

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**Paula Pereira Marques Toledo**

**Avaliação *in vitro* de derivados triazólicos quanto atividade leishmanicida em  
*Leishmania (L) amazonensis* e *Leishmania (L) infantum chagasi***

Alfenas/MG

2022

**PAULA PEREIRA MARQUES TOLEDO**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE DERIVADOS TRIAZÓLICOS QUANTO ATIVIDADE  
LEISHMANICIDA EM *Leishmania (L) amazonensis* e *Leishmania (L) infantum*  
*chagasi***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em 25 de Abril de 2022 pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Parasita-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques

Coorientador: Prof. Dr. Fabio Antonio Colombo

**Alfenas/MG**

**2022**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Toledo, Paula Pereira Marques .

Avaliação in vitro de derivados triazólicos quanto atividade leishmanicida em *Leishmania (L) amazonensis* e *Leishmania (L) infantum chagasi* / Paula Pereira Marques Toledo. - Alfenas, MG, 2022.

98 f. : il. -

Orientador(a): Marcos José Marques.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Leishmaniose. 2. In vitro. 3. In silico . 4. Triazóis. I. Marques, Marcos José , orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e à mãe Nossa Senhora, em seus vários nomes por estarem comigo me iluminando e me protegendo, como sempre fazem. Além de me darem forças para continuar quando os dias se tornavam escuros.

Agradeço ao Divino Espírito Santo, por me dar sabedoria e ciência para escrever esta dissertação.

Agradeço também à minha família, meu pai Paulo, minha mãe Silvia e meu irmão Vinícius, que me escutaram e me acalmaram quando precisava, apoios que todos precisamos.

Agradeço ao meu orientador, Marcos José Marques, por me dar a oportunidade de ingressar na pós-graduação. Agradeço ao meu coorientador, Fabio Antonio Colombo pela ajuda com os materiais e por ceder o espaço para a realização de muitos experimentos.

Agradeço à Patrícia Espuri e Juliana Nunes, por me ensinarem os experimentos aqui realizados, e por me ajudarem mesmo à distância a resolver os problemas diários que apareciam. Agradeço aos graduandos que passaram pelo laboratório durante estes dois anos, alunos de TCC ou IC que auxiliam na conclusão de vários experimentos.

Agradeço ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas – Unifal-MG, pela oportunidade em executar tal projeto e por todo aprendizado diante as disciplinas oferecidas, a Universidade Federal de Alfenas.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"

Ninguém caminha sozinho, sempre temos uma equipe atrás de nós e do nosso sucesso, então a todos que estiveram comigo e me auxiliarem nesta caminhada, meu muito obrigada.

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”  
**(Walter S. Landor, [18--])**

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.  
**(Marthin Luther King, [196-?])**

## RESUMO

As Leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas sendo causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania sp.* e transmitida através do repasto sanguíneo do inseto vetor do gênero *Lutzomyia*. A terapêutica contra leishmaniose é limitada. Assim, a descoberta de novos fármacos poderia ser uma boa estratégia. Os triazóis são fármacos seguros e bem tolerados, com baixa toxicidade e apresentam um amplo espectro de ação. Por tanto, o presente estudo tem como objetivo testar e avaliar *in vitro* compostos derivados de triazóis em relação a atividade leishmanicida, nas formas amastigota e promastigota em *Leishmania (L) amazonensis* e *L. (L) infantum chagasi*. E foram testadas a toxicidade dos compostos diante de células de mamíferos. Ambos experimentos comparando os valores com o fármaco padrão Anfotericina B (ANB). Os compostos, também foram avaliados quanto à farmacocinética e à 'regra dos cinco' de Lipinski, além da realização do docking molecular. Os compostos mais bem avaliados foram FS33 e FS41 apresentando concentração efetiva 50 de 2,71 e 4,71 µg/mL respectivamente para *L. amazonensis* e FS71 e FS54 com 1,24 e 0,8 µg/mL respectivamente para *L. chagasi*, também apresentaram as maiores concentrações citotóxicas 50 em comparação com ANB ( $p < 0,05$ ). A avaliação anti-amastigota contra *L. amazonensis* apontou o FS35 e FS28 como os mais ativos 1,1 e 0,9 µg/mL, com valores de Índice de seletividade de 18,4 e 128,9 respectivamente e em *L. chagasi* o composto mais ativo foi FS44 com 3,1 µg/mL com 20,1 de IS. O ensaio de peróxido de Hidrogênio demonstrou que os compostos analisados diminuem sua liberação (FS17, FS44, FS54). O docking molecular demonstrou que três compostos podem inibir Glicose-6-fosfato desidrogenase. As previsões ADME, demonstraram que os compostos podem apresentar interações adequadas com o organismo humano, pois inibem menos proteínas do citocromo P450, e em geral apresentam alta absorção gastrointestinal e a avaliação quanto à 'regra dos cinco' de Lipinski também mostrou que estes compostos podem ser administrados por via oral em futuros ensaios *in vivo*. Assim, de modo geral os derivados analisados podem ser promissores no tratamento de Leishmaniose.

**Palavras-chave:** Leishmaniose; *in vitro*; *in silico*; Triazóis

## ABSTRACT

Leishmaniasis is considered a neglected disease caused by the genet protozoan *Leishmania sp.* transmitted by a bite of a genet insect sandflies gender *Lutzomyia*. The therapy against leishmaniasis are imitated, with a few drugs been used. In this way, the new drug discovery could be a good strategy. Triazole are safe drugs and also good tolerated presenting low toxicity showing a broad spectrum of action. Thus, the present study had the objective test and evaluate *in vitro* nineteen compounds triazole derivates for the leishmanicidal activity with the forms amastigote and promastigote of *Leishmania (L) amazonensis* and *L. (L) infantum chagasi*. And the toxicity of the compounds against mammalian cells were tested. Comparing all experiments with Amphotericin (AMB) values. They also were evaluated as the pharmacokinetics and the Lipinski's 'rule of five'. The best compounds that showed activity against the promastigote forms were FS33 and FS41 showing effective concentration 50 with 2,71 and 4,71 µg/mL respectively for *L. amazonensis* and FS71 and FS54 with 1,24 and 0,8 µg/mL of EC<sub>50</sub> respectively for *L. chagasi* comparing with the control drug ANB (p<0,05). They also have better cytotoxicity concentration 50 comparing with ANB (p<0,05). The anti-amastigote assay against *L. amazonensis* showed FS35 and FS28 as the most active with 1,1 and 0,9 µg/mL with selective index 18,4 and 128,9 respectively, and in *L. chagasi* infection the compound most active was FS44 with 3,1 µg/mL with 20,1 of SI. The assay of Hydrogen peroxide showed that the compound analyzed decrease the liberation (FS17, FS44, FS54). The molecular docking indicated that three compounds may inhibit Glicose-6-fosphate desidrogenase. The ADME forecast, showed that the compound may has goods interactions with the human organism because they inhibit less cytochrome P450 proteins in general has high gastrointestinal absorption and Lipinski's 'rule of five' evaluation also showed that these compounds can be orally administered in future *in vivo* assays. Than that derivate used may be promising in Leishmaniasis treatment.

