	Gly235, Ser213, Gly234, Ala236, Val214	Ala74, Phe75, Ile69, Arg71, Tyr103
Ligante	Gly235, Ile172, Ser213, Gly173, Gly234, Glu167, Lys13, His95, Asn11	Tyr102, Tyr103, Phe75, Arg71, Ile69

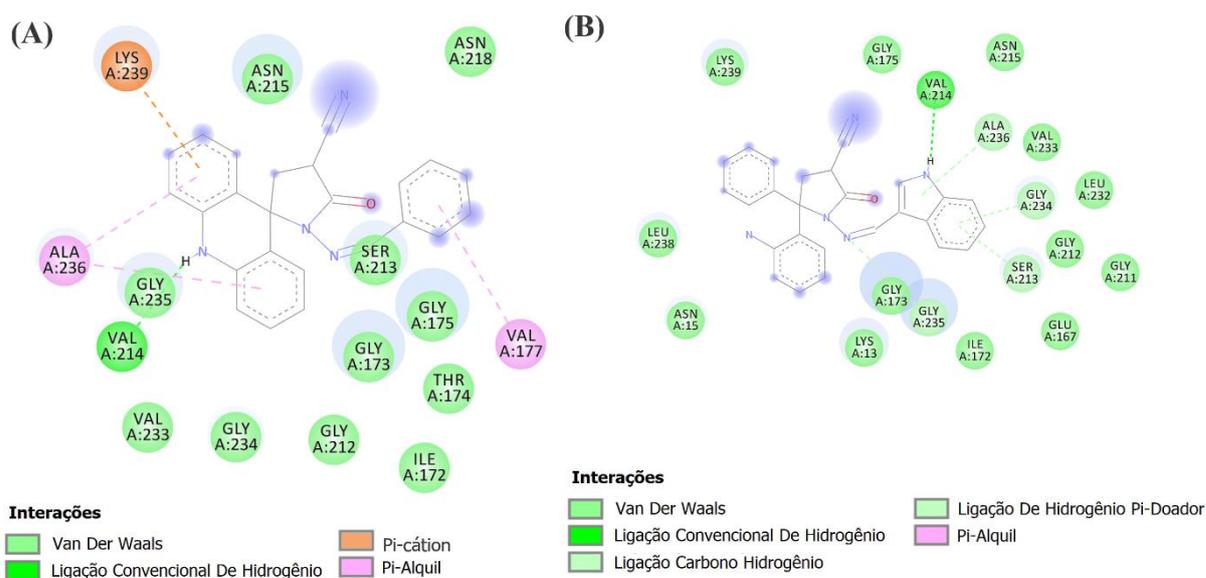
Fonte: Autoria (2024).

Ao analisar os resultados obtidos relacionados a *L. mexicana*, o AMTAC-22 apresenta interações com cinco resíduos de aminoácidos em comum com os demais compostos: Val214, Ala236, Gly234, Ser213 e Gly235. Essas interações são estabilizadas por ligação de hidrogênio convencional, ligação de carbono-hidrogênio e ligação de hidrogênio pi-doador. Essas ocorrem por intermédio do anel indólico e o grupamento imínico presentes na estrutura. Entre essas interações, ressaltamos a ligação de hidrogênio estabelecida com Val214 a uma distância de

1,88 Å, a qual, devido à sua força e proximidade, favorece uma redução da energia livre (Figura 51B).

Na ausência do anel indólico, o AMTAC-01 se dispõe no sítio ativo do alvo de modo contrário e realiza interações semelhantes ao AMTAC-22 com os resíduos: Val214, por ligação de hidrogênio convencional, porém a uma distância ligeiramente superior (2,26 Å); e Ala236, por interação pi-alquil. Ambas ocorrem por intermédio do anel acridínico, sendo essa porção da estrutura também responsável por estabelecer uma interação com o resíduo Lys239 por pi-cátion, enquanto o anel benzênico desenvolve uma interação pi-alquil com Val177. Assim, devido à menor quantidade de interações realizadas por esse composto, seu *score* de afinidade pelo alvo foi menor (Figura 51A).

Figura 51 - *Docking* molecular dos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 em TFI de *L. mexicana*



Fonte: Aatoria (2024).

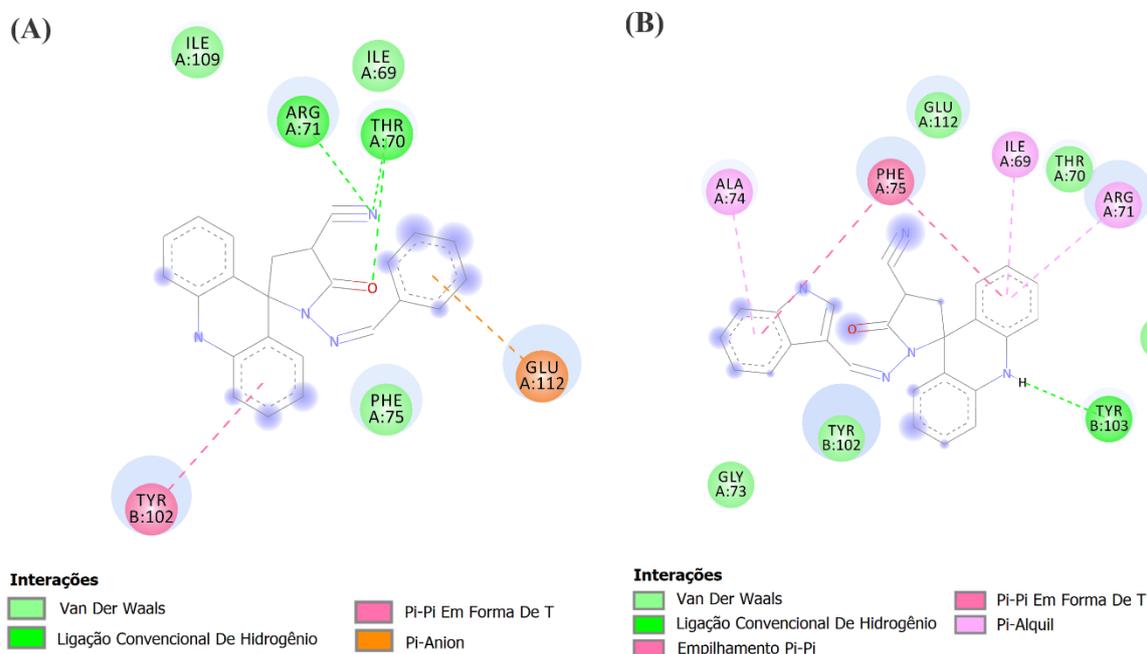
O ligante co-cristalizado IPP apresentou interações com diversos resíduos de aminoácidos, conforme apresentado na tabela 21, estabilizados por interações de van der Waals, ligação convencional de hidrogênio, ligação de carbono-hidrogênio e cargas atrativas (Anexo 10). No entanto, a pontuação gerada na ancoragem molecular foi inferior ao AMTAC-22, embora este tenha apresentado uma menor quantidade de interações. Acredita-se que o baixo volume molecular da molécula possa ter afetado no devido encaixe no sítio ativo.

Ao observar as interações formadas em a triose-fosfato isomerase de *T. cruzi*, ambos os compostos se mostraram como promissores inibidores, em comparação ao ligante co-cristalizado hexano, embora tenham ocorrido interações em comum entre esses, tais como as estabelecidas com o aminoácido Arg71 por ligação de hidrogênio (AMTAC-01) ou interação pi-alquil (AMTAC-22 e hexano). Esse resíduo, em particular, é ressaltado como de importância para a enzima no estudo conduzido por Téllez-Valencia e colaboradores (2004), ao avaliar, por métodos cristalográfico, calorimétrico e bioquímico, a inibição de TFI de *T. cruzi* pelo ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propanossulfônico.

Devido à sua estrutura composta por hidrocarbonetos saturados, o hexano estabeleceu majoritariamente interações por alquil, pi-alquil e pi-sigma. Essas interações, por serem relativamente fracas e envolverem flutuações momentâneas da distribuição eletrônica da cadeia apolar do hexano e sobreposição de orbitais para interação com o orbital π dos aminoácidos, respectivamente, resultaram em uma baixa pontuação de afinidade (31,44). Entretanto, é válido ressaltar que o hexano não é de fato um fármaco, portanto as comparações realizadas com esse ligante são limitadas.

Os compostos espiro-acridínicos (Figura 52), por sua vez, desempenham outros tipos de interações consideradas mais fortes que, por sua vez, influenciam diretamente na afinidade pelo alvo e especificidade do tipo de interação formada. A exemplo disso, podemos evidenciar a ligação convencional de hidrogênio desenvolvida entre o grupamento amínico do anel acridínico com a Tyr103, que é reproduzida pelo hexano por uma interação pi-alquil. Além disso, a capacidade de interagir com esse resíduo é uma característica chave para o estabelecer a seletividade do composto, tendo em vista que Tyr103 é substituída por Phe na enzima homóloga humana (ROMO-MANCILLASA et al., 2011).

Figura 52 - Interações formadas pelos compostos espiro-acridínicos (A) AMTAC-01 e (B)-22 no alvo TFI de *T. cruzi*



Fonte: Autoria (2024).

Destacam-se também as interações realizadas entre o resíduo Thr70 e o AMTAC-01. De acordo com Romo-Mancillasa e colaboradores (2011), esse resíduo é relevante para inibição da atividade enzimática. Na simulação realizada com o AMTAC-01, observa-se a rotação da ligação C-C do carbono da nitrila para aproximação e formação da ligação convencional de hidrogênio com o respectivo resíduo, além da ligação com Arg71 anteriormente mencionada. A carbonila da estrutura, semelhantemente, estabelece uma ligação de hidrogênio com o resíduo Thr70.

4.3.7.5 *Docking* molecular nos alvos de cisteína protease

Apresentado e utilizado no capítulo anterior, o alvo cisteína protease B de *Leishmania amazonensis* foi obtido por meio de modelagem por homologia, no qual o alvo cruzaina de *T. cruzi* (PDB ID: 1AIM) foi utilizado como *template* para construção do alvo tridimensional de CPBLa.

A cruzaina, também conhecida como cruzapaína, vêm sendo validada como alvo farmacológico. É a principal cisteína protease de *T. cruzi*, é expressa durante todo ciclo de vida do parasito e está envolvida em vários processos fisiológicos, como nutrição, invasão de células hospedeiras e defesa contra o sistema imunológico do hospedeiro (SOUZA et al., 2020). Assim, nesse estudo, ambas as enzimas foram utilizadas para avaliação da afinidade dos compostos espiro-acridínicos com os alvos das diferentes espécies parasitárias. Os resultados são apresentados na tabela 22.

Tabela 22 - Resultados do *docking* molecular frente cisteína protease

COMPOSTO	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i> (PDB: 1AIM)
AMTAC-01	56,31	55,12
AMTAC-22	54,96	58,49
Ligante	56,28	71,45

Fonte: Aatoria (2024).

Para melhor entendimento das interações formadas, segue a tabela 23 com os aminoácidos envolvidos na formação dos complexos fármaco-receptor.

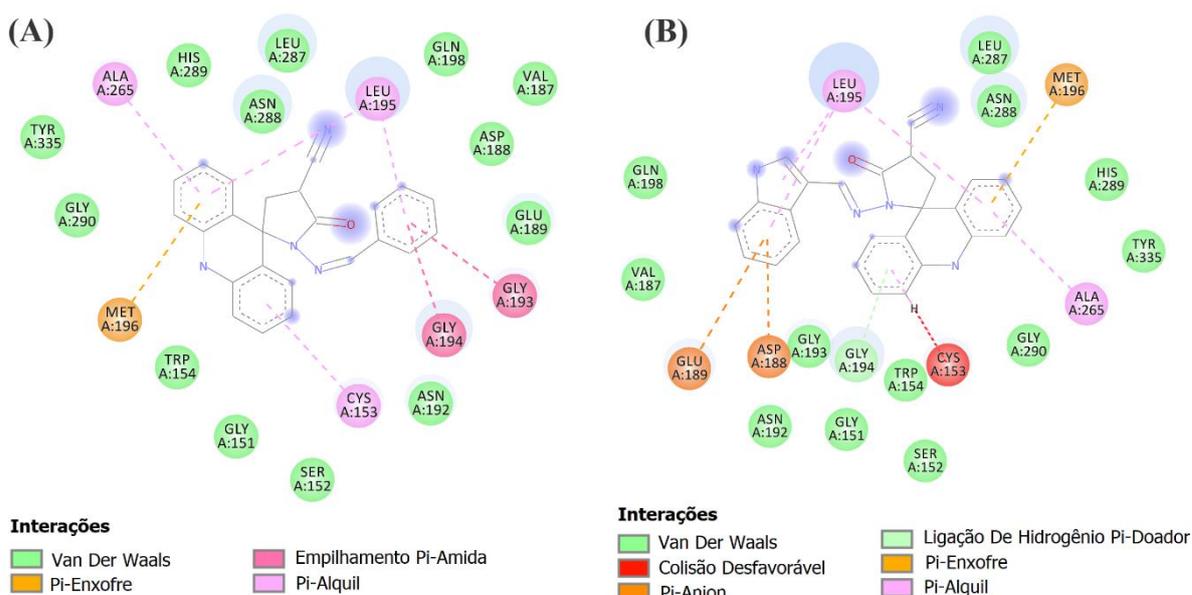
Tabela 23 - Aminoácidos dos sítios ativos das cisteínas protases que interagem com os compostos em estudo

COMPOSTO	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i> (PDB: 1AIM)
AMTAC-01	Tyr335, Leu287, Ala265, Met196, Cys153, Gly194, Asn192	Cys25, Gly66, Gly65, Leu67, Leu157, Ala133, Met68
AMTAC-22	Ala265, Met196, Leu195, Gly193, Gly194, Cys153	Leu67, Asp60, Asp158, Cys25, Met68, Leu157
Ligante	Leu195, Met196, Ala265, Cys153, Gly194, Asp188, Glu189	Leu67, Asp60, Gly66, Trp26, Gly65, Gly23, Asp158, Met68, Ala133, Glu205

Fonte: Aatoria (2024).

As estruturas químicas em estudos desempenharam interações no alvo CBPLa que resultaram em scores aproximados de 53,31, 54,96 e 56,28 para AMTAC-01, AMTAC-22 e ligante 1c, respectivamente (Figura 53). Esses apresentaram interações em comum entre si dentro do sítio ativo, como aos resíduos de Leu195, Met196, Ala265, Gly194 e Cys153. Os modos de interações e distâncias entre a molécula e o alvo são de essencial importância para compreensão das pontuações alcançadas por cada composto. Observamos, por exemplo, interações pi-alquil foram realizadas com o resíduo de Leu195 por todos compostos, com variações em quantidade (2 interações para AMTAC-01 e 1c, e 3 interações para AMTAC-22) e distância, que variou de 4,53 Å (AMTAC-22) a 5,80 Å (AMTAC-01).

Figura 53 - Interações dos compostos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 com CPBLa



Fonte: Aatoria (2024).

Por outro lado, as interações formadas com o aminoácido Cys153 foram estabelecidas por tipos de interações intermoleculares distintas entre si. O composto AMTAC-01 interagiu a partir do anel acridínico com esse resíduo por pi-alquil. O AMTAC-22, por sua vez, efetuou duas interações divergentes, sendo uma por pi-alquil por intermédio do anel acridínico e outra por colisão desfavorável entre o próton acridínico e o resíduo em questão. Entre o composto 1c

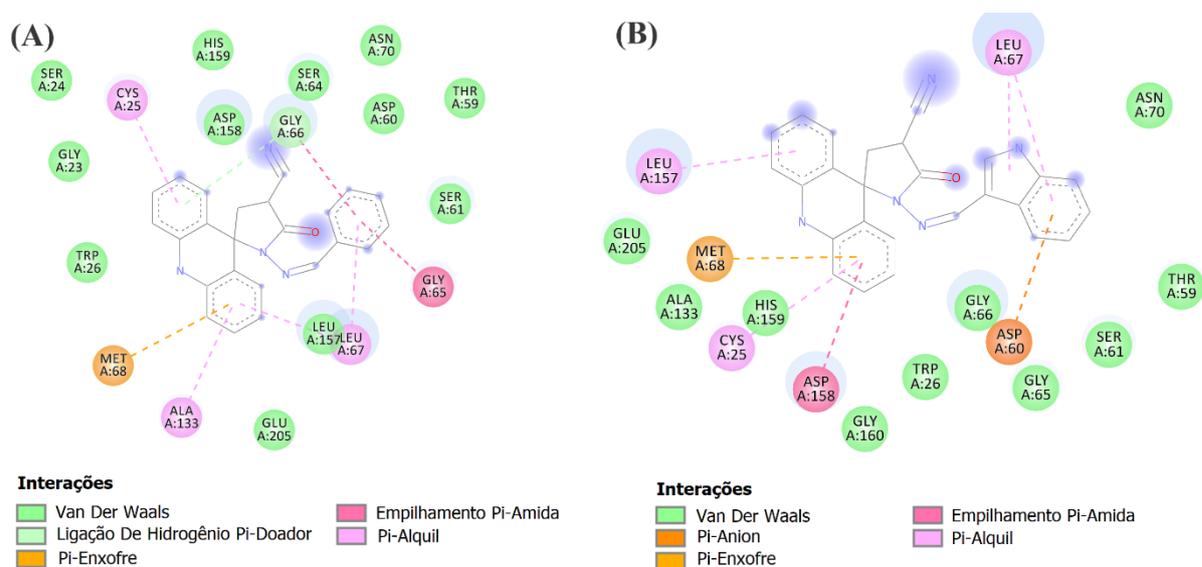
e o aminoácido, formou-se uma ligação de hidrogênio convencional e pi-enxofre, conferindo estabilidade ao complexo de maneira mais efetiva em relação aos espiro-acridínicos.