**Keywords:** Leishmaniasis; *in vitro*; *in silico* Triazole

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Formas evolutivas da <i>Leishmania</i> .....	13
Figura 2 -	Ciclo biológico das Leishmanioses .....	15
Figura 3 -	Anel triazólico .....	19
Figura 4 -	Histórico triazóis .....	20
Figura 5 -	Desenho experimental .....	35



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Ação Antipromastigota de Compostos Triazólicos em <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum chagasi</i> nos períodos de incubação de 24, 48 e 72h. ....	40
Tabela 2 -	Tabela com os compostos ativos contra as formas promastigotas de <i>L. (L) amazonensis</i> e <i>L. (L) infantum chagasi</i> e seus IS .....	42
Tabela 3 –	Concentração Citotóxica dos Compostos Triazolicos em células Murinas .....	43
Tabela 4 –	CE <sub>50</sub> em amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum chagasi</i> e Indice de seletividade .....	44
Tabela 5 –	Previsões ADME dos Compostos Triazolicos .....	47
Tabela 6 –	Avaliação dos Compostos Quanto à ‘Regra dos Cinco’ de Lipinski .....	47
Tabela 7 -	Determinação dos aminoácidos resíduos de cadeia comparando 3D Ligant e CASTp .....	49
Tabela 8 -	Resultado do docking cego com os compostos ativos contra as promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum chagasi</i> .....	50
Tabela 9 -	Resultado do docking em SWISSDOCK com os compostos ativos contra as promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum chagasi</i> .....	52

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Gráfico de colunas de liberação de Peroxido de Hidrogênio em <i>L. amazonensis</i> .....	48
Gráfico 2 -	Gráfico de colunas de liberação de Peroxido de Hidrogênio em <i>L. infantum chagasi</i> .....	48

## LISTA DE ABREVIações

$\Delta\Psi_m$ -	Potencial de membrana mitocondrial
ANB -	Anfotericina B
CC50 -	Citotoxicidade 50
CP -	Cisteíno protease
CE50 –	Concentração Efetiva 50
EROs -	Espécies reativas de oxigênio
GLU –	Glucantime©
H -	Hidrogênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -	Peróxido de hidrogênio
IS –	Índice de Seletividade
KP –	Permeabilidade na pele
L -	<i>Leishmania</i>
L(L) -	<i>Leishmania (Leishmania)</i>
LC -	Leishmaniose cutânea
LD -	Leishmaniose difusa
LM -	Leishmaniose mucocutânea
LOG P-	Coeficiente de partição
LPS -	Lipopolissacarídeo
LV -	Leishmaniose visceral
NO -	Óxido nítrico
P-gp –	Permeabilidade glicoproteica
SFB -	Soro fetal bovino

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
2.1	GERAL .....	9
2.2	ESPECÍFICOS .....	9
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>10</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>11</b>
4.1	GÊNERO <i>LEISHMANIA</i> .....	11
<b>4.1.1</b>	<b>CICLO DE VIDA E MULTIPLICAÇÃO .....</b>	<b>13</b>
4.2	TRATAMENTO.....	15
4.3	TRIAZOIS.....	19
<b>4.3.1</b>	<b>Mecanismo De Ação.....</b>	<b>21</b>
4.3.1.1	Inibição Síntese De Ergosterol .....	21
4.3.1.2	Inibição De Cisteíno Protease .....	23
4.3.1.3	Alteração Do Potencial De Membrana Mitocondrial.....	24
4.4	TOXICIDADE E EFEITOS COLATERAIS.....	26
4.5	AÇÃO DOS TRIAZOIS EM OUTRAS DOENÇAS.....	27
4.6	MÉTODOS <i>IN SILICO</i> .....	29
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
5.1	COMPOSTOS .....	33
5.2	UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS.....	34
5.3	CULTURA E OBTENÇÃO DOS PARASITAS.....	35
5.4	CURVA DE PROLIFERAÇÃO .....	35
5.5	ATIVIDADE LEISHMANICIDA CONTRA PROMASTIGOTAS .....	35
5.6	ATIVIDADE LEISHMANICIDA CONTRA AMASTIGOTAS.....	36
5.7	AValiação DA CITOTOXICIDADE .....	36
5.8	ÍNDICE DE SELETIVIDADE .....	37
5.9	LIBERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	37
5.10	MÉTODOS <i>IN SILICO</i> .....	38
<b>5.10.1</b>	<b>Previsões ADMET.....</b>	<b>38</b>
<b>5.10.2</b>	<b>Homologia E Docking Molecular .....</b>	<b>38</b>
<b>5.10.3</b>	<b>Regra Dos 5 De Lipinski .....</b>	<b>38</b>
5.11	ANALISE ESTATÍSTICA .....	39
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>

6.1	ATIVIDADE DOS COMPOSTOS CONTRA AS FORMAS PROMASTIGOTAS.....	40
6.2	CITOTOXICIDADE.....	42
6.3	ATIVIDADE ANTIAMASTIGOTA E INDICE DE SELETIVIDADE.....	43
6.4	PREVISÕES ADME .....	45
6.5	LIPINSKI .....	45
6.6	LIBERAÇÃO DE PEROXIDO DE HIDROGÊNIO.....	46
6.2	DOCKING MOLECULAR .....	48
7	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
8	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>61</b>
9	<b>ETAPAS FUTURAS.....</b>	<b>62</b>
10	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
	<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são doenças consideradas negligenciadas (ARAÚJO *et al.*, 2019), que segundo a Fiocruz (2010), uma doença negligenciada é aquela que é causada por agentes infecciosos ou parasitários, considerada endêmica em populações de baixa renda.

É também um problema de saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019) endêmica em 98 países (BADIRZADEH *et al.*, 2020) abrangendo quatro continentes, Américas, África (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019), Ásia e sul da Europa (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015), com um registro anual, de aproximadamente 1 milhão de novos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Além disso, possui a maior taxa de mortalidade depois da malária, em relação a doenças causadas por protozoários (ALVAR *et al.*, 2008).

Nas Américas, os casos se estendem desde o centro-sul do estado do Texas, nos Estados Unidos, chegando até o norte da Argentina (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; MONTENEGRO, 1926; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). No Brasil, há registro de novos casos em todas as regiões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019), com surtos epidêmicos concentrados nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Norte (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). No ano de 2017 o país registrou 17.526 novos casos (OPAS, 2019).

As Leishmanioses são causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania sp.* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019) da família Trypanosomatidae (PODEŠVOVÁ *et al.*, 2020) e é transmitida através do repasso sanguíneo do vetor do gênero *Phlebotomus*, no velho mundo e *Lutzomyia* no novo mundo (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

Esta parasitose apresenta quatro principais formas clínicas (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015), sendo elas, a Leishmaniose cutânea (LC), Leishmaniose difusa (LD), Leishmaniose Mucocutânea (LM) e Leishmaniose visceral (LV) (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015), além da manifestação cutânea, pós-Kalazar (DIRO *et al.*, 2014). Não há vacina contra a leishmaniose humana (GHORBANI; FARHOUDI, 2018), porém até a presente data

muitas estratégias de vacina antileishmania estão sendo propostas (PODEŠVOVÁ *et al.*, 2020).

Os fármacos para o tratamento de Leishmaniose são muito tóxicos, possuindo muitos efeitos colaterais (DA CÂMARA ROCHA *et al.*, 2019), tendo também restrição de quantidade de medicamentos existentes (ARAÚJO *et al.*, 2019). No Brasil o fármaco de primeira escolha é um antimonial pentavalente, conhecido como Glucantime® (ARAÚJO *et al.*, 2019), além deste, como segunda escolha, Anfotericina B (ANB) (KEIGHOBADI *et al.*, 2019), Anfotericina B lipossomal (BERMAN, 2019), Pentamidina, Paramomicina (ORTEGA; GIORGIO; DE PAULA, 2017) para as manifestações em humanos e Miltefosina para o tratamento de leishmaniose canina (DOS SANTOS NOGUEIRA *et al.*, 2019).

Esta escassez de medicamentos aumenta a chance de resistência aos medicamentos em países subdesenvolvidos (EL-SAGHIER *et al.*, 2019; FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012; MAJI *et al.*, 2018; RODRIGUEZ *et al.*, 2018), aos mesmos, uma vez que estes são utilizados há mais de 60 anos (MAJI *et al.*, 2018), se mostrando necessário a busca de novos fármacos para o tratamento de leishmaniose.

Os triazóis, são fármacos, considerados seguros e bem tolerados, apresentando baixa toxicidade (MOREIRA, 2010), constituindo no maior e mais importante grupo de compostos já desenvolvidos para o controle de doenças fúngicas de plantas e animais (BALARDIN, 2015), que já há testes de eficácia contra doenças parasitárias, como doença de Chagas (DE SOUZA *et al.*, 2020), e leishmaniose (DE ARRUDA *et al.*, 2020; MEINEL *et al.*, 2020).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar *in vitro* e *in silico* compostos derivados de triazóis quanto à atividade leishmanicida nas formas amastigotas e promastigota das espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em comparação com o fármaco padrão Anfotericina B.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- a) Determinar a curva de proliferação da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*;
- b) Testar a atividade dos compostos triazólicos contra as formas amastigotas e promastigota das espécies do estudo e determinar as concentrações efetivas 50;
- c) Avaliar a toxicidade dos derivados de triazóis contra macrófagos murinos;
- d) Avaliar a liberação de Peróxido de Hidrogênio pelas formas amastigota e promastigota de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum chagasi*;
- e) Realizar as previsões farmacológicas (ADME) dos derivados de triazóis;
- f) Verificar se os derivados de triazóis respeitam a ‘regra dos cinco’ de Lipinski;
- g) Realizar o docking molecular dos derivados de triazóis em relação as enzimas selecionadas das espécies.



### 3 JUSTIFICATIVA

As Leishmanioses são doenças que apresentam grande incidência no mundo principalmente em países subdesenvolvidos, que além de infectar seres humanos, infecta também outros mamíferos como cães (RIBEIRO *et al.*, 2018), gatos (HEADLEY *et al.*, 2019) e pequenos roedores silvestres, que atuam principalmente como reservatórios (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). Segundo a Organização Pan-Americana de saúde há cerca de 1.067.759 milhões de novos casos da Leishmaniose cutânea e mucosa nas Américas, sendo no Brasil, mais de 90% dos casos de Leishmaniose estão localizados nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, além de 1.933 casos de Leishmaniose visceral humana no Brasil, no mesmo ano, com cerca de 90% dos casos na região Nordeste do país (OPAS, 2021).

Ao observar a literatura foi possível observar que existem poucos fármacos para o tratamento de leishmaniose em humanos, os antimoniais pentavalentes (YESILOVA *et al.*, 2016), ANB (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003), Anfotericina B Lipossomal (BERMAN, 2019), Pentamidina e Paramomicina (ORTEGA; GIORGIO; DE PAULA, 2017). Porém estes medicamentos não são ideais para o tratamento devido à alta toxicidade e suas reações adversas consideradas graves aos pacientes (ORTEGA; GIORGIO; DE PAULA, 2017), além do tratamento ser de longa duração e alguns não são administrados por via oral (ORTEGA; GIORGIO; DE PAULA, 2017). Alguns autores também tem relatado o aparecimento de possíveis casos de resistências aos fármacos (BRAY *et al.*, 2003) devido à pesquisas que avaliam a taxa de eficácia dos medicamentos com o passar dos anos. Diante disto, uma pesquisa para a obtenção de uma nova terapêutica contra leishmaniose devido à pouca opção no mercado e seus efeitos tóxicos.

Alguns autores DE SOUZA *et al.*, (2020); SALAS *et al.*, (2017); TEIXEIRA *et al.*, (2018) relatam em seus estudos que os triazóis são compostos que possuem boa atividade antiparasitária. Isto posto, o presente estudo visa avaliar alguns derivados triazólicos para estudos *in vitro* e *in silico* em contato com duas espécies de *Leishmania*, *Leishmania (L) amazonensis* e *Leishmania (L) infantum chagasi*.

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

Através de revisão na literatura, foram descritos a seguir, aspectos importantes sobre a leishmaniose, com um enfoque na forma tegumentar e na forma visceral causadas pelas espécies *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi* respectivamente, passando por sintomatologia e tratamento. Outro ponto também revisado, os triazóis, terá descrição da estrutura química e passará por tratamentos com a utilização destes compostos. Além disso, também serão descritos assuntos sobre ensaios *in vitro* e estudos *in silico*.

### 4.1 GÊNERO *LEISHMANIA*

Para dar início a revisão de literatura, será discutido vários aspectos do gênero *Leishmania spp*, como sua biologia, seus complexos e suas manifestações clínicas, além dos tratamentos já em utilização contra a doença.