Ao ressaltar o complexo formado pelo AMTAC-01, que resultou no maior *score*, verifica-se que é estabilizado por outras interações além das que foram mencionadas anteriormente. Este gera uma interação pi-enxofre com o resíduo de Met196, pi-alquil com Ala265, e interações empilhamento pi-amida com os resíduos Gly193 e 194.

Em relação a performance dos derivados espiro-acridínicos no alvo de *T. cruzi*, nota-se que ambos desenvolveram diversas interações com o sítio ativo, porém a maior afinidade foi apresentada pelo ligante co-cristalizado ZYA.

É visto, para o composto AMTAC-01, que esse apresenta interações do tipo pi-enxofre com Met68, pi-alquil com Ala133, Cys25 e Leu67, empilhamento pi-amida com Gly65 e 66, sendo o último também alvo de interação do tipo ligação de hidrogênio pi-doador. Enquanto que para o derivado AMTAC-22, interações do tipo pi-alquil foram formadas com Cys25, Leu157 e Leu67, pi-ânion com Asp60, pi-enxofre com Met68 e empilhamento pi-amida com Asp158 (Figura 54).

Figura 54 - Complexos estabelecidos entre os compostos (A) AMTAC-01 e (B) AMTAC-22 no alvo cruzaina



Fonte: Aatoria (2024).

É válido ressaltar que o aminoácido no sítio ativo que age como nucleófilo é a cisteína na posição 25 (Cys25). Esse apresenta uma atividade essencial para atividade catalítica da enzima, de modo que a ligação com essa porção se trata de um mecanismo interessante para inibição da cruzaina (SILVA et al., 2020). Diante disso, observa-se ambos AMTACs apresentaram a capacidade de interagir com esse resíduo, diferentemente do ligante co-cristalizado, reafirmando a potencialidade desses compostos para essa finalidade.

Por fim, os estudos teóricos sobre o mecanismo de ação através do *docking* molecular demonstraram a afinidade dos compostos em relação aos alvos selecionados, o que pode justificar a ação antitripanossomatídea *in vitro* dos compostos AMTAC-01 e AMTAC-22.

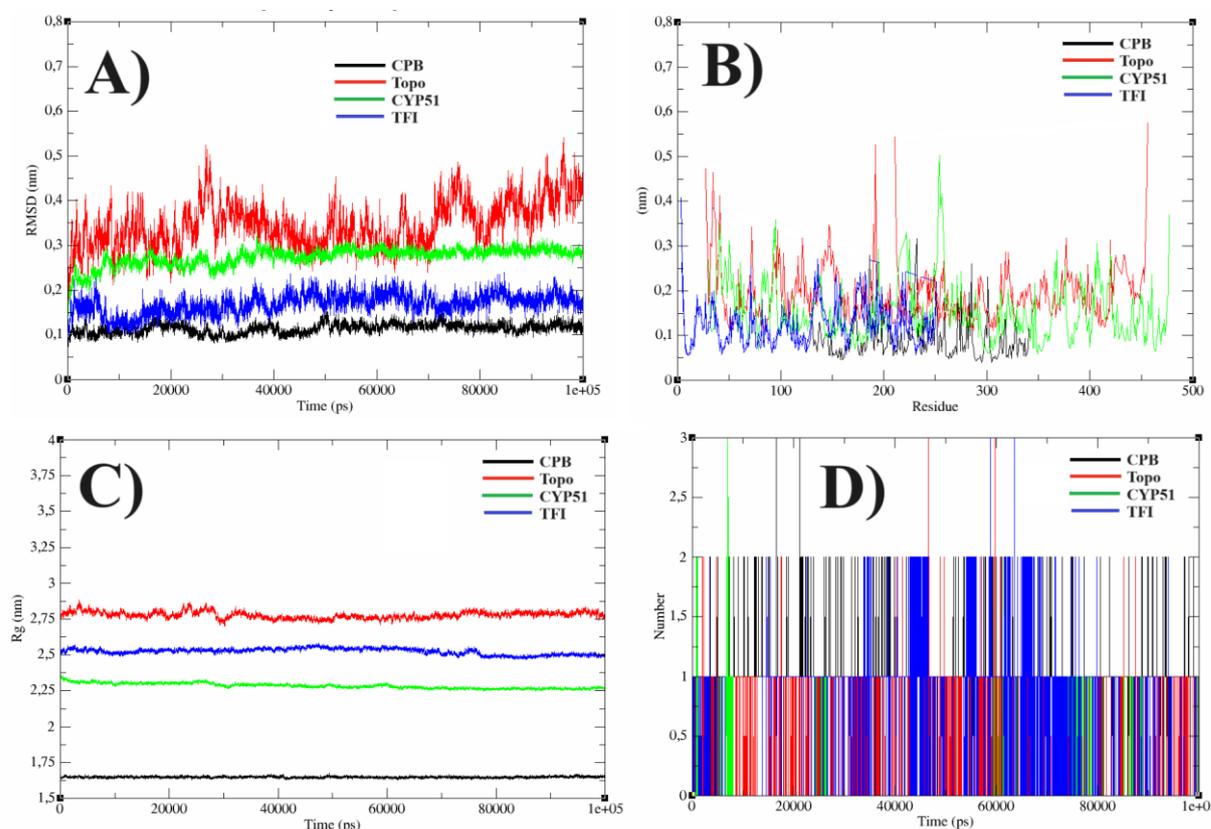
Além disso, ao analisarmos os resultados obtidos em conjunto, observamos uma interação mais eficaz do AMTAC-01 com os alvos de *Leishmania*, como o CPBLa e a topoisomerase 1, nos quais apresentou o melhor resultado. Por outro lado, o AMTAC-22 demonstrou maior afinidade pelos alvos de *T. cruzi*, obtendo a melhor pontuação para três dos cinco alvos avaliados, sendo esses CYP51, TryR e TFI. Portanto, para uma melhor compreensão das interações formadas, os melhores complexos foram selecionados para estudos de dinâmica molecular.

4.3.6 Dinâmica molecular

Após a realização do *docking* molecular em cinco alvos farmacológicos comuns para *Leishmania sp.* e *T. cruzi*, quatro complexos foram selecionados para dinâmica molecular com base no perfil promissor de cada composto no respectivo alvo. Foram esses: AMTAC-01 em CPBLa, AMTAC-01 em Topoisomerase 1 de *L. donovani*, AMTAC-22 em CYP51 de *T. cruzi*, e AMTAC-22 em TFI de *T. cruzi*.

Desse modo, as simulações de dinâmica molecular foram realizadas em trajetória de 1000 ps, utilizando-se como parâmetros: RMSD, RMSF, Rg e ligações de hidrogênio (Figura 55).

Figura 55 - Dinâmica molecular dos compostos espiro-acridínicos em alvos pertencentes a tripanossomatídeos



Fonte: Aatoria (2024). Legenda: (A) gráfico de RMSD; (B) gráfico de RMSF; (C) gráfico de Rg; (D) gráfico de números de ligações de hidrogênio. Em preto estão os resultados de AMTAC-01 em CPBLA, em vermelho AMTAC-01 em topoisomerase 1 de *L. donovani*, em verde AMTAC-22 em CYP51 de *T. cruzi*, em azul AMTAC-22 em TFI de *T. cruzi*.

Analisando o primeiro parâmetro, a raiz do desvio médio quadrático (Figura 55A), observamos que os compostos apresentaram desvios variando aproximadamente entre 0,1 e 0,5 nm. Os achados apresentam o complexo de CPBLA com AMTAC-01 como o de menores desvios, apresentando valores próximos a 0,1 nm durante o período de análise. Além disso, podemos destacar o complexo de TFI com AMTAC-22, que apresentou valores aproximados a 0,2 nm no decorrer de 1000 ps. Diante disso, compreendendo que valores de RMSD iguais ou menores a 2 Å, ou seja, 0,2 nm, são considerados como poses “quase nativas”, ressaltamos a estabilidade dos complexos citados (BELL; ZHANG, 2019).

Na avaliação da medida de flexibilidade dos átomos durante a simulação da dinâmica molecular, o RMSF (Figura 55B), verificam-se menores flutuações dos resíduos nos complexos

AMTAC01-CPBLa e AMTAC22-TFI. Esses resultados são inversamente proporcionais a estabilidade do complexo, ou seja, menores flutuações sugerem melhor estabilidade. Assim, em concordância com o parâmetro anterior, os dados obtidos pela análise de RMSF inferem melhor estabilidade para os complexos citados e podem indicar que a presença dos ligantes não provoca alterações consideráveis na conformação nativa do alvo.

O raio de giro atua como um parâmetro para determinar a compactação da proteína após a formação do complexo com uma molécula. Observamos no gráfico gerado (Figura 55C) que o complexo AMTAC01-CPBLa revelou valores de Rg variando na faixa de aproximadamente 1,6 nm, que corresponde a 16 Å, e indica uma estrutura próxima a originária (IDRIS et al., 2020). Os demais apresentaram valores acima de 2,25 nm, indicando alterações mais significativas à rigidez da estrutura do alvo.

A determinação da quantidade de ligações de hidrogênio formadas durante o curso da simulação de 1000 ps (Figura 55D) mostra que todos os complexos apresentaram um comportamento semelhante, nos quais as interações ligante-alvo foram compostas por 2 ligações de hidrogênio, podendo formar até 3 ligações durante a trajetória analisada nos alvos mais promissores. Considerando a importância e força desse tipo de ligação para conferir estabilidade ao complexo, os quatro apresentaram um resultado desejável.

Portanto, esses achados auxiliaram na compreensão dos possíveis modos de ação dos derivados espiro-acridínicos ao considerar a movimentação do alvo em conjunto com as moléculas em estudo. A partir desse, observa-se que o complexo AMTAC01-CPBLa apresentou os melhores resultados em todos parâmetros avaliados, sugerindo uma alta estabilidade. Em relação ao composto AMTAC-22, os estudos indicaram melhores resultados quando associado ao alvo TFI de *T. cruzi*.

Realizando uma correlação dos dados obtidos *in silico* com os que foram previamente visualizados *in vitro*, nota-se que a modificação estrutural realizada pela alteração do anel aromático promoveu uma possível e sutil seletividade entre parasitos. Podemos, diante disso, ressaltar a atividade do composto AMTAC-22 frente formas tripomastigotas de *T. cruzi*, superior ao controle positivo, e sugerir, a partir dos achados *in silico*, o TFI como um dos alvos responsáveis pela ação.

4.3.7 Predição farmacocinética in silico

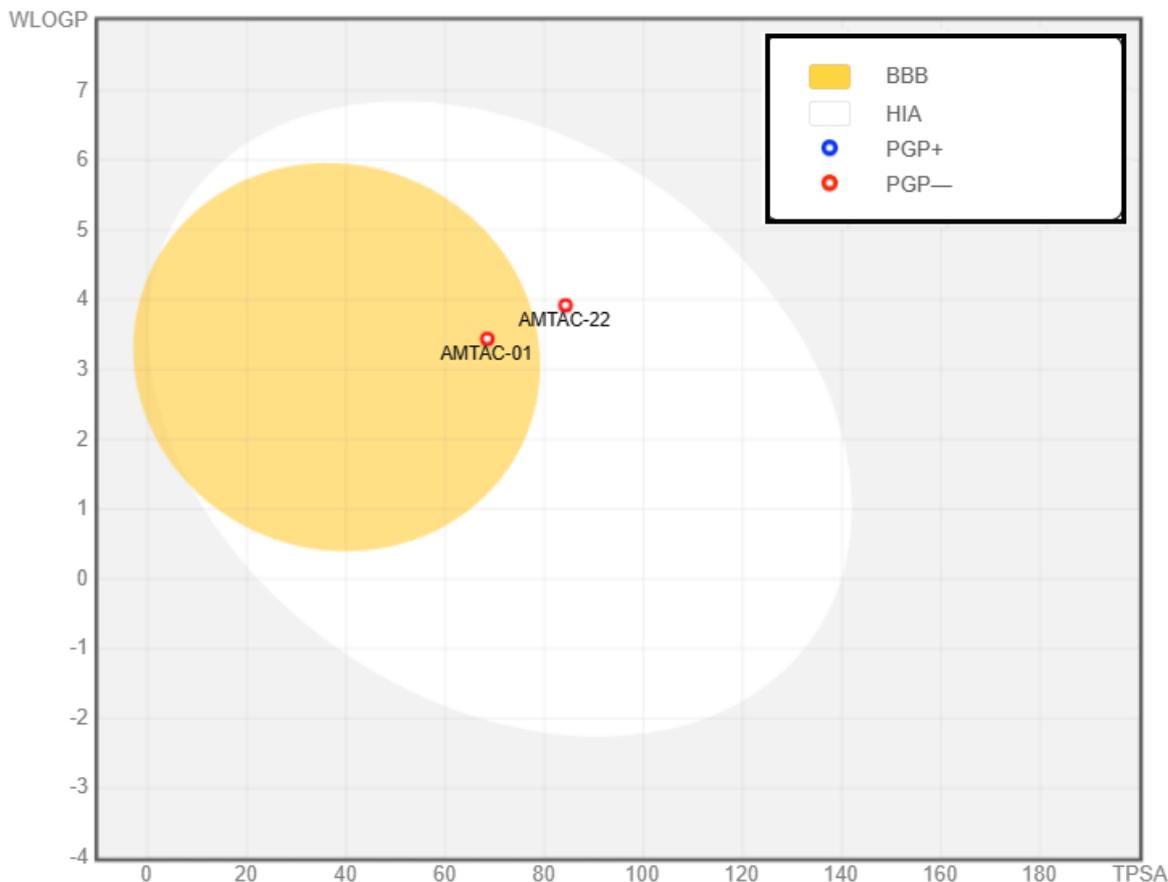
A determinação das características farmacocinéticas é essencial para o compreensão da eficácia e segurança da molécula em estudo, além de ser um dos pontos mais visados durante a

etapa de descoberta e desenvolvimento de fármacos, devido ao fato de questões relacionadas a farmacocinética e a toxicologia serem algumas das principais razões pelo qual o candidato a fármaco falha em estudos clínicos, totalizando em 39% e 21% dos casos, respectivamente, pelos quais os compostos são retirados dos estudos (KOMURA et al., 2021; OBREZANOVA, 2023).

Em vista disso, a utilização de modelos computacionais para predição dessas propriedades é crucial para o desenvolvimento de novos fármacos, pois permite o conhecimento prévio do comportamento do fármaco no organismo de acordo com sua estrutura em razão dos rápidos avanços na química computacional e ao acúmulo de dados biológicos publicamente disponíveis (GANORKAR; HEYDEN, 2022). Desse modo, a determinação das propriedades farmacocinéticas dos compostos desenvolvidos nesse trabalho foi realizada por meio de ferramentas computacionais disponibilizadas *on-line* e de forma gratuita.