A leishmaniose é uma doença considerada negligenciada (BADIRZADEH *et al.*, 2020), de caráter zoonótico e antroponótico (MARTINS; LIMA, 2013; VON STEBUT, 2015) que constitui um problema de saúde pública em diversos países (PEREIRA *et al.*, 2010), incluindo o Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Não sendo encontrados casos apenas na Austrália, Antártica e nas ilhas do Pacífico (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). A leishmaniose é uma doença que causa entre 20.000 e 30.000 mortes por ano, possuindo a segunda maior taxa de mortalidade, perdendo apenas para malária (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

Este gênero faz parte da família Trypanosomatidae (LAINSON, 2010a; MARTINS; LIMA, 2013), que engloba nove gêneros de parasitas obrigatórios (SIQUEIRA, 2005), pertencendo ao Reino Protozoa (LAINSON, 2010a).

O gênero *Leishmania* é um complexo de doenças causadas por 17 espécies de parasitas protozoários (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006), sendo hoje classificado em dois subgêneros *Vianna* (V) e *Leishmania* (L) (FIOCRUZ, 1997). E cada subgênero apresenta um alto espectro de espécies causadoras da leishmaniose (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015) e estas espécies causam diferentes manifestações clínicas que variam desde lesões cutâneas autocuráveis até doenças viscerais com risco de vida (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018), não estando

apenas ligadas à espécie de *Leishmania* infectante, mas também está ligada à resposta imune do hospedeiro (SILVEIRA *et al.*, 2009).

A leishmaniose cutânea é a manifestação mais comum de leishmaniose, causada na América Latina pela espécie *L. amazonensis* (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017) tendo como característica apresentar uma ou mais lesões que se desenvolvem de semanas até meses desde a picada do flebotomíneo (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). A leishmaniose cutânea localizada é caracterizada pela presença de um nódulo ulcerativo (MOKNI, 2019), possuindo locais de predileção as áreas descobertas da pele, como rosto, pescoço, braços e pernas (VON STEBUT, 2015). Semanas depois da infecção, há o surgimento de um nódulo crescente tendo as bordas elevadas, como sinal de vulcão (VON STEBUT, 2015).

Entretanto, a leishmaniose pode atingir tecidos mucosos e cartilagosos (CHACÓN-VARGAS *et al.*, 2018) através das vias hematogênica ou linfática (ALTAMIRANO-ENCISO *et al.*, 2003), evoluindo para a forma mucocutânea (CHACÓN-VARGAS *et al.*, 2018), causada pelo mesmo parasita. Já a manifestação cutâneo difusa, também causada pela espécie *L. amazonensis*, é caracterizada principalmente por apresentar nódulos ou pápulas cor de pele (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). Esta manifestação também pode ser chamada de leishmaniose anérgica ou lepromatosa (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

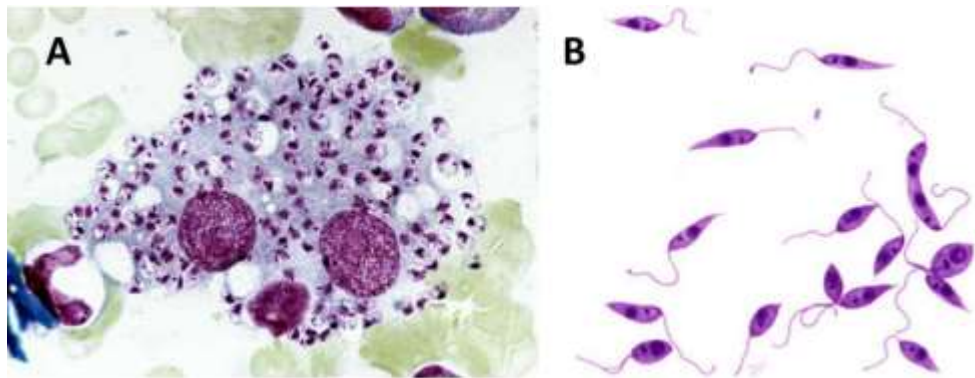
A leishmaniose visceral, que nas Américas é causada pela espécie *L. infantum chagasi* (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017), não apresenta ulcerações na pele, pois há o envolvimento dos órgãos internos como baço, fígado, órgãos linfáticos e medula óssea (VON STEBUT, 2015) devido à disseminação de macrófagos infectados, é caracterizada por febre, perda significativa de peso, anorexia, fraqueza, palidez, tosse, diarreia (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015), sendo na maioria dos casos fatal se não tratada (VON STEBUT, 2015).

A infecção por *L. infantum chagasi* quando não tratada corretamente (MOKNI, 2019). pode evoluir para uma forma dérmica chamada pós-kalazar (VON STEBUT, 2015), apresentando lesões papulares ou maculares e na forma antroponótica estes pacientes são considerados reservatórios do patógeno (VON STEBUT, 2015). Entretanto, a fisiopatologia da leishmaniose dérmica pós-kalazar está diretamente ligada com a resposta imune do hospedeiro (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

#### 4.1.1 Ciclo De Vida E Multiplicação

Os protozoários da família Trypanosomatidae possuem algumas formas celulares, sendo evidentes na transição entre os hospedeiros vertebrado e invertebrado (SIQUEIRA, 2005). As espécies do gênero *Leishmania* apresentam as formas amastigota e promastigota (figura 1), esta nomenclatura se dá pelo local onde está localizado o flagelo em ambas formas (SIQUEIRA, 2005).

Figura 1 - formas evolutivas da *Leishmania*



Fonte: (OSWALDO CRUZ; DOUGLAS DE SOUZA MOREIRA BELO HORIZONTE, 2017)

Legenda: (A) amastigota (B) promastigota

A forma amastigota (figura 1A) consiste em uma forma arredondada ou oval, com um flagelo curto que não se exterioriza, encontrada nas células e tecidos do hospedeiro vertebrado (VIGILÂNCIA, SECRETARIA DE; SAUDE, 2007). Já a forma promastigota (figura 1B), consiste em uma forma alongada com o flagelo livre a partir da porção anterior das células. (SIQUEIRA, 2005), encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (VIGILÂNCIA, SECRETARIA DE; SAUDE, 2007).

Os vetores invertebrados da leishmaniose são, fêmeas de mosquitos flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; VIGILÂNCIA, SECRETARIA DE; SAUDE, 2007), sendo encontrados tanto em ambientes silvestres quanto em urbano e rural (MARTINS; LIMA, 2013). Já os vertebrados, são além do homem, alguns animais domésticos como canídeos, felídeos (VASCONCELOS *et al.*, 2018), porém ainda segundo VASCONCELOS *et al.* (2018), não há comprovação que estes animais são apenas reservatórios da doença, por tanto eles são considerados hospedeiros acidentais.