A avaliação inicial dos compostos é realizada pela análise do *Boiled-Egg* (Figura 56), um modelo gráfico desenvolvido para o estudo da permeação de fármacos através da barreira hematoencefálica e absorção gastrointestinal, que se destaca por fornecer uma previsão precisa da lipofilia (coeficiente de partição n-octanol/água de Wildman e Crippen, WLOGP) e polaridade aparente (área de superfície polar topológica, TPSA) de moléculas pequenas (BAKCHI et al., 2022; DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Figura 56 - Modelo de Boiled-Egg dos compostos espiro-acridínicos



Fonte: Adaptado de *SwissADME* (2024). Legenda: BBB = barreira hematoencefálica; HIA = absorção gastrointestinal passiva; PGP+ = positivo para substrato de glicoproteína P. PGP- = negativo para substrato de glicoproteína P.

De acordo com o gráfico gerado pelo modelo *Boiled-Egg*, o derivado AMTAC-01 apresenta a capacidade de permear a barreira hematoencefálica. Tendo em vista que não se trata do objetivo desse trabalho a obtenção de fármacos que possam permear essa barreira, o resultado obtido não é desejável.

Quanto a absorção gastrointestinal, os dois compostos alta probabilidade de serem absorvidos desse modo para conseqüente passagem para corrente sanguínea. Esse achado indica a viabilidade da administração do possível candidato a fármaco por via oral.

Adicionalmente, o modelo de *Boiled-Egg* fornece informações relacionadas a probabilidade dos compostos em serem substrato da glicoproteína P (P-gP). Resultados mais detalhados relacionados a essa proteína são mostrados na tabela 24.

Tabela 24 - Modo de interação dos compostos espiro-acridínicos sobre Glicoproteínas P

COMPOSTO	Substrato P-gP	Inibidor P-gP I	Inibidor P-gP II
AMTAC-01	Não	Sim	Sim
AMTAC-22	Não	Sim	Sim

Fonte: Aatoria (2024).

A P-gp é uma glicoproteína de transmembrana permeável, pertencente a superfamília dos transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), e comumente associada ao fenômeno de desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas. A atividade dessa proteína compreende a realização do transporte ativo unidirecional por meio da hidrólise do ATP, a fim de promover o efluxo do fármaco da célula-alvo. Essa ação ocasiona em uma diminuição da concentração celular da substância administrada e produz um efeito subterapêutico. Portanto, devido a alta relevância desse transportador, a *Food and Drug Administration* (FDA) incentiva a triagem durante os estágios iniciais do desenvolvimento de medicamentos para verificar possíveis substratos de P-gp (AHMED JUVALE et al., 2022; HUBER, P. C.; MARUIAMA; ALMEIDA, W. P., 2010; RAGHAVA; LAKSHMI, 2012).

Os resultados, apresentados na figura 56 e tabela 25, mostram que nenhum dos compostos apresenta características estruturais compatíveis com a possibilidade de agirem como substratos da P-gp. Adicionalmente, ambos apresentaram resultado positivo para efeito inibidor das isoformas I e II da P-gp. Essas isoformas estão envolvidas no processo de resistência a fármacos e o desenvolvimento de compostos inibidores apresenta-se como uma oportunidade para prevenir ou solucionar a expulsão da droga pela P-gp e proporcionar o efeito terapêutico desejado (GEORGES et al., 1990; RAGHAVA; LAKSHMI, 2012).

Além disso, os compostos são avaliados em relação aos parâmetros de *druglikeness*. Esses relacionam as propriedades físico-químicas dos compostos com a probabilidade desse se tornar um fármaco de acordo com parâmetros predeterminados. Para tal, propriedades moleculares, incluindo hidrofobicidade, tamanho e flexibilidade da molécula, distribuição eletrônica, são consideradas. Trata-se de um conceito qualitativo e tornou-se uma das regras de ouro para descobrir compostos candidatos (GUAN et al., 2019; WEI et al., 2020).

Inicialmente proposta por Lipinski e colaboradores (1997), a regra dos 5 compreende a verificação do peso molecular, log P, número de doadores de ligação de hidrogênio e número de aceptores de ligação de hidrogênio do composto em análise, a fim de determinar a probabilidade do composto ser absorvido por via oral com êxito. Subsequentemente a esse modelo, outros foram propostos a fim de abordar e estabelecer outros filtros baseados em simples propriedades moleculares visando auxiliar na eficácia do processo de desenvolvimento de fármacos, tais como os propostos por Egan et al. (2000), Ghose et al. (1999), Muegge et al. (2001) e Veber et al. (2002). Os critérios por esses adotados seguem na tabela 25.

Tabela 25 - Parâmetros de *druglikeness*

PARÂMETRO DE <i>DRUGLIKENESS</i>	CRITÉRIOS
Lipinski	<p>Peso molecular ≤ 500 MLogP $\leq 4,15$ Aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10 Doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5</p>
Ghose	<p>$160 \leq$ Peso molecular ≤ 480 $-0,4 \leq$ WLogP $\leq 5,6$ $40 \leq$ Refratividade molar ≤ 130 $20 \leq$ Átomos ≤ 70</p>
Veber	<p>Ligações rotáveis ≤ 10 Área de superfície polar topológica ≤ 140</p>
Egan	<p>WLogP $\leq 5,88$ Área de superfície polar topológica $\leq 131,6$</p>
Muegge	<p>$200 \leq$ Peso molecular ≤ 600 $-2 \leq$ XLogP ≤ 5 Área de superfície polar topológica ≤ 150 Número de anéis ≤ 7 Número de carbonos > 4 Número de heteroátomos > 1 Número de ligações rotáveis ≤ 15 Aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 Doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5</p>

Fonte: Adaptado de *SwissADME* (2024).

Os parâmetros *druglikeness* apresentados foram explorados nesse trabalho. Os resultados obtidos *in silico* por meio do SwissADME ressaltam as violações aos critérios

estabelecidos por esses. Esses demonstram que os compostos espiro-acridínicos desenvolvidos seguem todos os limitantes especificados pelos modelos de Lipinski, Veber, Egan e Muegge. Entretanto, o derivado AMTAC-22 apresentou uma violação ao critério de Ghose que determina valores de refratividade molar igual ou abaixo de 130, sendo para essa molécula o valor de 130,05. A refratividade molar é abordada apenas nesse modelo e está relacionada ao tamanho molecular e lipofilicidade baseando-se na nuvem eletrônica e a polarizabilidade ocasionada por seu deslocamento (GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999). Entretanto, por se encontrar dentro das especificações dos demais modelos, o AMTAC-22 ainda apresenta um perfil adequado e similar a fármacos (*druglike*).

No que se diz respeito ao possível metabolismo desses compostos, esses foram avaliados quanto a suas interações como substratos ou inibidores das isoformas das enzimas citocromo P450 (CYP450). Essas enzimas apresentam um papel fundamental na metabolização de 90% dos fármacos, além de compostos endógenos, como esteroides, ácidos biliares, gorduras insaturadas, prostaglandinas e leucotrienos (KAMMALA et al., 2022; MANIKANDAN; NAGINI, 2017). Dentre as isoformas da enzima CYP, são descritas CYP1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6 e 3A4 como principais contribuintes para o metabolismo da grande maioria das drogas em comparação com outras enzimas oxidativas de Fase I (ZHOU, S.-F., 2008). Os resultados estão presentes na tabela 26.

Tabela 26 - Interação dos compostos espiro-acridínicos com as isoformas de CYP450

COMPOSTO	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6		CYP3A4	
	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Substrato	Inibidor	Substrato	Inibidor
AMTAC-01	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim
AMTAC-22	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não

Fonte: Aatoria (2024).

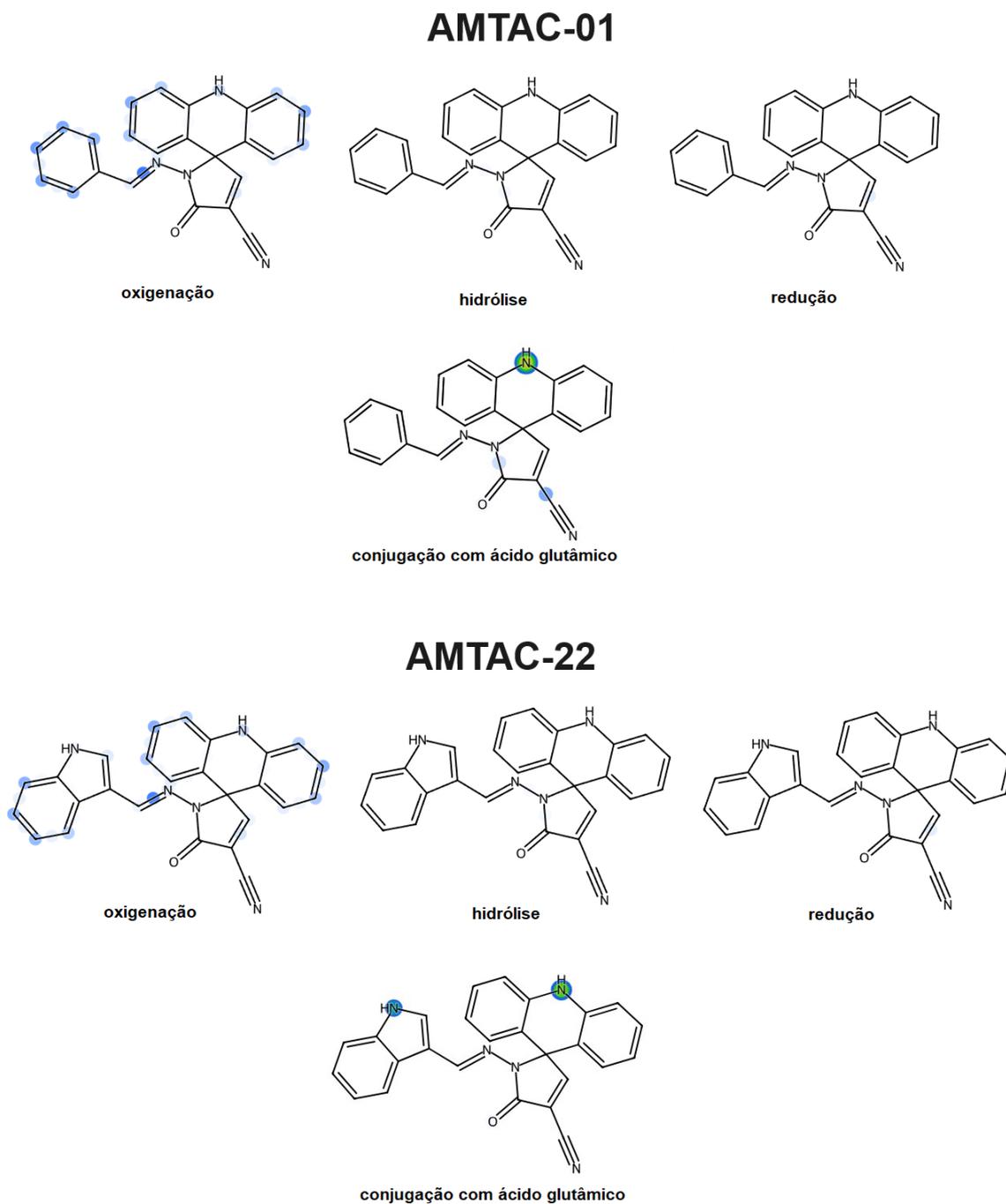
Os compostos apresentaram padrões semelhantes frente as enzimas, nos quais demonstraram em comum o perfil suscetível para inibição das isoformas CYP1A2, CYP2C9 e CYP2D6, porém contrário para agirem como substrato ou inibidores das isoformas CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4.

Os inibidores enzimáticos prejudicam o processo de biotransformação ou depuração de todas as drogas usadas clinicamente, resultando em maiores níveis plasmáticos de drogas que

influenciam o resultado terapêutico e aumentam as chances de reações adversas (MANIKANDAN; NAGINI, 2017). Entretanto, o efeito predominante desses compostos é sobre a isoforma CYP3A4, devido a sua função em metabolizar em média dois terços de todos os fármacos clinicamente utilizados e sua maior expressão no fígado, correspondente a aproximadamente 40% do total. Os substratos dessa isoforma sofrem reações metabólicas que podem incluir: *N*-oxidação, *C*-oxidação, *N*-desalquilação, *O*-desalquilação, nitrorredução, desidratação e *C*-hidroxilação (ZHOU, 2008).

Assim, a análise pelo XenoSite ressalta os principais pontos de metabolização nas principais reações de fase 1 de acordo com a estrutura dos compostos. A partir da análise dos compostos AMTAC-01 e AMTAC-22 (Figura 57), observamos uma maior suscetibilidade a biotransformação por oxidação nas porções da estrutura com ligações insaturadas do tipo sp^2 , enquanto não são observados pontos favoráveis para ocorrência de hidrólise e redução.

Figura 57 - Metabolismo de fases 1 e 2 dos compostos espiro-acridínicos



Fonte: Aatoria (2024). Legenda: pontos suscetíveis a reações de metabolismo variam de 0 (azul claro) a 1 (verde).

Adicionalmente, a ferramenta *on-line* XenoSite também fornece a predição de metabolização de fase 2 por conjugação com ácido glicurônico. Uridina 5'-difosfo-

glucosiltransferases (UGTs) metabolizam 15% dos medicamentos aprovados pela FDA e são responsáveis por conjugar o ácido glicurônico à xenobióticos, especificamente à átomos de oxigênio, nitrogênio, enxofre e carbono, em ordem decrescente de probabilidade (DANG et al., 2016). Desse modo, como apresentado na figura 57, o AMTAC-22 apresenta a suscetibilidade para conjugação nos átomos de nitrogênio secundários inseridos nos anéis acridínico e indólico, enquanto o AMTAC-01 demonstrou predisposição no NH acridínico e em ligações adjacentes às insaturadas.

Logo, a totalidade dos resultados *in silico* demonstram a viabilidade farmacocinética e farmacodinâmica dos derivados espiro-acridínicos, fornecendo novos direcionamentos para continuidade dos estudos a fim de compreender o modo de ação desses compostos e, conseqüentemente, informações relevantes para embasar modificações moleculares que possam mitigar os problemas associados à alta toxicidade às células do hospedeiro.

4.4 Conclusão

O *scaffold* acridínico apresenta destaque na pesquisa para o desenvolvimento de compostos com atividade farmacológica. Nesse âmbito, derivados espiro-acridínicos vêm sendo desenvolvidos e têm demonstrado promissora atividade quimioterápica. Portanto, esse trabalho propôs a síntese e avaliação do potencial leishmanicida e tripanocida dos compostos espiro-acridínicos AMTAC-01 e AMTAC-22, previamente apresentados nos trabalhos de Almeida e colaboradores (2016) e Pinheiro Segundo (2020).

Para isso, realizou-se a ressíntese dos compostos intermediários e finais e, a fim de avaliar os derivados espiro-acridínicos *in vitro*, esses foram previamente analisados quanto à pureza e aprovados. Subsequentemente, esses foram avaliados frente duas espécies de *Leishmania sp.* Ambos compostos apresentaram uma promissora atividade leishmanicida frente formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, com valores de IC₅₀ variando entre 1,3 e 2,2 µg mL⁻¹. Porém, houve um aumento nos valores de IC₅₀ frente amastigotas, especialmente em *L. infantum*, indicando uma seletividade entre formas morfológicas. Além disso, ao determinar o efeito dos compostos frente macrófagos, hemácias e células Vero, pouca seletividade foi observada para os parasitos.

A avaliação do efeito tripanocida frente formas amastigotas de tripomastigotas de *T. cruzi* demonstrou um comportamento semelhante dos compostos frente as duas formas morfológicas. Contudo, ao se avaliar frente as espécies tripomastigotas isoladamente, o derivado AMTAC-22 se destacou ao apresentar um valor de LC₅₀ mais desejável que o controle positivo, indicando a potencialidade desse composto para essa finalidade. No entanto, semelhantemente ao ensaio anterior, os compostos apresentaram toxicidade frente células L929.

A fim de compreender os mecanismos realizados pelos compostos espiro-acridínicos, o AMTAC-22 foi avaliado quanto a capacidade de interagir com ssDNA e os resultados foram confrontados com os do AMTAC-01, previamente publicados. Os resultados indicaram possível intercalação ao DNA, e foram confirmados por avaliações por ancoragem molecular. Dada a relevância dessa macromolécula como alvo para atividade quimioterápica, é plausível considerar seu envolvimento na ação antiparasitária desses compostos. No entanto, acredita-se que esse não seja o principal mecanismo de ação dos derivados espiro-acridínicos e, diante disso, realizaram-se estudos teóricos *in silico* em alvos essenciais para sobrevivência dos parasitos.

Os resultados de *docking* molecular demonstraram que o derivado AMTAC-01 apresentou maior afinidade por alvos de *Leishmania*, como CPBLa e Topo 1, enquanto o

AMTAC-22 demonstrou melhores resultados em alvos de *T. cruzi*, destacando-se TFI e CYP51. Selecionados os melhores complexos, esses foram avaliados por dinâmica molecular, que evidenciou o complexo entre AMTAC-01 e CPBLa como mais estável, seguido do complexo formado entre AMTAC22-TFI. A partir disso, pressupomos esses como uns dos alvos responsáveis pela ação antiparasitária evidenciada *in vitro* para os respectivos compostos.

Adicionalmente, quando avaliados quanto as propriedades de ADMET, as estruturas propostas encaixam-se dentro dos parâmetros físico-químicos para administração por via oral, sendo potencialmente absorvidos pelo TGI e metabolizados por enzimas do complexo CYP450, encaixando-se nos parâmetros de *druglikeness* de Lipinski, Veber, Egan e Muegge.

Portanto, observamos que a modificação molecular realizada do AMTAC-01 para o AMTAC-22, pelo bioisosterismo não clássico de anel, favoreceu o perfil tripanocida do *scaffold* espiro-acridínico *in vitro* e *in silico*, propondo esse como um modelo promissor para otimização estrutural por estratégias de SBDD, a fim de aumentar a afinidade e especificidade pelo alvo de *T. cruzi*. No entanto, a alteração de anel não modificou substancialmente o perfil de toxicidade, desse modo, para ambas moléculas se sugere a inclusão em um sistema de entrega de fármacos que direcionem a liberação do composto na célula-alvo e resultem na mitigação da toxicidade enquanto é mantida a potencialidade farmacológica.

Desse modo, esses resultados ressaltam a potência antileishmania e tripanocida inerente a estrutura espiro-acridínica e a viabilidade de estudos adicionais com esses compostos para elucidar os mecanismos de ação envolvidos e proporcionar embasamento para o emprego de estratégias que visem a melhoria do perfil de candidatos a fármacos.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-, and IL-12 Regulate Innate and Acquired Immunity to Infection. **Experimental Parasitology**, 1996. v. 84, p. 231–244.

AGUILERA, E. et al. Potent and Selective Inhibitors of Trypanosoma cruzi Triosephosphate Isomerase with Concomitant Inhibition of Cruzipain: Inhibition of Parasite Growth through Multitarget Activity. **ChemMedChem**, 2016. p. 1328–1338.

AHMED JUVALE, I. I. et al. P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease. **Heliyon**, 2022. v. 8, n. 6, p. e09777. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09777>>.

AHUA, K. M. et al. Antileishmanial and antifungal acridone derivatives from the roots of *Thamnosma rhodesica*. **Phytochemistry**, 2004. v. 65, n. 7, p. 963–968.

AIER, I.; VARADWAJ, P. K.; RAJ, U. Structural insights into conformational stability of both wild-type and mutant EZH2 receptor. **Scientific Reports**, 2016. v. 6, n. October, p. 1–10.

ALDASORO, E. et al. What to expect and when: Benznidazole toxicity in chronic Chagas' disease treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2018. v. 73, n. 4, p. 1060–1067.

ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to Leishmania infection: Is this paradigm still relevant? **Frontiers in Immunology**, 2012. v. 3, n. APR.

ALMEIDA, F. S. et al. In vitro anti-Leishmania activity and molecular docking of spiro-acridine compounds as potential multitarget agents against *Leishmania infantum*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2021. v. 49, n. March.

ALMEIDA, Letícia DE et al. Benzophenone derivatives as cysteine protease inhibitors and biological activity against *Leishmania(L.) amazonensis* amastigotes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, out. 2015. v. 75, p. 93–99.

ALMEIDA, P. S. V. B. DE et al. Cytotoxicity evaluation and DNA interaction of RuII-bipy complexes containing coumarin-based ligands. **Dalton Transactions**, 2021. v. 50, n. 41, p. 14908–14919.

ALMEIDA, S. M. V. DE et al. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016. v. 92, p. 467–475.

ALMEIDA, S. M. V. DE et al. DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2017. v. 96, n. October, p. 1538–1556. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.054>>.

ALSAEDI, S. et al. Dna-binding and cytotoxicity of copper(I) complexes containing functionalized dipirydylphenazine ligands. **Pharmaceutics**, 2021. v. 13, n. 5.

ANVERSA, L. S. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, 2018. v. 64, n. 3, p. 281–289.

APUY, J. L. et al. Ratiometric Pulsed Alkylation Mass Spectrometry as a Probe of Thiolate Reactivity in Different Metalloderivatives of Staphylococcus aureus pI258 CadC.

Biochemistry, 2004. v. 43, n. 13, p. 3824–3834.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, Solange L De. Resposta do hospedeiro à infecção.

Doença de chagas: manual para experimentação animal, 2000. p. 368. Disponível em:

<<http://books.scielo.org>>.

ARAÚJO-VILGES, K. M. DE et al. Effect of pipartine and cinnamides on Leishmania amazonensis, Plasmodium falciparum and on peritoneal cells of Swiss mice.

Pharmaceutical Biology, 2017. v. 55, n. 1, p. 1601–1607. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1313870>>.

ARAUJO FLORES, G. V. et al. Th17 lymphocytes in atypical cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (L.) infantum chagasi in Central America. **Parasite Immunology**, 2020. v. 42, n. 11.

ARONSON, N. et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, 2016. v. 63, n. 12, p. E202–E264.

ASEMAN, M. D. et al. Cycloplatinated(II) Derivatives of Mercaptopurine Capable of Binding Interactions with HSA/DNA. **Inorganic Chemistry**, 2019. v. 58, n. 23, p. 16154–16170.

ASTELBAUER, F. et al. Anti-leishmanial activity of plant-derived acridones, flavaglines, and sulfur-containing amides. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 2011. v. 11, n. 7, p. 793–798.

AUCAMP, J.; ZUMA, N. H.; N'DA, D. D. In vitro efficacy of synthesized artemisinin derivatives against Leishmania promastigotes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2020. v. 30, n. 22, p. 127581. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127581>>.

AVILA-GARCA, M. et al. Transmission to Humans. **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**, 2014.

AZIM, M. K. et al. Identification of acridinyl hydrazides as potent aspartic protease inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2008. v. 18, n. 9, p. 3011–3015.

BACILIERI, M.; MORO, S. Ligand-Based Drug Design Methodologies in Drug Discovery Process: An Overview. **Current Drug Discovery Technologies**, 2007. v. 3, n. 3, p. 155–165.

BADIRZADEH, A. et al. Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of Leishmania parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2017. v. 11, n. 7, p. 1–22.

BAIOCCO, P. et al. Inhibition of Leishmania infantum trypanothione reductase by azole-based compounds: A comparative analysis with its physiological substrate by x-ray crystallography. **ChemMedChem**, 2013. v. 8, n. 7, p. 1175–1183.

BAKCHI, B. et al. An overview on applications of SwissADME web tool in the design and development of anticancer, antitubercular and antimicrobial agents: A medicinal chemist's perspective. **Journal of Molecular Structure**, 2022. v. 1259, p. 132712. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132712>>.

- BANERJEE, A. et al. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in Leishmania pathogenesis and in protective immunity by Leishmania vaccines. **Cellular Immunology**, 2016. v. 309, p. 37–41.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, Carlos Alberto Mansour. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Terapêutica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- BART, G. et al. Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of Leishmania mexicana. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 1997. v. 88, n. 1–2, p. 53–61.
- BATTISTA, T. et al. Targeting trypanothione reductase, a key enzyme in the redox trypanosomatid metabolism, to develop new drugs against leishmaniasis and trypanosomiasis. **Molecules**, 2020. v. 25, n. 8.
- BECKER, Ingeborg et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 2003. v. 130, n. 2, p. 65–74.
- BELL, E. W.; ZHANG, Yang. DockRMSD: An open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. **Journal of Cheminformatics**, 2019. v. 11, n. 1.
- BERN, C. et al. Trypanosoma cruzi and chagas' disease in the united states. **Clinical Microbiology Reviews**, 2011. v. 24, n. 4, p. 655–681.
- BERNARDES, C. et al. Biochimie Increasing in cysteine proteinase B expression and enzymatic activity during in vitro differentiation of Leishmania (Viannia) braziliensis : First evidence of modulation during morphological transition a. 2017. v. 133, p. 28–36.
- BERNARDO, P. H.; TONG, J. C. In silico design of small molecules. **Methods in Molecular Biology**, 2012. v. 800, p. 25–31.
- BHATTACHARYA, S. et al. In vivo and in vitro antileishmanial activity of Bungarus caeruleus snake venom through alteration of immunomodulatory activity. **Experimental Parasitology**, 2013. v. 135, n. 1, p. 126–133. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.006>>.
- BIVONA, A. E. et al. Recombinant cysteine proteinase B from leishmania braziliensis and its domains: Promising antigens for serodiagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, 2019. v. 57, n. 11, p. 1–13.
- BOND, C. S. et al. Crystal structure of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. **Structure**, 1999. v. 7, n. 1, p. 81–89.
- BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2 ed ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.
- BUCKNER, F. S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against Trypanosoma cruzi using parasites expressing β -galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1996. v. 40, n. 11, p. 2592–2597.
- CAFFREY, C. R. et al. Bis-acridines as lead antiparasitic agents: structure-activity analysis of a discrete compound library in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2007. v. 51, n. 6, p. 2164–2172.
- CAMACHO, C. et al. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, dez.

2009. v. 10, n. 1, p. 421.

CANALS, A. et al. The anticancer agent ellipticine unwinds DNA by intercalative binding in an orientation parallel to base pairs. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, 2005. v. 61, n. 7, p. 1009–1012.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the immune response by trypanosoma cruzi during acute infection. **Frontiers in Immunology**, 2016. v. 6, n. JAN, p. 1–15.

CARNEIRO, P. P. et al. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, 2016. v. 11, n. 2, p. 1–16.

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

CATALÁ, S. S.; NOIREAU, F.; DUJARDIN, J. P. Biology of Triatominae. **American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition**, 2017. p. 145–167.

CESTARI, I. et al. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. **Molecular Immunology**, 2013. v. 53, n. 4, p. 328–334. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2012.08.015>>.

CHAUDHARY, K. K.; MISHRA, N. A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery. **JSM Chem**, 2016. v. 4, n. 3, p. 1029.

CHAWLA, B. et al. Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin -susceptible -resistant *leishmania donovani*. **PLoS ONE**, 2011. v. 6, n. 10.

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

CHIBALE, K. et al. Antiprotozoal and cytotoxicity evaluation of sulfonamide and urea analogues of quinacrine. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2001. v. 11, n. 19, p. 2655–2657.

CLASSEN, A.; LLOBERAS, J.; CELADA, A. Chapter 3 Macrophage Activation : Classical vs . Alternative. **Macrophages and Dendritic Cells**. [S.l.]: [s.n.], 2009, V. 531, p. 29–43.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: From arginine to trypanothione. **Amino Acids**, 2011. v. 40, n. 2, p. 269–285.

CONCEIÇÃO, J. R. DA et al. Neglected tropical diseases and systemic racism especially in Brazil: from socio-economic aspects to the development of new drugs. **Acta tropica**, 2022. v. 235, n. June, p. 106654.

COSTA-DA-SILVA, A. C. et al. Immune Responses in Leishmaniases: An Overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, 2022. v. 7, n. 4, p. 1–16.

COURA, J. R.; CASTRO, Solange L. DE. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2002. v. 97, n. 1, p. 3–24.

COURRET, N. et al. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following

phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **Journal of Cell Science**, 2002. v. 115, n. 11, p. 2303–2316.

CRUZ, A. C. N. DA et al. Biological evaluation of arylsemicarbazone derivatives as potential anticancer agents. **Pharmaceuticals**, 2019. v. 12, n. 4, p. 1–23.

CUNHA, S.; SANTANA, L. L. B. DE. Condensação de knoevenagel de aldeídos aromáticos com o ácido de Meldrum em água: Uma aula experimental de química orgânica verde. **Química Nova**, 2012. v. 35, n. 3, p. 642–647.

DAI, Y. et al. Computational study on fused five membered heterocyclic compounds containing tertiary oxygen. **Journal of Molecular Structure**, 2017. v. 1129, p. 98–104.

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

DANG, N. LE et al. A simple model predicts UGT-mediated metabolism. **Bioinformatics**, 2016. v. 32, n. 20, p. 3183–3189.

DAVIES, D. R. et al. The structure of the transition state of the heterodimeric topoisomerase I of *Leishmania donovani* as a vanadate complex with nicked DNA. **Journal of Molecular Biology**, 2006. v. 357, n. 4, p. 1202–1210.

DENG, H. et al. Activity-based protein profiling: Recent advances in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2020. v. 191, p. 112151. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112151>>.

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS, M. Da S. Neglected diseases: The strategies of the Brazilian ministry of health. **Revista de Saude Publica**, 2010. v. 44, n. 1, p. 200–202.

DINIZ, L. De F. et al. Outcome of E1224-Benznidazole combination treatment for infection with a multidrug-resistant trypanosoma cruzi strain in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2018. v. 62, n. 6.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. **Parasites and Vectors**, 2012. v. 5, n. 1, p. 1–12.

DUARTE, C.; BARREIRO, E.; FRAGA, C. Privileged Structures: A Useful Concept for the Rational Design of New Lead Drug Candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 2007. v. 7, n. 11, p. 1108–1119.

DUBIE, T.; MOHAMMED, Y. Review on the Role of Host Immune Response in Protection and Immunopathogenesis during Cutaneous Leishmaniasis Infection. **Journal of Immunology Research**, 2020. v. 2020.

EBERLE, R. J. et al. The Repurposed Drugs Suramin and Quinacrine Cooperatively Inhibit SARS-CoV-2 3CL^{pro} In Vitro. **Viruses**, maio. 2021. v. 13, n. 5, p. 873.

ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, 2019. v. 33, n. 1, p. 119–134.

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

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Infection in**

Developing Countries, 2014. v. 8, n. 8, p. 961–972.

ELMAHALLAWY, E. K.; ALKHALDI, A. A. M.; SALEH, A. A. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2021. v. 139, n. April, p. 111671. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111671>>.

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

ESPIR, T. T. et al. The Role of Inflammatory, Anti-Inflammatory, and Regulatory Cytokines in Patients Infected with Cutaneous Leishmaniasis in Amazonas State, Brazil. **Journal of Immunology Research**, 2014. v. 2014, n. 481750, p. 10.

FALK, R. et al. Induction of interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α and apoptosis in mouse organs by amphotericin B is neutralized by conjugation with arabinogalactan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2005. v. 55, n. 5, p. 713–720.

FALSAFI-ZADEH, S.; KARIMI, Z.; GALEHDARI, H. VMD DisRg: New User-Friendly Implement for calculation distance and radius of gyration in VMD program. **Bioinformation**, 2012. v. 8, n. 7, p. 341–343.

FEASEY, N. et al. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, 2010. v. 93, n. 1, p. 179–200.

FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2007. v. 623, n. 1–2, p. 14–23.

FERREIRA, L. G.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. From medicinal chemistry to human health: Current approaches to drug discovery for cancer and neglected tropical diseases. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2018. v. 90, n. 1, p. 645–661.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Editorial: Chemoinformatics Approaches to Structure- and Ligand-Based Drug Design. **Frontiers in Pharmacology**, 2018. v. 9.

FERREIRA, L. L. G.; MORAES, J. DE; ANDRICOPULO, A. D. Approaches to advance drug discovery for neglected tropical diseases. **Drug Discovery Today**, 2022. v. 27, n. 8, p. 2278–2287. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.04.004>>.

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

FRANÇA, F. D. et al. Amphotericin B nephrotoxicity in vitro: Differential profile of PKC signaling in VERO and MDCK cell lines. **Current Topics in Toxicology**, 2014. v. 9, n. February 2016, p. 15–19.

FREITAS, P. G. et al. An in silico study of benzophenone derivatives as potential non-competitive inhibitors of trypanosoma cruzi and Leishmania amazonensis cysteine proteinases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2018. v. 29, n. 3, p. 515–527.