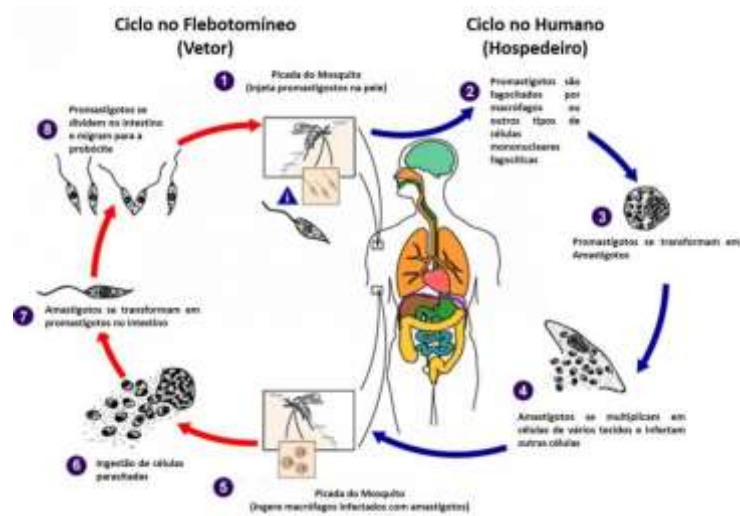
A forma mais comum de transmissão da leishmaniose é através do repasso sanguíneo do inseto vetor, que está contaminado contaminado com as formas

promastigotas do protozoário (VIGILÂNCIA, SECRETARIA DE; SAUDE, 2007) e raramente se dá através da transfusão sanguínea, agulhas compartilhadas, via congênita ou via sexual (HAWTHORN *et al.*, 2018) (figura 2). A saliva do inseto possui o maxidilan, substância que pode aumentar a infecciosidade de várias espécies de *Leishmania* (SVENSJÖ *et al.*, 2012), pois exercem atividade imunossupressora, o que pode facilitar na entrada do parasita nos macrófagos (CARREGARO *et al.*, 2015).

Estas formas promastigotas precisam sobreviver às defesas iniciais do hospedeiro (VIGILÂNCIA, SECRETARIA DE; SAUDE, 2007) e através da endocitose, há a internalização das mesmas nos macrófagos (MICHALICK, 2005). Uma vez nos macrófagos, os parasitas ficam dentro do vacúolo parasitóforo, separando-os do citoplasma celular (VIGILÂNCIA, SECRETARIA DE; SAUDE, 2007). As células que não foram destruídas pelo sistema imune do hospedeiro (VIGILÂNCIA, SECRETARIA DE; SAUDE, 2007) se transformam em amastigotas, para que se adaptem e sobrevivam no meio ácido presente dentro do vacúolo digestivo (MICHALICK, 2005) (figura 2). Estas amastigotas iniciam um processo de multiplicação, fazendo com que a célula hospedeira se rompa e as amastigotas serão liberadas na corrente sanguínea e serão novamente internizadas por outros macrófagos (MICHALICK, 2005) (figura 2).

Nos hospedeiros vertebrados, há o reconhecimento do patógeno pelos receptores *Toll-like*, que reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (PRATTI *et al.*, 2019), essenciais para o estabelecimento da infecção (SANTOS-PEREIRA *et al.*, 2019). Segundo GABRIEL *et al.* (2019) em ensaios *in vivo* o histórico genético do hospedeiro, as espécies de *Leishmania* e os diferentes isolados de parasitas podem influenciar a resposta imune. Porém além do parasita, a resposta imune do hospedeiro desempenham papel fundamental nas manifestações clínicas da leishmaniose (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Figura 2 - ciclo Biológico das Leishmanioses



Fonte: CDC

O inseto flebotomíneo durante um novo repasso sanguíneo inocula macrófagos infectados com as formas amastigotas. No trato digestivo do inseto, durante um período de cerca de 18 a 24 horas, as amastigotas iniciam o processo de diferenciação, se transformando em flagelados pequenos (MICHALICK, 2005). Após quatro dias de grande multiplicação a transformação das amastigotas em promastigotas (FILEMON *et al.*, 2012) delgadas e longas (MICHALICK, 2005), que continuam se multiplicando durante as próximas 48 horas (FILEMON *et al.*, 2012). Após alguns dias, as formas metacíclicas são encontradas na parte torácica do intestino médio (FILEMON *et al.*, 2012; MICHALICK, 2005), e se alojam na cavidade oral do vetor.

## 4.2 TRATAMENTO

A seguir foram citados e descritos de forma sucinta os fármacos que são utilizados no tratamento de Leishmaniose humana e canina, além da elucidação de casos de falhas terapêuticas e queda na porcentagem de cura dos fármacos já descritas.

O Glucantime® é indicado para todos os tipos de leishmaniose, nas formas cutâneas localizadas e disseminadas, a dose diária varia entre 10 a 20 mg/SbV /Kg/dia durante 20 dias seguidos (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003).

O mecanismo de ação dos antimonialais não é totalmente claro, é provável que o metabolismo de tiol pode desempenhar papel fundamental no mecanismo de ação, podendo incluir a manutenção da homeostase do tiol redox e a defesa contra estresse químico e oxidativo (VICKERS; GREIG; FAIRLAMB, 2004). Sendo o medicamento de primeira escolha (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003), porém este medicamento é tóxico e injetável, apresentando muitos efeitos colaterais como inapetência, náusea, vômitos, dor abdominal, prurido, cefaleia, febre, fraqueza, tontura, insônia (BORGES DE LIMA *et al.*, 2007) porém o principal efeito colateral é sua ação no aparelho cardiovascular (GONTIJO; MELO, 2004).

A ANB tem sido utilizada como medicamento de segunda escolha, é administrado quando o antimonial pentavalente não tem resposta positiva (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). Porém, há relatos de falhas terapêuticas, podendo indicar resistência dos parasitos contra o fármaco (TEIXEIRA *et al.*, 2018). Apresenta extensas complicações de toxicidade, como náusea, vômito, rigidez, febre, hipertensão e hipóxia (RODRIGUEZ *et al.*, 2018). É também o medicamento considerado mais eficaz no combate às lesões mucosas (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). A dose inicial de ANB é de 0,5 mg/kg/dia deve ser aumentada gradativamente, conforme a tolerância do paciente, até 1 mg/kg/dia, sendo feita em dias alternados (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). O alvo primário da ANB é o ergosterol de membrana (BRAJTBURG *et al.*, 1990).

A pentamidina possui propriedades antitripanossomáticas, antifúngicas, entre outras (BERMAN *et al.*, 1986), sendo bem ativa contra leishmaniose cutânea (GRANT; BANSINATH, 2001). Estudos *in vitro* mostram que a pentamidina altera morfologia do cinetoplasto, mitocôndria e ribossomos de *L. mexicana* e *L. amazonensis* (SANDS; KRON; BROWN, 1985). Os tripanossomas passam a ser incapazes de biossintetizar purinas novamente e apresentam via incompleta para a síntese de poliaminas (SANDS; KRON; BROWN, 1985).