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

- FUENTES-VICENTE, J. A. DE et al. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. **Acta Tropica**, 2018. v. 183, p. 23–31.
- FUENTES-VICENTE, J. A. DE et al. *Trypanosoma cruzi*: A review of biological and methodological factors in Mexican strains. **Acta Tropica**, 2019. v. 195, n. April, p. 51–57. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.04.024>>.
- GABRIEL, Á. et al. Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. **Journal of Immunology Research**, 2019. v. 2019.
- GAMAGE, S. A. et al. Structure-activity relationships for the antileishmanial and antitrypanosomal activities of 1'-substituted 9-anilinoacridines. **Journal of Medicinal Chemistry**, 1997. v. 40, n. 16, p. 2634–2642.
- GANESAN, A.; COOTE, M. L.; BARAKAT, K. Molecular dynamics-driven drug discovery: leaping forward with confidence. **Drug Discovery Today**, 2017. v. 22, n. 2, p. 249–269. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2016.11.001>>.
- GANORKAR, S. B.; HEYDEN, Y. Vander. Recent trends in pharmaceutical analysis to foster modern drug discovery by comparative in-silico profiling of drugs and related substances. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2022. v. 157, p. 116747. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116747>>.
- GAO, C. et al. Novel synthetic 2-amino-10-(3,5-dimethoxy)benzyl-9(10H)-acridinone derivatives as potent DNA-binding antiproliferative agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2010. v. 18, n. 21, p. 7507–7514.
- GENESTRA, M. et al. Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, 2003. v. 8, n. 1, p. 1–6.
- GENG, W. et al. Interactions of Amino Group Functionalized Tetraphenylvinyl and DNA: A Label-Free “On-Off-On” Fluorescent Aptamer Sensor toward Ampicillin. **Biosensors**, 2023. v. 13, n. 5.
- GENHEDEN, S.; RYDE, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert Opinion on Drug Discovery**, 2015. v. 10, n. 5, p. 449–461.
- GEORGES, E. et al. Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1990. v. 87, n. 1, p. 152–156.
- 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**, 1999. v. 1, n. 1, p. 55–68.
- GILLMOR, S. A.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. **Protein Science**, ago. 1997. v. 6, n. 8, p. 1603–1611.
- GIORGIO, C. DI et al. In vitro activities of 7-substituted 9-chloro and 9-amino-2-methoxyacridines and their bis- and tetra-acridine complexes against *Leishmania infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2003. v. 47, n. 1, p. 174–180.

- GIORGIO, C. DI et al. Synthesis and antileishmanial activity of 6-mono-substituted and 3,6-di-substituted acridines obtained by acylation of proflavine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2007. v. 42, n. 10, p. 1277–1284.
- GIRAULT, S. et al. Antimalarial, antitrypanosomal, and antileishmanial activities and cytotoxicity of bis(9-amino-6-chloro-2-methoxyacridines): Influence of the linker. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2000. v. 43, n. 14, p. 2646–2654.
- GIUDICE, A. et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, 2007. v. 7, p. 1–12.
- GLISIC, S. et al. Arginase flavonoid anti-leishmanial in silico inhibitors flagged against anti-targets. **Molecules**, 2016. v. 21, n. 5.
- GOMES, C. B. et al. Increasing in cysteine proteinase B expression and enzymatic activity during in vitro differentiation of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: First evidence of modulation during morphological transition. **Biochimie**, 2017. v. 133, p. 28–36.
- GOMES, J. N. S. et al. Topoisomerase Enzyme Inhibitors as Potential Drugs Against Cancer: What Makes Them Selective or Dual? – A Review. **Current Pharmaceutical Design**, 2022. v. 28, n. 34, p. 2800–2824.
- GOMES, K. W. P. et al. Leishmaniose tegumentar em paciente com espondilite anquilosante utilizando adalimumabe. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2012. v. 52, n. 3, p. 450–452.
- GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. Da C. et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, 2017. v. 8, n. OCT.
- GONI, L. K. M. O. et al. Acridine and Its Derivatives: Synthesis, Biological, and Anticorrosion Properties. **Materials**, 2022. v. 15, n. 21, p. 1–15.
- GONZÁLEZ-MORALES, L. D. et al. Triose Phosphate Isomerase Structure-Based Virtual Screening and In Vitro Biological Activity of Natural Products as *Leishmania mexicana* Inhibitors. **Pharmaceutics**, 2023. v. 15, n. 8.
- GORHAM, R. D.; RODRIGUEZ, W.; MORIKIS, D. Molecular analysis of the interaction between staphylococcal virulence factor Sbi-IV and complement C3d. **Biophysical Journal**, 2014. v. 106, n. 5, p. 1164–1173.
- GOUVEIA, R. G. **Síntese, caracterização estrutural e avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos derivados espiro-acridínicos**. [S.l.]: Universidade Estadual da Paraíba, 2017.
- GOUVEIA, R. G. et al. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2018. v. 26, n. 22, p. 5911–5921.
- GUAN, L. et al. ADMET-score-a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. **MedChemComm**, 2019. v. 10, n. 1, p. 148–157.
- GÜNDÜZ, M. G. et al. Design, synthesis and computational analysis of novel acridine-(sulfadiazine/sulfathiazole) hybrids as antibacterial agents. **Journal of Molecular Structure**, 2019. v. 1186, p. 39–49.
- GURJAR, D. et al. *Leishmania* intercepts IFN- γ R signaling at multiple levels in macrophages.

Cytokine, 2022. v. 157.

HAMMOND, D. J.; HOGG, J.; GUTTERIDGE, W. E. Trypanosoma cruzi: Possible control of parasite transmission by blood transfusion using amphiphilic cationic drugs. **Experimental Parasitology**, 1985. v. 60, n. 1, p. 32–42.

HARGROVE, T. Y. et al. Substrate preferences and catalytic parameters determined by structural characteristics of sterol 14 α -demethylase (CYP51) from Leishmania infantum. **Journal of Biological Chemistry**, 2011. v. 286, n. 30, p. 26838–26848.

HIDE, M.; BAÑULS, A. L. Polymorphisms of cpb multicopy genes in the Leishmania (Leishmania) donovani complex. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2008. v. 102, n. 2, p. 105–106.

HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. **Neuron**, 2018. v. 99, n. 6, p. 1129–1143. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>>.

HOTEZ, P. J. et al. World neglected tropical diseases day. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2020. v. 14, n. 1, p. 1–4.

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

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, 2010. v. 33, n. 10, p. 2148–2154.

HUBER, W.; KOELLA, J. C. A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drug resistance of malaria parasites. **Acta Tropica**, 1993. v. 55, n. 4, p. 257–261.

HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different Leishmania Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends in Parasitology**, 2016. v. 32, n. 5, p. 392–401.

HURST, S. M. et al. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. **Immunity**, 2001. v. 14, n. 6, p. 705–714.

IDRIS, M. O. et al. Computer-aided screening for potential TMPRSS2 inhibitors: a combination of pharmacophore modeling, molecular docking and molecular dynamics simulation approaches. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2020. p. 1–19.

IHMELS, H.; OTTO, D. Intercalation of Organic dye molecules into double-stranded DNA - General principles and recent developments. **Topics in Current Chemistry**, 2005. v. 258, p. 161–204.

IKEOGU, N. M. et al. Leishmania immunity: Advancing immunotherapy and vaccine development. **Microorganisms**, 2020. v. 8, n. 8, p. 1–21.

JACOBY, E. M. et al. Crystal structure of the Trypanosoma cruzi trypanothione reductase·mepacrine complex. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, 1996. v. 24, n. 1, p. 73–80.

JANGIR, D. K. et al. Assessment of amsacrine binding with DNA using UV-visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and**

Photobiology B: Biology, 2012. v. 114, p. 38–43. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.05.005>>.

JANOVEC, L. et al. Cytotoxic 3,6-bis((imidazolidinone)imino)acridines: Synthesis, DNA binding and molecular modeling. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2011. v. 19, n. 5, p. 1790–1801.

JOHARI-AHAR, M. et al. Intercalation of anticancer drug mitoxantrone into DNA: Studied by spectral and surface plasmon resonance methods. **Journal of Molecular Structure**, 2023. v. 1274, p. 134509. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134509>>.

KAGAN, S. et al. Toxicity mechanisms of amphotericin B and its neutralization by conjugation with arabinogalactan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2012. v. 56, n. 11, p. 5603–5611.

KAMMALA, A. K. et al. Expression of CYP450 enzymes in human fetal membranes and its implications in xenobiotic metabolism during pregnancy. **Life Sciences**, 2022. v. 307, n. August, p. 120867. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120867>>.

KAYA, M.; YILDIRIR, Y.; ÇELİK, G. Y. Synthesis, Characterization, and In Vitro Antimicrobial and Antifungal Activity of Novel Acridines. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, 2015. v. 48, n. 11, p. 722–726.

KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, 2014. v. 141, n. 12, p. 1544–1562.

KETRON, A. C. et al. Amsacrine as a topoisomerase II poison: Importance of drug-DNA interactions. **Biochemistry**, 2012. v. 51, n. 8, p. 1730–1739.

KHEZRI, A. et al. Molecular dynamic of curcumin/chitosan interaction using a computational molecular approach: Emphasis on biofilm reduction. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018. v. 114, p. 972–978.

KHORASANI-MOTLAGH, M. et al. Fluorescence studies, DNA binding properties and antimicrobial activity of a dysprosium(III) complex containing 1,10-phenanthroline. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2013. v. 127, p. 192–201. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.08.009>>.

KIMA, P. E. Leishmania molecules that mediate intracellular pathogenesis. **Microbes and Infection**, 2014. v. 16, n. 9, p. 721–726. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2014.07.012>>.

KIP, A. E. et al. Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, 2018. v. 57, n. 2, p. 151–176.

KOŁODZIEJ, H.; KIDERLEN, A. F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. **Phytochemistry**, 2005. v. 66, n. 17 SPEC. ISS., p. 2056–2071.

KOMURA, H. et al. A public–private partnership to enrich the development of in silico predictive models for pharmacokinetic and cardiotoxic properties. **Drug Discovery Today**, 2021. v. 26, n. 5, p. 1275–1283. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.024>>.

KOO, S. et al. Generation in Response to Trypanosoma cruzi. **Infection and Immunity**, 2016. v. 84, n. 12, p. 3527–3541.

- KOUR, P. et al. DNA topoisomerases as a drug target in Leishmaniasis: Structural and mechanistic insights. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2024. v. 256.
- KRYSHTAFOVYCH, A. et al. Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP)—Round XIV. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, 2021. v. 89, n. 12, p. 1607–1617.
- KUDRYAVTSEVA, T. N. et al. Synthesis and antimicrobial activity of acridine carboxylic acid derivatives containing a piperazine moiety. **Russian Chemical Bulletin**, 2017. v. 66, n. 1, p. 123–128.
- KUMAR, Awanish; JHA, A. Drug Development Strategies. **Anticandidal Agents**, 2017. n. Mic, p. 63–71.
- KUMAR, P.; KUMAR, Rajesh; PRASAD, D. N. Synthesis and anticancer study of 9-aminoacridine derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, 2013. v. 6, n. 1, p. 79–85.
- KUMAR, Ramesh; KAUR, M.; KUMARI, M. Acridine: A versatile heterocyclic nucleus. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, 2012. v. 69, n. 1, p. 3–9.
- KUMARI, R.; KUMAR, Rajendra; LYNN, A. g_mmpbsa —A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, jul. 2014. v. 54, n. 7, p. 1951–1962.
- KUSHAWAHA, P. K. et al. Leishmania donovani Triose Phosphate Isomerase: A Potential Vaccine Target against Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE**, 2012. v. 7, n. 9.
- LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, 2006. p. 1–954.
- LANG, X. et al. Novel synthetic acridine derivatives as potent DNA-binding and apoptosis-inducing antitumor agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2013. v. 21, n. 14, p. 4170–4177.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, abr. 1993. v. 26, n. 2, p. 283–291.
- LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, 2016. v. 12, p. 2694–2718.
- LEPESHEVA, G. I. et al. Structural insights into inhibition of sterol 14 α -demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, 2010. v. 285, n. 33, p. 25582–25590.
- LI, Q. Application of Fragment-Based Drug Discovery to Versatile Targets. **Frontiers in Molecular Biosciences**, 2020. v. 7, n. August, p. 1–13.
- LIAO, C. et al. Molecular docking and structure-based virtual screening. **In Silico Drug Discovery and Design**, 2013. p. 6–20.
- LIDANI, K. C. F. et al. The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Microbiology**, 2017. v. 8, n. APR, p. 1–14.
- LIMA SERAFIM, V. DE et al. New thiophene–acridine compounds: Synthesis, antileishmanial activity, DNA binding, chemometric, and molecular docking studies. **Chemical Biology and Drug Design**, 2018. v. 91, n. 6, p. 1141–1155.

- LING, X. et al. Spectroscopic studies on the interaction of pazufloxacin with calf thymus DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2008. v. 93, n. 3, p. 172–176.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 1997. v. 23, n. 1–3, p. 3–25.
- LIU, Q. et al. Synthesis, DNA binding and cleavage activity of macrocyclic polyamines bearing mono- or bis-acridine moieties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2010. v. 45, n. 11, p. 5302–5308.
- LIU, Xuewei et al. Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, 2018. v. 13, n. 1, p. 23–37. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1403419>>.
- LOPES, M. F.; COSTA-DA-SILVA, A. C.; DOSREIS, G. A. Innate immunity to Leishmania infection: Within phagocytes. **Mediators of Inflammation**, 2014. v. 2014.
- LUCENA, A. C. R. et al. Quantitative phosphoproteome and proteome analyses emphasize the influence of phosphorylation events during the nutritional stress of *Trypanosoma cruzi*: the initial moments of in vitro metacyclogenesis. **Cell Stress and Chaperones**, 2019. v. 24, n. 5, p. 927–936.
- M. HONORIO, K.; L. MODA, T.; D. ANDRICOPULO, A. Pharmacokinetic Properties and In Silico ADME Modeling in Drug Discovery. **Medicinal Chemistry**, 2013. v. 9, n. 2, p. 163–176.
- MAGALHÃES, L. M. D. et al. Review Pathogen diversity , immunity , and the fate of infections : lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human – host interactions. 2022. p. 711–722.
- MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. The epidemiology, clinical manifestations, and management of chagas heart disease. **Clinical Cardiology**, 2015. v. 38, n. 9, p. 565–569.
- MALLU, L.; THIRUMALAI, D.; ASHARANI, I. V. One-pot cascade synthesis and in vitro evaluation of anti-inflammatory and antidiabetic activities of S-methylphenyl substituted acridine-1,8-diones. **Chemical Biology and Drug Design**, 2017. v. 90, n. 4, p. 520–526.
- MAMIDALA, R. et al. Identification of *Leishmania donovani* Topoisomerase 1 inhibitors via intuitive scaffold hopping and bioisosteric modification of known Top 1 inhibitors. **Scientific Reports**, 2016. v. 6.
- MANCHESTER, T. et al. Acriflavine treatment promotes dyskinetoplasty in *Trypanosoma cruzi* as revealed by ultrastructural analysis. **Parasitology**, 2013. v. 140, p. 1422–1431.
- MANGUEIRA, V. M. et al. A 9-aminoacridine derivative induces growth inhibition of Ehrlich ascites carcinoma cells and antinociceptive effect in mice. **Frontiers in Pharmacology**, 2022. v. 13.
- MANIKANDAN, P.; NAGINI, S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. **Current Drug Targets**, 2017. v. 19, n. 1, p. 38–54.
- MARSHALL, J. S. et al. An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, 2018. v. 14.

- MARTÍN-ESCOLANO, J. et al. An Updated View of the Trypanosoma cruzi Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. **ACS Infectious Diseases**, 2022. v. 8, n. 6, p. 1107–1115.
- MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. **Annual Review of Immunology**, 2009. v. 27, p. 451–483.
- MARTÍNEZ, L. Automatic identification of mobile and rigid substructures in molecular dynamics simulations and fractional structural fluctuation analysis. **PLoS ONE**, 2015. v. 10, n. 3, p. 1–10.
- MARTINEZ, R.; CHACON-GARCIA, L. The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What did not Work. **Current Medicinal Chemistry**, 2005. v. 12, n. 2, p. 127–151.
- MATLOCK, M. K.; HUGHES, T. B.; SWAMIDASS, S. J. XenoSite server: A web-available site of metabolism prediction tool. **Bioinformatics**, 2015. v. 31, n. 7, p. 1136–1137.
- MAUEL, J. et al. 9-Anilinoacridines as potential antileishmanial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1993. v. 37, n. 5, p. 991–996.
- MAZZETI, A. L. et al. Review on experimental treatment strategies against trypanosoma cruzi. **Journal of Experimental Pharmacology**, 2021. v. 13, p. 409–432.
- MEIERING, S. et al. Inhibitors of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase revealed by virtual screening and parallel synthesis. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2005. v. 48, n. 15, p. 4793–4802.
- MENEGATTI, R.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour; BARREIRO, E. J. Importância da síntese de fármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, 2001. n. 3, p. 16–22.
- MENEZES, Thaís Meira et al. Spiro-acridine inhibiting tyrosinase enzyme: Kinetic, protein-ligand interaction and molecular docking studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019. v. 122, p. 289–297.
- MIRZAEI, A. et al. A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. **Cytokine**, 2021. v. 145, n. September, p. 155297. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155297>>.
- MOLKARA, S.; REZA TAHERI, A.; SABOURI RAD, S. Systemic Treatments of Leishmaniasis: A Narrative Review ARTICLE INFO ABSTRACT Article type Article history. **Medical Sciences (MUMS) Reviews in Clinical Medicine Rev Clin Med**, 2019. v. 6, n. 3. Disponível em: <<http://rcm.mums.ac.ir>>.
- MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, 2017. v. 389, n. 10066, p. 312–325. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30171-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30171-4)>.
- MONTANARI, C. A. **Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2011.
- MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. **Current Opinion in Microbiology**, 2004. v. 7, n. 4, p. 375–381.