Entretanto, apesar da pentamidina possuir boa atividade leishmanicida há um declínio de sua eficácia em pacientes com leishmaniose visceral na Índia (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

Os lipossomas são micro ou nanocápsulas organizadas em bicamadas que envolvem um ou mais espaços aquosos, sendo que quando alguns destes espaços são suspensos os lipídeos dão origem às vesículas, com o papel de transportar e liberar

os compostos nelas encapsuladas (GRANT; BANSINATH, 2001; ORTEGA; GIORGIO; DE PAULA, 2017). Estes lipossomas são bem estudados no tratamento de leishmaniose, pois este parasita coloniza macrófagos, que também são responsáveis pelo transporte dos mesmos em estudos *in vivo*, apresentando redução no perfil de toxicidade de fármacos (ORTEGA; GIORGIO; DE PAULA, 2017).

A formulação lipossomal da ANB leva a uma menor exposição de fármaco livre aos órgãos, demonstrando tolerância melhorada e efeitos colaterais reduzidos, podendo assim, administrar doses maiores do fármaco em espaços mais curtos de tempo (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). A Anfotericina B lipossomal (L-ANB) é usada com sucesso no tratamento de leishmaniose visceral, causada por *L. infantum chagasi* no Brasil (KHALIL *et al.*, 2014; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010) e casos graves de leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* (MACHADO-SILVA *et al.*, 2015). Como a L-ANB é menos tóxicas que ANB a dose administrada é de 1mg/kg em dias alternados, durante 30 dias (BERMAN, 2019). Entretanto, apesar de ser menos tóxicas que ANB e apresentando melhor transporte de compostos pelo organismo, sendo mais concentrado, a L-ANB é administrada por via intravenosa (BERMAN, 2019), leva ao problema de administração muito discutido e estudado em estudos com fármacos e compostos leishmanicida.

A Paramomicina é um fármaco para uso alternativo de leishmaniose, tanto a manifestação cutânea quanto a visceral (JAIN; JAIN, 2013). É um fármaco pouco absorvido quando administrado por via oral (DAVIDSON; DEN BOER; RITMEIJER, 2009), as formulações parentais causam reações adversas graves (JHINGRAN *et al.*, 2009). O mecanismo de ação da Paramomicina é a inibição da síntese proteica, induzindo leituras erradas de mRNA, também afeta o potencial de membrana mitocondrial (JHINGRAN *et al.*, 2009; ORTEGA; GIORGIO; DE PAULA, 2017).

Entretanto, alguns estudos *in vitro* estão mostrando alguma resistência de parasitas de *L. donovani* à Paramomicina, exibindo diminuição na absorção do fármaco, o que também não leva à perda de infectividade (MAAROUF *et al.*, 1997). Outro ponto negativo da Paramomicina é a via de administração, o tratamento consiste em injeções por três semanas e a falta de estudos com pacientes grávidas (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

A Miltefosina teve seu potencial leishmanicida identificado na década de 80, sendo registradas como eficiente principalmente para o tratamento de *L. donovani* em



humanos (LE FICHOUX *et al.*, 1998), já em 2007 foi lançado no mercado europeu como medicamento para o tratamento de cães com leishmaniose visceral canina (DOS SANTOS NOGUEIRA *et al.*, 2019), mas só em 2017 as agências brasileiras autorizaram o uso da Miltefosina no tratamento de leishmaniose canina (GONÇALVES *et al.*, 2021). Segundo estudos, os cães assintomáticos e oligossintomáticos resulta em altas taxas de recuperação e prevenção do desenvolvimento da doença clínica, mostrando que os parasitas na pele e nos órgãos linfoides de cães são significativamente reduzidas após o tratamento (DOS SANTOS NOGUEIRA *et al.*, 2019). O mecanismo de ação da Miltefosina é a inibição da síntese de Fosfolipase e proteína quinase C, específicas de *Leishmania* (CLÉMENCEAU *et al.*, 2002; EUE; ZEISIG; ARNDT, 1995).

Entretanto, alguns estudos *in vitro* tem demonstrado resistência cruzada a outros fármacos podendo levar ao surgimento de parasitas resistentes não só à Miltefosina, mas também a outros fármacos utilizados para tratar Leishmaniose visceral (GONÇALVES *et al.*, 2021).

Estudos realizados na Índia demonstram que no passar do tempo durante principalmente a década de 80, foi observado que a eficácia do tratamento contra *L. donovani*, abaixando para 71% durante 20 dias de tratamento e na década de 90 um mesmo estudo foi novamente realizado, mostrando que durante 30 dias de tratamento, a taxa de cura clínica foi apenas de 64% (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010), mas apenas em 1997 foi comprovado as falhas terapêuticas no norte da Índia (ALVAR *et al.*, 2012; LIRA *et al.*, 1999). O que pode ter ocorrido nesta época no país é o fato de que os antimoniais eram gratuitos acabando por ter o uso indevido e desenfreado do mesmo (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010). A ANB também apresentou casos de resistências em infecções causadas por *L. donovani* se mostrando um desafio para a terapêutica contra leishmanioses (SINGH *et al.*, 2017).

Alguns estudos *in vitro* utilizando *L. donovani*, a resistência contra os antimoniais é gerada em cultura e em amastigotas axênicas, mostrando que um aumento da dosagem dos antimoniais uma possível solução para a resistência, entretanto este aumento na dosagem pode comprometer a segurança dos pacientes devido à alta toxicidade do medicamento (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Quando o paciente não responde adequadamente com os outros medicamentos, a Miltefosina é o medicamento de terceira escolha (DA CÂMARA

ROCHA *et al.*, 2019). Este medicamento, possui alta taxa de cura contra leishmaniose cutânea (IRANPOUR; HOSSEINZADEH; ALIPOUR, 2019). Dentre os três medicamentos, a Miltefosina, é o que apresenta menores efeitos colaterais, caracterizando por apenas desconfortos abdominais (BRAGA<sup>1</sup> *et al.*, 2016), também apresenta efeitos tóxicos, como morte fetal (RODRIGUEZ *et al.*, 2018). Para pacientes com leishmaniose cutânea a dose recomendada é 2,5mg/kg/dia entre três e quatro semanas (BORGES DE LIMA *et al.*, 2007).

Diante dos efeitos tóxicos apresentados pelos medicamentos contra leishmaniose, as taxas de evasão do tratamento são altas.

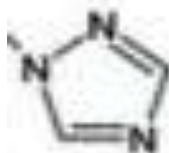
Após o tratamento, os critérios para curas clínicas da leishmaniose cutânea é o aspecto clínico das lesões, o regresso da infiltração e eritema (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). A leishmaniose mucosa é comprovado pelo exame otorrinolaringológico, e o desaparecimento de todos os sinais (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003).

#### 4.3 TRIAZOIS

Triazois são compostos sintéticos (FERA; SARRO, 2009) heterocíclicos com forma molecular C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub> em formato de anel (SONG; DENG, 2018) (figura 3). São quimioterápicos antifúngicos (MARTINEZ, 2006).