- MOURA, Ricardo Olimpio De. **Síntese e avaliação in vitro de novos derivados isoquinolínicos, quinazolínicos, pirimidínicos e piridínicos acridínicos**. [S.l.]: Universidade Federal de Pernambuco, 2009.
- MOURA, W. C. Da S. **ESTUDO IN SILICO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO IN VITRO DE NOVOS DERIVADOS ACRIDÍNICOS COM POSSÍVEL AÇÃO ANTITUMORAL**. [S.l.]: Universidade Estadual da Paraíba, 2019.
- MUEGGE, I.; HEALD, S. L.; BRITTELLI, D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2001. v. 44, n. 12, p. 1841–1846.
- MUHAMMED, M. T.; AKI-YALCIN, E. Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. **Chemical Biology and Drug Design**, 2019. v. 93, n. 1, p. 12–20.
- MUKBEL, R. M. et al. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2007. v. 76, n. 4, p. 669–675.
- MUKHERJEE, S. et al. Sterol 14- α -demethylase is vital for mitochondrial functions and stress tolerance in *Leishmania major*. **PLoS Pathogens**, 2020. v. 16, n. 8, p. 1–26. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008810>>.
- MURRAY, C. W.; REES, D. C. The rise of fragment-based drug discovery. **Nature Chemistry**, 2009. v. 1, n. 3, p. 187–192.
- MUXEL, S. M. et al. Arginine and polyamines fate in leishmania infection. **Frontiers in Microbiology**, 2018. v. 8, n. JAN, p. 1–15.
- NARDY, A. F.; MORROT, A.; FREIRE-DE-LIMA, C. G. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of immunology research**, 2015. v. 2015, p. 178947.
- NASCIMENTO, I. J. Dos S.; AQUINO, T. M. DE; SILVA-JÚNIOR, E. F. DA. The New Era of Drug Discovery: The Power of Computer-aided Drug Design (CADD) . **Letters in Drug Design & Discovery**, 2022. v. 19, n. 11, p. 951–955.
- NEPALI, K. et al. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2014. v. 77, p. 422–487.
- OBREZANOVA, O. Artificial intelligence for compound pharmacokinetics prediction. **Current Opinion in Structural Biology**, 2023. v. 79, n. Figure 1, p. 102546. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102546>>.
- OLIVEIRA CARDOSO, J. M. DE et al. IL-10 receptor blockade controls the in vitro infectivity of *Leishmania infantum* and promotes a Th1 activation in PBMC of dogs with visceral leishmaniasis. **Molecular Immunology**, 2021. v. 137, p. 20–27.
- OLIVEIRA, D. B. C. DE et al. A new acridone with antifungal properties against *Candida* spp. and dermatophytes, and antibiofilm activity against *C. albicans*. **Journal of Applied Microbiology**, 2019. v. 127, n. 5, p. 1362–1372.
- ORGANIZATION, W. H. Neglected tropical diseases. **Health Topics**, 2023a. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1>. Acesso em: 27 fev. 2023.

- ORGANIZATION, W. H. Leishmaniasis. 2023b. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 3 jan. 2023.
- ORGANIZATION, W. H. Chagas disease. 2024. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 2 jan. 2024.
- OSUNA, A. et al. New antiparasitic agents: III. Comparison between trypanocidal activities of some acridine derivatives against trypanosoma cruzi in vitro. **Chemotherapy**, 1988. v. 34, n. 2, p. 127–133.
- OTA, R.; YAMASHITA, F. Application of machine learning techniques to the analysis and prediction of drug pharmacokinetics. **Journal of Controlled Release**, 2022. v. 352, n. November, p. 961–969. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.11.014>>.
- OTERO, L. et al. Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2006. v. 49, n. 11, p. 3322–3331.
- PAIVA, C. N.; MEDEI, E.; BOZZA, M. T. ROS and Trypanosoma cruzi: Fuel to infection, poison to the heart. **PLoS Pathogens**, 2018. v. 14, n. 4, p. 1–19.
- PANIGRAHI, S. K. Strong and weak hydrogen bonds in protein-ligand complexes of kinases: A comparative study. **Amino Acids**, 2008. v. 34, n. 4, p. 617–633.
- PATTERSON, S.; FAIRLAMB, A. H. Current and Future Prospects of Nitro-compounds as Drugs for Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **Current Medicinal Chemistry**, 2019. v. 26, n. 23, p. 4454–4475.
- PEDRAZA-ZAMORA, C. P. et al. Th17 cells and neutrophils: Close collaborators in chronic Leishmania mexicana infections leading to disease severity. **Parasite Immunology**, 2017. v. 39, n. 4, p. 1–13.
- PENICHE, A. G. et al. Development of an ex vivo lymph node explant model for identification of novel molecules active against leishmania major. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2014. v. 58, n. 1, p. 78–87.
- PEREIRA, B. A. S. et al. In silico predicted epitopes from the COOH-terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during Leishmania (Leishmania) amazonensis experimental murine infection. **BMC Immunology**, 2011. v. 12.
- PERRELLA BALESTIERI, F. M. et al. Leishmania (L.) amazonensis-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes and Infection**, 2002. v. 4, n. 1, p. 23–29.
- PIACENZA, L. et al. Peroxiredoxins play a major role in protecting Trypanosoma cruzi against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochemical Journal**, 2008. v. 410, n. 2, p. 359–368.
- PINHEIRO SEGUNDO, M. A. S. **DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E INCREMENTO DE SOLUBILIDADE DE NOVOS DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS**. [S.l.]: Universidade Federal de Pernambuco, 2020.
- PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2015. v. 58, n. 9, p. 4066–4072.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction. **Future Microbiology**, 2015. v. 10, n. 1, p. 111–129.

PONS, O. R. et al. Flow-injection analysis study of the chemiluminescent behaviour of proflavine and acriflavine. **Analytica Chimica Acta**, 2001. v. 438, n. 1–2, p. 149–156.

PRADA, C. F. et al. Gimatecan and other camptothecin derivatives poison Leishmania DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. **Biochemical Pharmacology**, 2013. v. 85, n. 10, p. 1433–1440.

PRESTI, M. S. LO et al. Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease. **Acta Tropica**, 2015. v. 145, p. 79–87. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.02.012>>.

PROTEIN DATA BANK. RCSB Protein Data Bank. 2023. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/>>.

PRUITT, K. D.; TATUSOVA, T.; MAGLOTT, D. R. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. **Nucleic Acids Research**, jan. 2007. v. 35, n. Database, p. D61–D65.

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

RAJÃO, M. A. et al. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in Trypanosoma cruzi. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 2014. v. 55, n. 4, p. 309–321.

RANGEL-GAMBOA, L. et al. Trypanosoma cruzi infection associated with atypical clinical manifestation during the acute phase of the Chagas disease. **Parasites and Vectors**, 2019. v. 12, n. 1, p. 1–6. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3766-3>>.

RAO, S. P. S. et al. Cyanotriazoles are selective topoisomerase II poisons that rapidly cure trypanosome infections. **Science**, 2023. v. 380, n. 6652, p. 1349–1356.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, 2010. v. 375, n. 9723, p. 1388–1402. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)>.

RATH, M. et al. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. **Frontiers in Immunology**, 2014. v. 5, n. OCT.

RESCIFINA, A. et al. Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2014. v. 74, p. 95–115.

RIBEIRO, V. et al. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 2020. v. 12, n. August 2019, p. 7–17. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.11.004>>.

RIOS, L. E. et al. Immunity and vaccine development efforts against Trypanosoma cruzi. **Acta Tropica**, 2019. v. 200, n. September, p. 105168. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105168>>.

ROBERTS, M. T. M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, 2005. v. 75–76, n. 1, p. 115–130.

- RODRIGUES, K. A. D. F. et al. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, 2015. v. 160, p. 32–40. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.024>>.
- RODRIGUES, R. F. et al. Investigation of trypanothione reductase inhibitory activity by 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives and molecular docking studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2012. v. 20, n. 5, p. 1760–1766.
- RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. **Parasites and Vectors**, 2016. v. 9, n. 1, p. 1–13. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1412-x>>.
- ROMA, E. H. et al. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in Leishmania amazonensis infection. **Parasites and Vectors**, 2016. v. 9, n. 1, p. 1–13. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1472-y>>.
- ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2010. v. 105, n. 2, p. 233–238.
- ROMO-MANCILLASA, A. et al. The design and inhibitory profile of new benzimidazole derivatives against triosephosphate isomerase from Trypanosoma cruzi: A problem of residue motility. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 2011. v. 30, p. 90–99.
- ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! **International Immunology**, 2018. v. 30, n. 3, p. 103–111.
- RUPAR, J. et al. A review of published data on acridine derivatives with different biological activities. **Kragujevac Journal of Science**, 2018. v. 40, n. 40, p. 83–101.
- SAINI, I.; JOSHI, J.; KAUR, S. Unwelcome prevalence of leishmaniasis with several other infectious diseases. **International Immunopharmacology**, 2022. v. 110, n. March, p. 109059. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109059>>.
- SALASSA, B. N.; ROMANO, P. S. Autophagy: A necessary process during the Trypanosoma cruzi life-cycle. **Virulence**, 2019. v. 10, n. 1, p. 460–469. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1543517>>.
- SALO-AHEN, O. M. H. et al. Molecular dynamics simulations in drug discovery and pharmaceutical development. **Processes**, 2021. v. 9, n. 1, p. 1–63.
- SALSBURY, F. R. Molecular dynamics simulations of protein dynamics and their relevance to drug discovery. **Current Opinion in Pharmacology**, 2010. v. 10, n. 6, p. 738–744. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2010.09.016>>.
- SANTELLI-ROUVIER, C. et al. Arylsulfonyl acridinyl derivatives acting on Plasmodium falciparum. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2004. v. 39, n. 9, p. 735–744.
- SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. Da R.; GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, 2021. v. 10, n. 7, p. e29510716543.
- SANTOS NASCIMENTO, I. J. Dos; AQUINO, T. M. DE; SILVA-JÚNIOR, E. F. DA. Cruzain and Rhodesain Inhibitors: Last Decade of Advances in Seeking for New Compounds Against American and African Trypanosomiasis. **Current Topics in Medicinal Chemistry**,

mar. 2021. v. 21.

SARMA, H.; MATTAPARTHI, V. S. K. Structure-Based Virtual Screening of High-Affinity ATP-Competitive Inhibitors Against Human Lemur Tyrosine Kinase-3 (LMTK3) Domain: A Novel Therapeutic Target for Breast Cancer. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, set. 2019. v. 11, n. 3, p. 527–541.

SCHRÖDER, J. et al. Identification of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Triazine Nitriles as Inhibitors of *Leishmania mexicana* Cysteine Protease CPB. **PLoS ONE**, 2013. v. 8, n. 10.

SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, jul. 2003. v. 31, n. 13, p. 3381–3385.

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

SHAKER, B. et al. In silico methods and tools for drug discovery. **Computers in Biology and Medicine**, 2021. v. 137, n. September, p. 104851. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104851>>.

SHI, J. H. et al. Characterization of interaction of calf thymus DNA with gefitinib: Spectroscopic methods and molecular docking. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2015. v. 147, p. 47–55.

SHI, J. H. et al. Exploring the binding interaction between herring sperm DNA and sunitinib: insights from spectroscopic and molecular docking approaches. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2019. v. 37, n. 4, p. 837–845. Disponível em: <<http://doi.org/10.1080/07391102.2018.1445033>>.

SHIKANAI YASUDA, M. A. Emerging and reemerging forms of *trypanosoma cruzi* transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2021. v. 116, n. 1.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, 2010. v. 33, n. 7, p. 1541–1548.

SILVA, C. F. M. et al. Evolution of Acridines and Xanthenes as a Core Structure for the Development of Antileishmanial Agents. **Pharmaceuticals**, 2022. v. 15, n. 2, p. 1–22.

SILVA, Daiana K. Frade et al. Antitumor effect of a novel spiro-acridine compound is associated with up-regulation of Th1-type responses and antiangiogenic action. **Molecules**, 2020. v. 25, n. 1, p. 1–9.

SILVA, J. M. Da. **Planejamento e desenvolvimento de novos derivados acridínico, quinolínico, indólicos e piridínicos com potencial atividade antitumoral**. [S.l.]: Universidade Estadual da Paraíba, 2018.

SILVA, J. R. A. et al. Assessment of the Cruzain Cysteine Protease Reversible and Irreversible Covalent Inhibition Mechanism. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2020. v. 60, n. 3, p. 1666–1677.

SILVA, J. S. et al. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 1998. v. 31, p. 111–115.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol. Clin. Biolog.**, 1953. v. 20, n. 3, p. 191–207.

- SILVA SANTOS, A. C. DA et al. Assessment of Leishmania cell lines expressing high levels of beta-galactosidase as alternative tools for the evaluation of anti-leishmanial drug activity. **Journal of Microbiological Methods**, 2019. v. 166.
- SILVA, T. F. Medicinal chemistry approaches to design of drug prototypes. **Revista Virtual de Quimica**, 2013. v. 5, n. 5, p. 921–933.
- SIMOENS, S.; HUYS, I. R&D Costs of New Medicines: A Landscape Analysis. **Frontiers in Medicine**, 2021. v. 8.
- SINGH, D. B. **Computer-Aided Drug Design**. [S.l.]: [s.n.], 2020.
- SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, Rakesh Kumar. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 2012. v. 5, n. 6, p. 485–497. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60084-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60084-4)>.
- SINGH, O. P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: A public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty**, 2016. v. 5, n. 1.
- SINGH, V.; KUMAR, Ajay. **Advances in Bioinformatics**. [S.l.]: [s.n.], 2021.
- SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2013. v. 124, p. 1–19. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134413000717>>.
- SNEHA, P.; PRIYA DOSS, C. G. **Molecular Dynamics: New Frontier in Personalized Medicine**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2016. V. 102.
- SNYDER, R. D.; HENDRY, L. B. Toward a greater appreciation of noncovalent chemical/DNA interactions: Application of biological and computational approaches. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 2005. v. 45, n. 2–3, p. 100–105.
- SONDHI, S. M. et al. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2010. v. 45, n. 2, p. 555–563.
- SOTO, J.; SOTO, P. Miltefosine: Oral treatment of leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, 2006. v. 4, n. 2, p. 177–185.
- SOUSA DUARTE, S. et al. Anticancer effect of a spiro-acridine compound involves immunomodulatory and anti-angiogenic actions. **Anticancer Research**, 2020. v. 40, n. 9, p. 5049–5057.
- SOUSA, V. M. et al. Cytotoxicity of a new spiro-acridine derivative: modulation of cellular antioxidant state and induction of cell cycle arrest and apoptosis in HCT-116 colorectal carcinoma. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 2024. v. 397, n. 3, p. 1901–1913.
- SOUZA, M. L. DE et al. Discovery of Potent, Reversible, and Competitive Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity: A Structure-Based Drug Design Approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2020. v. 60, n. 2, p. 1028–1041.
- SOUZA NETO, L. R. DE et al. In silico Strategies to Support Fragment-to-Lead Optimization in Drug Discovery. **Frontiers in Chemistry**, 2020. v. 8, n. February, p. 1–18.
- SOUZA, Wanderley DE; CARVALHO, T. M. U. DE; BARRIAS, E. S. Review on

- Trypanosoma cruzi: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, 2010. v. 2010.
- STREKOWSKI, L.; WILSON, B. Noncovalent interactions with DNA: An overview. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2007. v. 623, n. 1–2, p. 3–13.
- SURABHI, S.; SINGH, BK. Computer Aided Drug Design: an Overview. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, 2018. v. 8, n. 5, p. 504–509.
- SUVEYZDIS, Y. I. et al. Antiviral activity of acridinylaminoalcohols and acridinylaminoacid esters. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, 2000. v. 34, n. 10, p. 528–529.
- TABREZ, S. et al. Targeting sterol alpha-14 demethylase of Leishmania donovani to fight against leishmaniasis. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2021. v. 122, n. 9, p. 1037–1047.
- TÉLLEZ-VALENCIA, A. et al. Inactivation of triosephosphate isomerase from Trypanosoma cruzi by an agent that perturbs its dimer interface. **Journal of Molecular Biology**, 2004. v. 341, n. 5, p. 1355–1365.
- TESMER, L. A. et al. Th17 cells in human disease. **Immunological Reviews**, 2008. v. 223, n. 1, p. 87–113.
- TIWARI, N. et al. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 2017. v. 18, n. 1, p. 26–41.
- TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, 2020. v. 130, n. April 2018, p. 19–25.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in Immunology**, 2018. v. 9, n. October, p. 1–12.
- TONELLI, M. et al. Acridine derivatives as anti-BVDV agents. **Antiviral Research**, 2011. v. 91, n. 2, p. 133–141.
- TSCHOEKE, D. A. et al. The comparative genomics and phylogenomics of Leishmania amazonensis parasite. **Evolutionary Bioinformatics**, 2014. v. 10, p. 131–153.
- TURCANO, L. et al. Identification and binding mode of a novel Leishmania Trypanothione reductase inhibitor from high throughput screening. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2018. v. 12, n. 11.
- ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: Present challenges. **Parasitology**, 2018. v. 145, n. 4, p. 464–480.
- UPADHYAY, A. et al. Synthesis and evaluation of novel triazolyl quinoline derivatives as potential antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2018. v. 154, p. 172–181. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.014>>.
- VANNIER-SANTOS, M.; MARTINY, A.; SOUZA, W. Cell Biology of Leishmania spp.: Invading and Evading. **Current Pharmaceutical Design**, 2005. v. 8, n. 4, p. 297–318.
- VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2002. v. 45, n. 12, p. 2615–2623.
- VEMULA, D. et al. CADD, AI and ML in Drug Discovery: A Comprehensive Review.