O primeiro relato de atividade antifúngica por um composto azolico foi descoberto por WOOLLEY (1944), mas foi apenas em 1958 com a introdução do chormidazol que os pesquisadores ficaram interessados nos azois como antifúngicos (FROMTLING, 1988). Miconazol, um fenetil imidazol sintetizado em 1969, foi o primeiro azol disponível para administração parenteral (MAERTENS, 2004).

Figura 3 - Anel triazolico

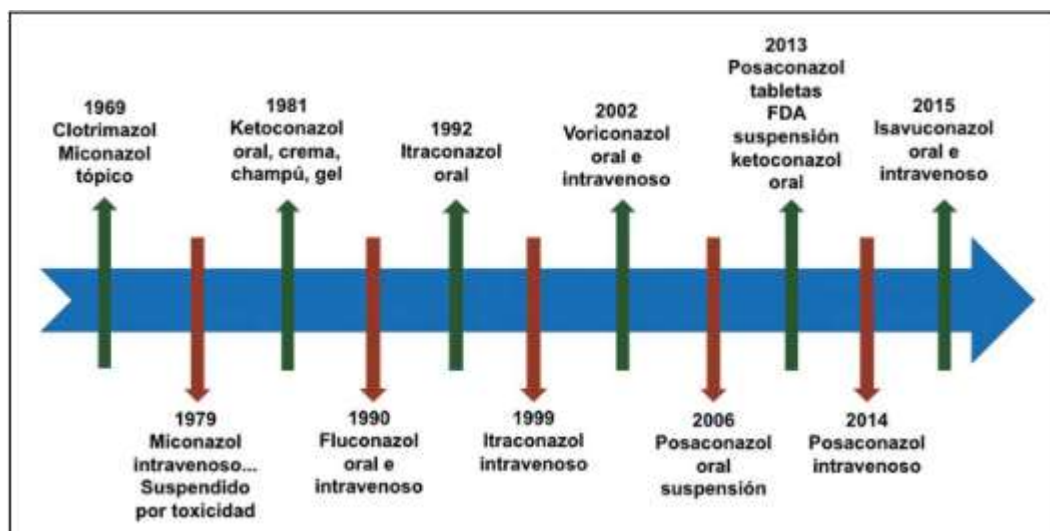


Fonte: Do autor

O grupo de compostos azolicos teve o uso clínico iniciado em meados da década de 1970, causando grande impacto na terapia antifúngica, pelo seu largo espectro de ação (MARTINEZ, 2006), assim, o cetoconazol por administração oral foi

aprovado em 1981 como alternativa à ANB (URIBE-JEREZ; TARAZONA-GUARANGA; ROBLES, 2020). Já na década de 90, a farmacoterapia das doenças fúngicas foi revolucionada pela introdução dos azóis e da caspofungina, que apresentam maior eficácia e segurança clínica (MOREIRA, 2010). (figura 4).

Figura 4 - Histórico triazóis



Fonte: (URIBE-JEREZ; TARAZONA-GUARANGA; ROBLES, 2020)

A família dos azóis pode ser classificada em dois grupos: os imidazóis, como o clotrimazol, o miconazol e o cetoconazol e os triazóis, como o fluconazol, o itraconazol e o voriconazol (NETO, 2009). O itraconazol atua adicionalmente contra *Aspergillus fumigatus* e diversas outras espécies desse gênero, sendo uma alternativa à anfotericina, além de ser o principal recurso na terapia antifúngica de pacientes com micoses sistêmicas endêmicas (MARTINEZ, 2006). O cetoconazol também é empregado no controle destas últimas infecções, porém é limitado a casos não graves, já o fluconazol mostra boa atuação e é preferido no tratamento de pacientes com infecções por *Candida sp.*, além de ser utilizado na criptococose e nas infecções urinárias e do sistema nervoso central por fungos susceptíveis (DIEKEMA *et al.*, 2003; MARTINEZ, 2006). Por fim, o voriconazol, o posaconazol e o ravuconazol são triazólicos de segunda geração, resultantes de modificações na estrutura química de, respectivamente, fluconazol e itraconazol (MARTINEZ, 2006).

### 4.3.1 Mecanismo De Ação

Como descrito por MARTINEZ (2006), os azóis possuem grande impacto na terapia antifúngica devido ao amplo espectro de ação dos mesmos, sendo a inibição da síntese de ergosterol, o principal mecanismo e o mais associado aos triazóis (DE MACEDO-SILVA *et al.*, 2013; EMAMI; TAVANGAR; KEIGHOBADI, 2017; MAERTENS, 2004). Esta função de inibição foi descoberta apenas no final dos anos 60 sendo utilizadas em tratamentos antifúngicos ergosterol-dependente (MOREIRA, 2010).

A alteração do potencial de membrana mitocondrial, juntamente com a produção e liberação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) também tem sido observados em tratamentos com derivados triazólicos (ALIANÇA *et al.*, 2017; MEINEL *et al.*, 2020; STROPPA *et al.*, 2017), não somente em espécies de *Leishmania*, mas em espécies de *Tripanossoma* e *Plasmodium* (DHEER; SINGH; SHANKAR, 2017; STROPPA *et al.*, 2017).

As proteases tem sido bastante estudadas também, pois participam da invasão ao hospedeiro (MCKERROW *et al.*, 2006). Portanto, a seguir serão descritos mais detalhadamente o funcionamento dos mecanismos de ação aqui citados.

#### 4.3.1.1 Inibição Síntese De Ergosterol

Esteróis são componentes fundamentais da membrana celular (HARAYAMA; RIEZMAN, 2018). Ao contrário das células de mamíferos, as células de *Leishmania* e *Tripanosoma* contêm ergosterol ao invés de colesterol (MCCALL *et al.*, 2015). São importantes reguladores das funções físicas, como fluidez e permeabilidade, possuindo também papel importante no metabolismo aeróbico e regulação do ciclo celular (DICKSON; SUMANASEKERA; LESTER, 2006).

É um componente sintetizado a partir do lanosterol com a remoção do grupo metil do C14, catalisado pela Alfa-desmetilase (DIAZ-GUERRA *et al.*, 2003) e Acetil-CoA (MCCALL *et al.*, 2015). Esta enzima pertence à superfamília do citocromo P450 (FRANÇA *et al.*, 2014). A biossíntese de ergosterol envolve várias etapas, porém apenas duas delas se tornaram os alvos de compostos sistêmicos (LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018). As estatinas agem na etapa de produção de mevalonato, enquanto os azóis inibidores de 14 $\alpha$ -desmetilase são os antifúngicos

mais utilizados e estão sob investigação para serem reaproveitados para o tratamento de infecções com parasitas protozoários (LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018), como no tratamento de Doença de Chagas (FRANÇA *et al.*, 2014) e Leishmaniose (TEIXEIRA *et al.*, 2018).