European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2022. v. 181, n. October 2022, p. 106324. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106324>>.

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

VENUGOPAL, S. et al. DNA intercalators as anticancer agents. **Chemical Biology and Drug Design**, 2022. v. 100, n. 4, p. 580–598.

VITAKU, E.; SMITH, D. T.; NJARDARSON, J. T. Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2014. v. 57, n. 24, p. 10257–10274.

WAINWRIGHT, M. Acridine - A neglected antibacterial chromophore. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2001. v. 47, n. 1, p. 1–13.

WANG, E. et al. End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. **Chemical Reviews**, 2019. v. 119, n. 16, p. 9478–9508.

WANG, F. et al. ACID: a free tool for drug repurposing using consensus inverse docking strategy. **Journal of Cheminformatics**, dez. 2019. v. 11, n. 1, p. 73.

WANG, Yuchen et al. In Silico Prediction of Human Intravenous Pharmacokinetic Parameters with Improved Accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2019. v. 59, n. 9, p. 3968–3980.

WEI, W. et al. Fsp3: A new parameter for drug-likeness. **Drug Discovery Today**, 2020. v. 25, n. 10, p. 1839–1845.

WERBOVETZ, K. A. et al. Cytotoxicity of acridine compounds for Leishmania promastigotes in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1992. v. 36, n. 2, p. 495–497.

WINSHIP, K. A. Toxicity of antimony and its compounds. **Adverse Drug Reactions and Acute Poisoning Review**, 1987. v. 6, n. 2, p. 67–90.

WOLFE, A.; SHIMER, G. H.; MEEHAN, T. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Physically Intercalate into Duplex Regions of Denatured DNA. **Biochemistry**, 1987. v. 26, n. 20, p. 6392–6396.

YU, X. M. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Acridine Derivatives as Antimalarial Agents. **ChemMedChem**, 2012. v. 7, n. 4, p. 587–605.

YUSUF, D. et al. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2008. v. 48, n. 7, p. 1411–1422.

ZAKHAROVA, O. et al. Evaluation of antioxidant activity and cytotoxicity of polyfluorinated diarylacetylenes and indoles toward human cancer cells. **Journal of Fluorine Chemistry**, 2019. v. 226, n. May, p. 109353. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2019.109353>>.

ZAMBRANO-VILLA, S. et al. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends in Parasitology**, 2002. v. 18, n. 6, p. 272–278.

ZHAI, J. et al. A Promising New Approach for In Silico Prediction of Drug Concentration

Profiles for Drug Candidates Lack of Experimental Pharmacokinetic Data. 2020. p. 1–10.

ZHANG, Xiaoyan et al. The interaction of taurine-salicylaldehyde Schiff base copper(II) complex with DNA and the determination of DNA using the complex as a fluorescence probe. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2010. v. 77, n. 1, p. 1–5.

ZHOU, J. et al. Excited-State Dynamics of Proflavine after Intercalation into DNA Duplex. **Molecules**, 2022. v. 27, n. 23.

ZHOU, S.-F. Drugs Behave as Substrates, Inhibitors and Inducers of Human Cytochrome P450 3A4. **Current Drug Metabolism**, 2008. v. 9, n. 4, p. 310–322.

ZHU, J. et al. Spectroscopic and molecular modeling methods to investigate the interaction between 5-Hydroxymethyl-2-furfural and calf thymus DNA using ethidium bromide as a probe. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2014. v. 124, p. 78–83.

ZOETE, V. et al. SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. **Journal of Computational Chemistry**, ago. 2011. v. 32, n. 11, p. 2359–2368.

ZSILA, F.; SAMSONOV, S. A. Molecular interactions of the anticancer agent ellipticine with glycosaminoglycans by in silico analysis. **Carbohydrate Research**, 2018. v. 462, n. April, p. 28–33. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.03.014>>.

ANEXOS

Anexo 1 – Artigo publicado referente aos resultados da tese.



pharmaceuticals



Article

ACW-02 an Acridine Triazolidine Derivative Presents Antileishmanial Activity Mediated by DNA Interaction and Immunomodulation

Sonaly Lima Albino ^{1,2,3}, Willian Charles da Silva Moura ^{2,3}, Malu Maria Lucas dos Reis ², Gleyton Leonel Silva Sousa ^{2,4}, Pablo Rayff da Silva ⁵, Mayara Gabriele Carvalho de Oliveira ⁶, Tatiana Karla dos Santos Borges ⁷, Lucas Fraga Friaça Albuquerque ⁷, Sinara Mônica Vitalino de Almeida ⁸, Maria do Carmo Alves de Lima ⁹, Selma Aparecida Souza Kuckelhaus ⁶, Igor José dos Santos Nascimento ^{2,3}, Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior ¹⁰, Teresinha Gonçalves da Silva ¹ and Ricardo Olimpio de Moura ^{2,3,*}

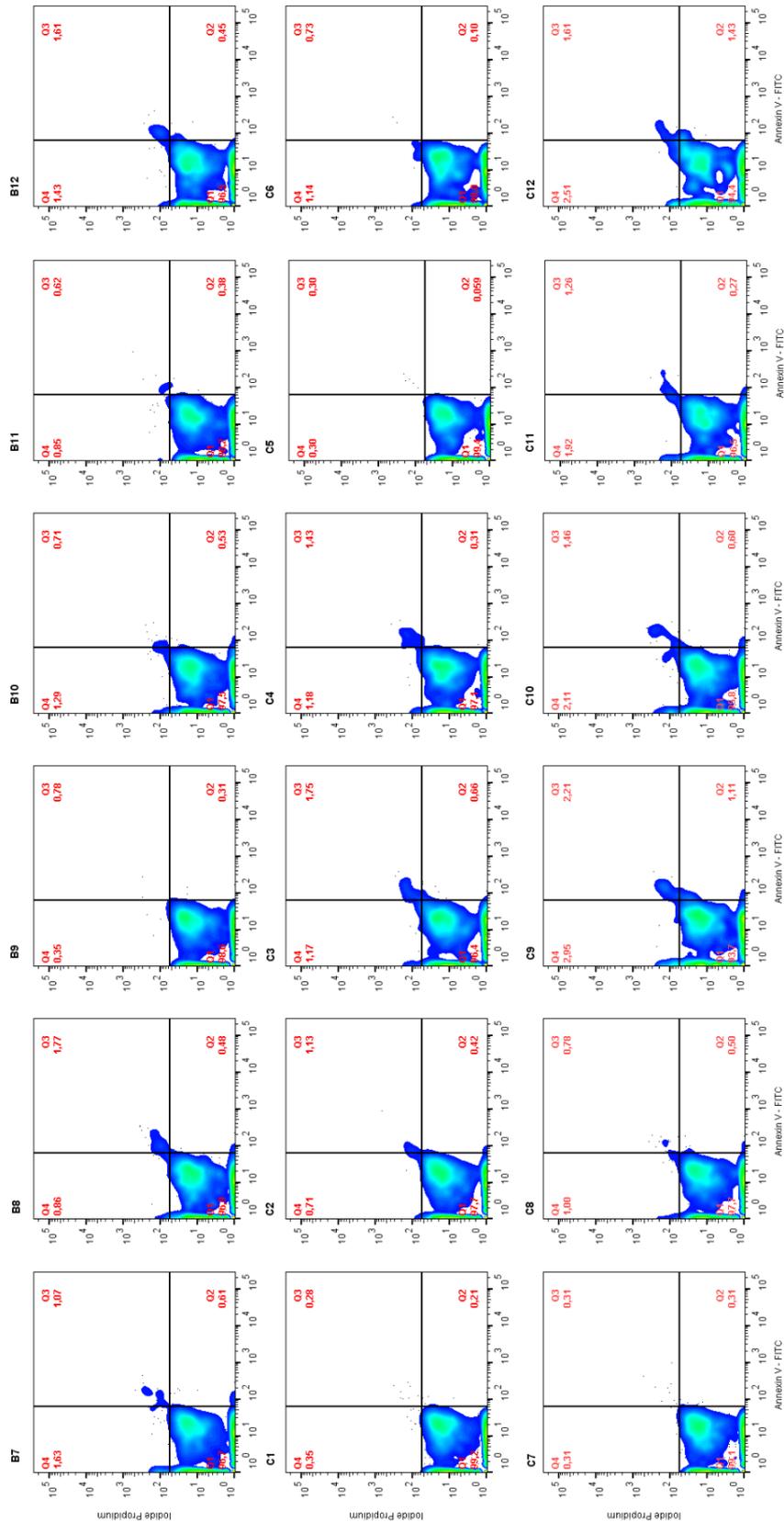
- ¹ Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil
 - ² Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, Brazil
 - ³ Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, Brazil
 - ⁴ Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23890-000, Brazil
 - ⁵ Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais, Sintéticos e Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil
 - ⁶ Área de Morfologia, Faculdade de Medicina—UnB, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro/Asa Norte, Brasília 70910-900, Brazil
 - ⁷ Laboratório de Imunologia Celular, Área de Patologia, Faculdade de Medicina, Campus Darcy Ribeiro, Brasília 70910-900, Brazil
 - ⁸ Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Universidade de Pernambuco, Garanhuns 55290-000, Brazil
 - ⁹ Laboratório de Química e Inovação Terapêutica, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil
 - ¹⁰ Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa 58071-160, Brazil
- * Correspondence: ricardo.olimpiodemoura@gmail.com or ricardo.olimpiodemoura@servidor.uepb.edu.br



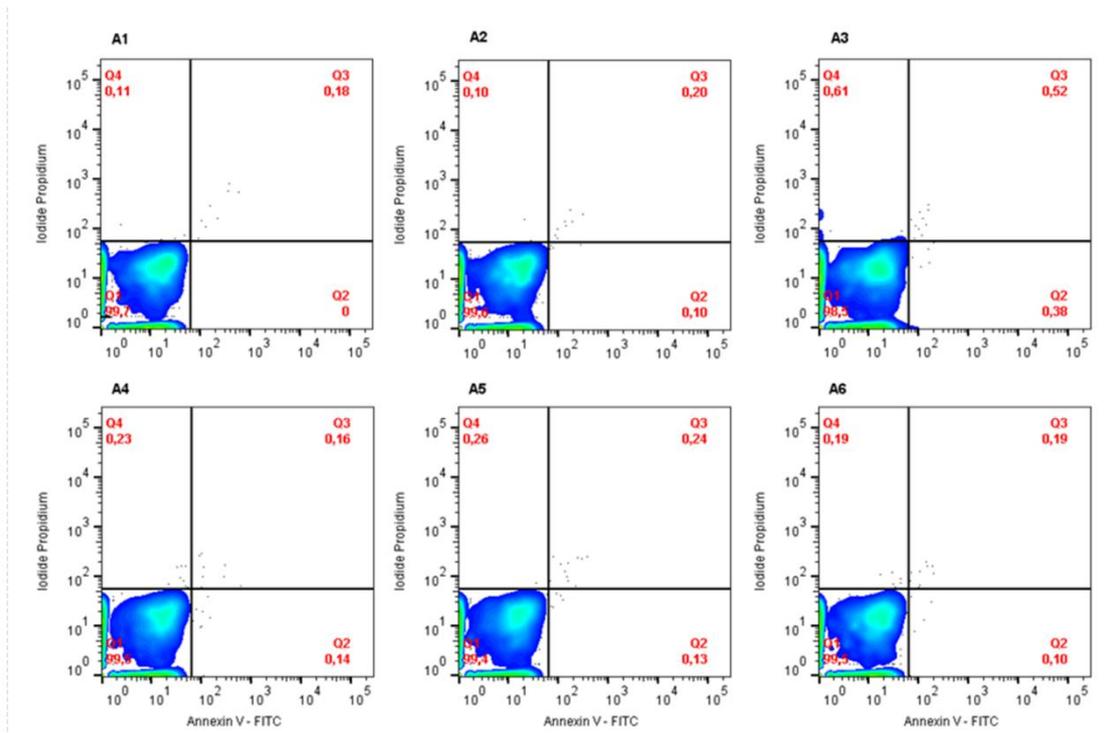
Citation: Albino, S.L.; da Silva Moura, W.C.; Reis, M.M.L.d.; Sousa, G.I.S.; da Silva, P.R.; de Oliveira, M.G.C.; Borges, T.K.d.S.; Albuquerque, L.F.E.; de Almeida, S.M.V.; de Lima, M.d.C.A.; et al. ACW-02 an Acridine Triazolidine Derivative Presents Antileishmanial Activity

O artigo aborda os resultados obtidos na tese relacionados a síntese e avaliação da atividade antileishmaniana do composto ACW-02. Publicado na revista *Pharmaceuticals* (F.I. 2023 = 5,215), no volume 16, número 2, na edição especial *Drug Discovery of Antiprotozoal Agents*, ano 2023. DOI: 10.3390/ph16020204.

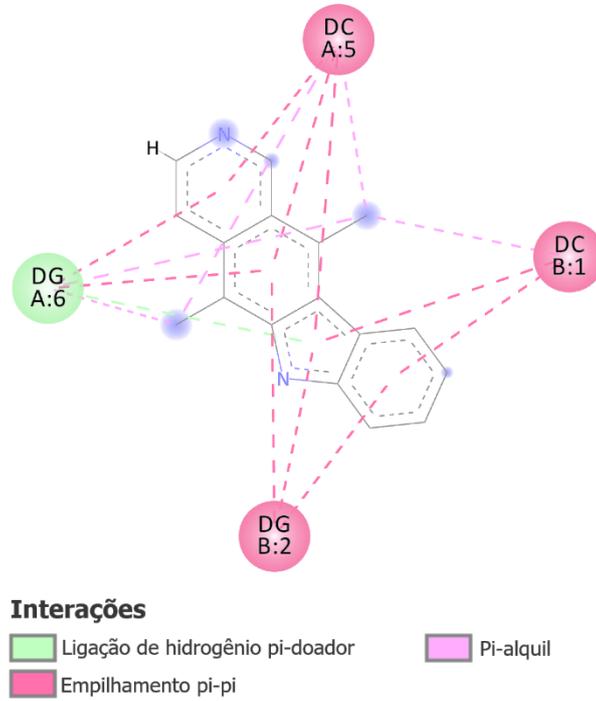
Anexo 2 – Efeito do composto ACW-02 em macrófagos por Anexina V-FITC/PI. B7-B12 – 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. C1-C6 – 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$. C7-C12 – 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



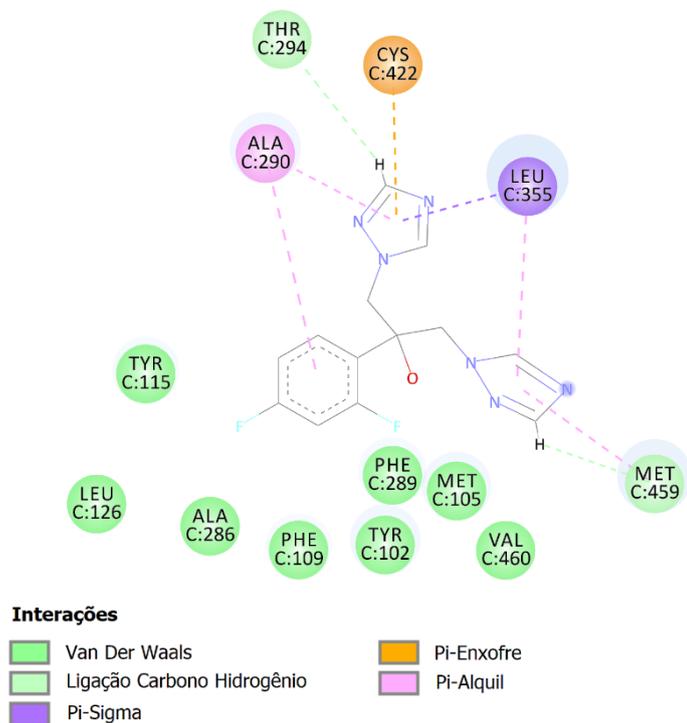
Anexo 3 – Grupo controle na avaliação com Anexina V-FITC/PI



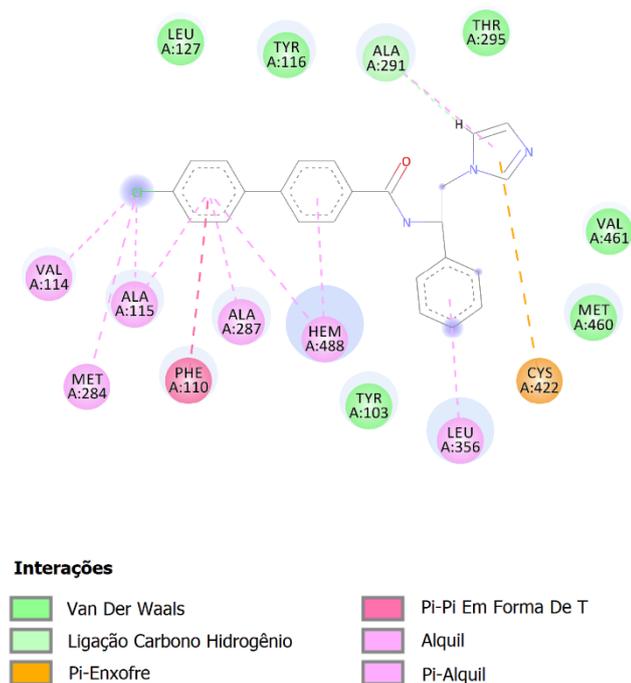
Anexo 4 – Interação da elipticina no alvo de DNA (PDB ID: 1Z3F)



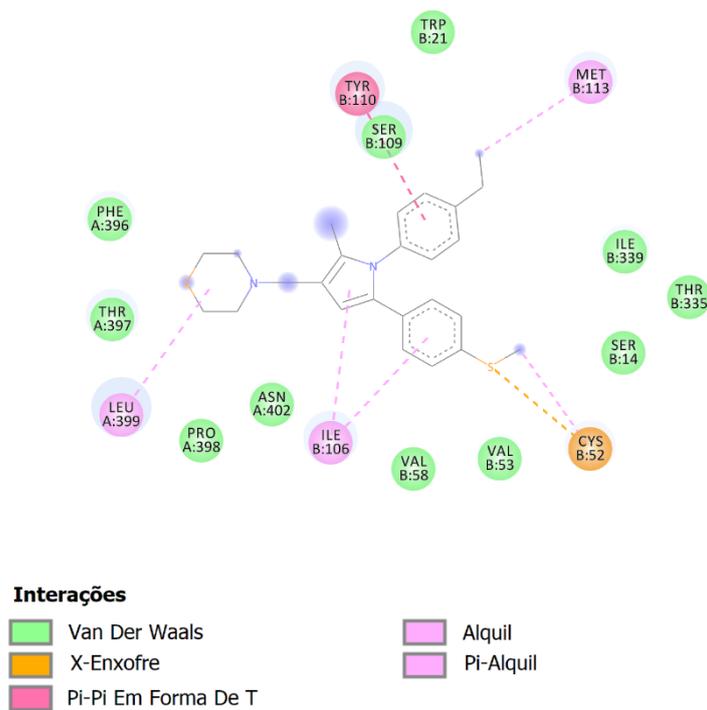
Anexo 5 – Interação do fluconazol no alvo de CYP51 (PDB ID: 3L4D)



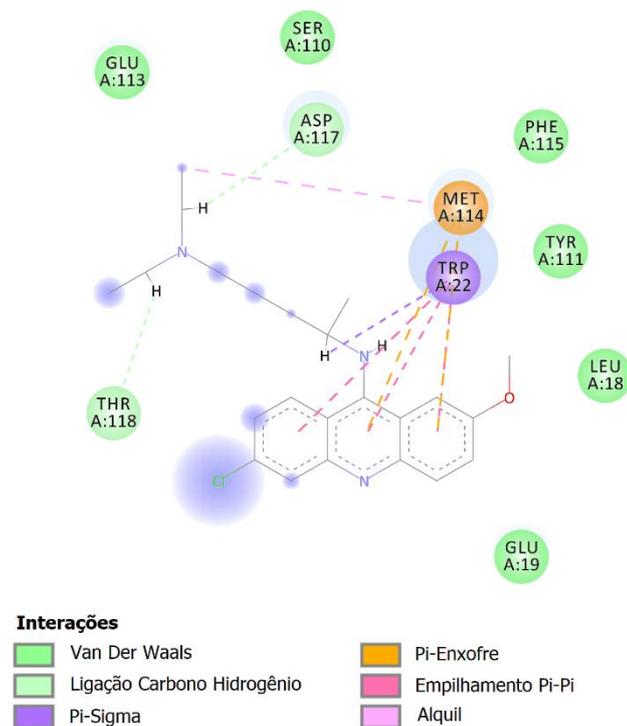
Anexo 6 – Interação do ((4-(4-clorofenil)-N-[2-(1H-imidazol-1-il)-1-feniletil]benzamida) no alvo de CYP51 (PDB ID: 3KSW)



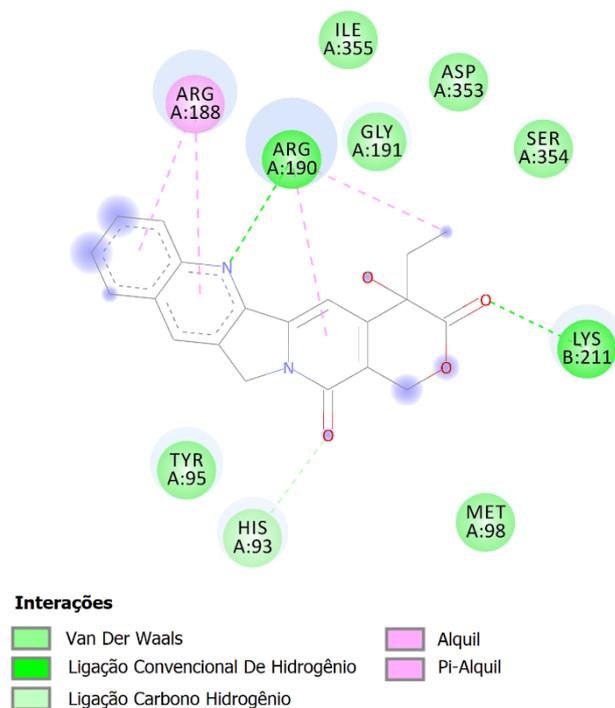
Anexo 7 – Interação do 4-[[1-(4-etilfenil)-2-metil-5-(4-metilsulfanilfenil)pirrol-3-il]metil]tiomorfolina no alvo de TryR (PDB ID: 4APN)



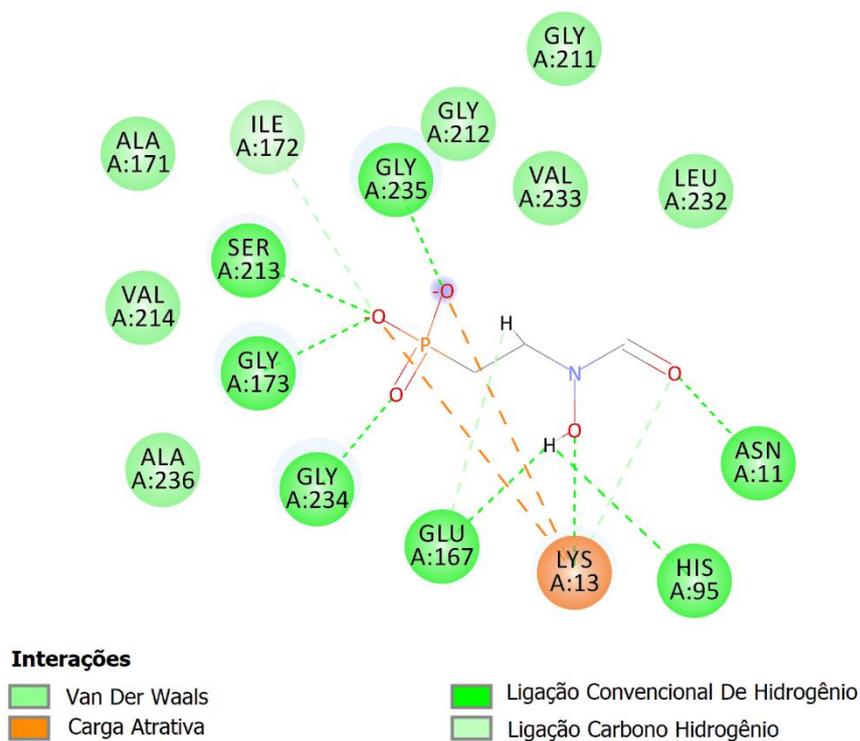
Anexo 8 – Interação da quinacrina mostarda no alvo de TryR (PDB ID: 1GXF)



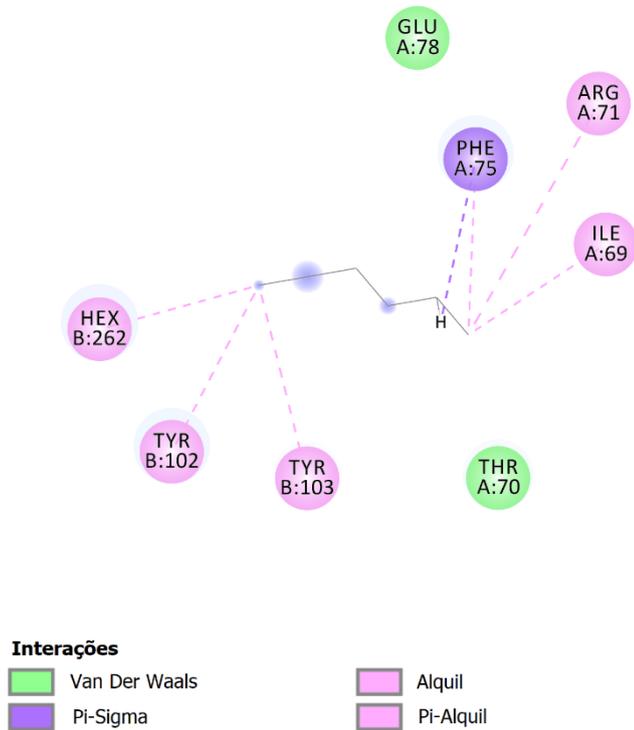
Anexo 9 – Interação da camptotecina no alvo de topoisomerase 1 (PDB ID: 2B9S)



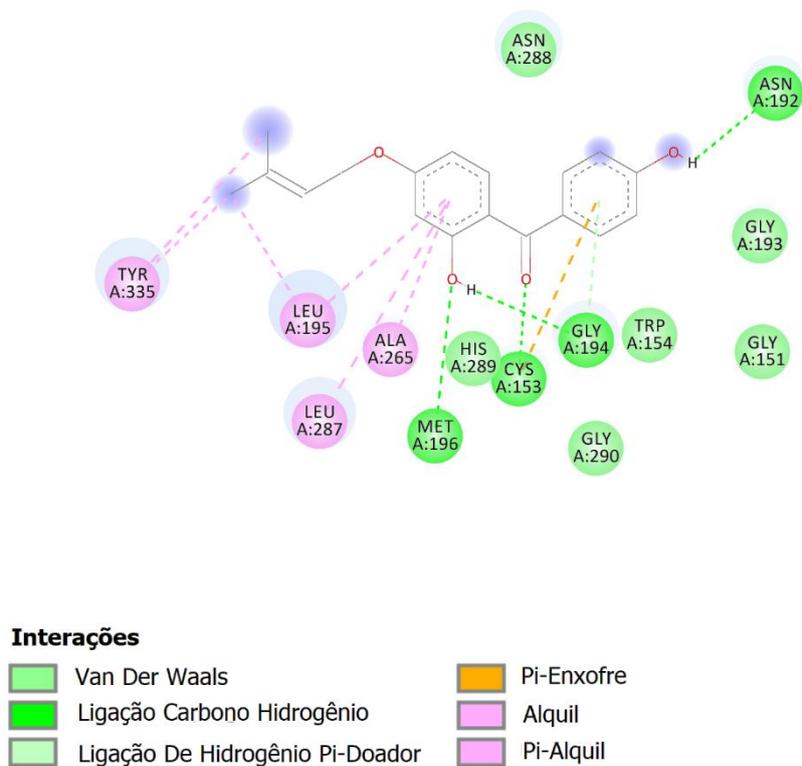
Anexo 10 – Interação do ácido [2(formil-hidroxi-amino)-etil]-fosfônico no alvo de TFI (PDB ID: 1IF2)



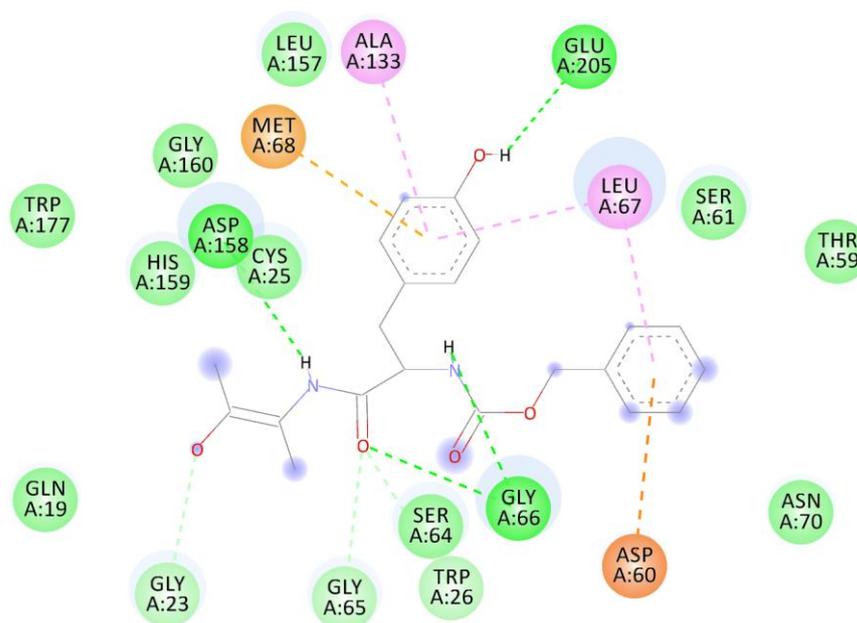
Anexo 11 – Interação do hexano no alvo de TFI (PDB ID: 1CI1)



Anexo 12 – Interação do 1C no alvo de CPBLA



Anexo 13 – Interação do benzoil-tirosina-alanina-fluorometilcetona no alvo cruzaína (PDB ID: 1AIM)



Interações

- | | |
|---|--|
| ■ Van Der Waals | ■ Pi-Anion |
| ■ Ligação Convencional De Hidrogênio | ■ Pi-Enxofre |
| ■ Ligação Carbono Hidrogênio | ■ Pi-Alquil |