Os azóis interagem com um dos nitrogênios do anel azólico com o átomo de ferro do grupamento heme da enzima, impedindo que o substrato natural se ligue na mesma (LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018), inibindo assim, a síntese do ergosterol alterando a permeabilidade da membrana celular e a viabilidade fúngica (MARTINEZ, 2006), permitindo o extravasamento de diversas pequenas moléculas, levando à morte celular (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004), podendo também agir na síntese de lipídeos e inativando enzimas do processo oxidativo dos fungos (MARTINEZ, 2006). Estes azóis inibidores de biossíntese de esteróis são ativos por via oral e com amplo espectro de atividade antifúngica e baixa toxicidade (FRANÇA *et al.*, 2014).

Os primeiros experimentos sobre a sensibilidade de azóis em espécies de *Leishmania* mostraram uma maior eficácia do cetoconazol e do oxiconazol (BERMAN, 1982), eles também se mostraram eficazes em modelos murinos de leishmaniose visceral, embora menos potentes que a ANF B ou compostos antimoniais pentavalentes, fármacos atualmente usados para tratamentos de Chagas aguda e crônica (DE MACEDO-SILVA *et al.*, 2013), além disso são amplamente testados em espécies de *Leishmania*, como *L. mexicana* (BERMAN *et al.*, 1986; GOAD; HOLZ; BEACH, 1985), *L. amazonensis*, *L. donovani* e *L. infantum* (AL-ABDELY *et al.*, 1999; GODINHO *et al.*, 2012).

Os novos triazóis voriconazol e ravuconazol apresentam maior potência e espectro de ação do que os antigos azóis (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004). O miconazol interfere na biossíntese de ergosterol fúngico, mas em altas concentrações pode causar danos diretos à membrana celular, resultando no vazamento de constituintes celulares (MAERTENS, 2004). Porém vários estudos apontam que os azóis que são bem sucedidos em doenças fúngicas tem efeitos supressores mas não curativos contra infecções por *T. cruzi* em humanos ou animais, sendo incapazes de deter a progressão da doença (URBINA, 2009).

#### 4.3.1.2 Inibição De Cisteíno Protease

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, são importantes em várias atividades biológicas, como digestão de peptídeos, ativação de outras enzimas, modulação do sistema imunológico, participação no ciclo celular e diferenciação (SIQUEIRA-NETO *et al.*, 2018), sendo altamente relacionadas com fatores de virulência (MAHMOUDZADEH-NIKNAM; MCKERROW, 2004). As cisteíno proteases (CP) são categorizadas em 72 famílias e as mais abundantes e bem caracterizados em parasitas protozoários são as enzimas da família papaína (MCKERROW *et al.*, 2006) e tem sido muito estudadas a fim de se descobrir compostos mais efetivos (MARTINS *et al.*, 2009).

Em *Leishmania*, as CP se localizam em grande quantidade nos lisossomos, que particularmente aparecem na forma amastigota (SILVA-LÓPEZ, 2010) em sua maioria estão localizadas na bolsa dos flagelos (RANA *et al.*, 2012). Estas enzimas catalisam reações em cadeias de peptídeos hidrolisando-os em fragmentos curtos (MARTINS *et al.*, 2009), como serina, cisteína, ácido aspártico, metalo, treonina e papaína (uma cisteíno protease vegetal isolada do látex), que cliva os peptídeos em resíduos hidrofóbicos (MARTINS *et al.*, 2009).

Portanto, a utilização de um inibidor de CP que mata *Leishmania* em concentrações que não afetam as células hospedeiras de mamíferos, pode ser usado para o desenvolvimento de novos medicamentos anti-*leishmania* (GONTIJO *et al.*, 2015) e possivelmente para o desenvolvimento de vacinas (RANA *et al.*, 2012). Várias CP semelhantes à papaína foram identificadas em diferentes *Leishmania spp.* e são consideradas cruciais para sobrevivência e infectividade do parasita em seu hospedeiro humano. A principal CP estudada é rCPB2.8 (LANFRANCO *et al.*, 2008; SANDERSON *et al.*, 2000), que são proteinases semelhantes à catepsina L codificadas por genes presentes tanto em *L. major* (LANFRANCO *et al.*, 2008) e *L. mexicana* (LANFRANCO *et al.*, 2008).

A espécie *L. mexicana* expressa altos níveis de várias CPs (ALEXANDER; COOMBS; MOTTRAM, 1998; BART *et al.*, 1997), o CPB, gene multicópia que codifica os principais CPs semelhantes à catepsina L na forma amastigota (SOUZA *et al.*, 1992) e CPC um gene de cópia única que codifica proteínas semelhantes à catepsina B (BART *et al.*, 1997). Já *L. amazonensis* inibe a apresentação de antígenos por meio da degradação mediada por CP de moléculas de MHC de classe II (DE SOUZA LEO

*et al.*, 1995). Isto implica que as CPs em *Leishmania* não são apenas fatores de virulência, mas também podem ser considerados moduladores da resposta imune fornecem forte incentivo para que mutantes de *L. mexicana* deficientes em CP sejam candidatas à vacinas (ALEXANDER; COOMBS; MOTTRAM, 1998).

No entanto, existem diferenças na suscetibilidade de estágios específicos em diferentes espécies de *Leishmania* a inibidores de CP específicos (MAHMOUDZADEH-NIKNAM; MCKERROW, 2004), *L. major* é sensível aos inibidores da CP nos estágios de promastigota e amastigota (SELZER *et al.*, 1997), *L. mexicana* mostra pouco ou nenhum efeito da perda de atividade de CP em promastigota (MOTTRAM *et al.*, 1996) e nenhum efeito na replicação da forma promastigota (MAHMOUDZADEH-NIKNAM; MCKERROW, 2004).

#### 4.3.1.3 Alteração Do Potencial De Membrana Mitocondrial

As mitocôndrias desempenham um papel vital na fisiologia celular (SAKAMURU; ATTENE-RAMOS; XIA, 2016) sendo responsável pela geração de energia celular (ATP) em células eucariotas por meio de fosforilação oxidativa (SAKAMURU; ATTENE-RAMOS; XIA, 2016). A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial cria gradiente eletroquímico que impulsiona a síntese de ATP gerando o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) (G RWILLIANS, 1956; SAKAMURU; ATTENE-RAMOS; XIA, 2016). O  $\Delta\Psi_m$  é essencial para manter a função fisiológica da cadeia respiratória, o que significa que uma grande perda deste potencial esgota as células de energia, levando à morte celular (LAZARIN-BIDÓIA *et al.*, 2016). As mitocôndrias são a principal fonte de EROs, onze locais de produção de superóxido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relacionados ao metabolismo do substrato, transporte de elétrons e fosforilação oxidativa (CADENAS, 2018; MURPHY, 2009). Essas alterações têm sido consideradas um processo irreversível desencadeando o colapso mitocondrial e a morte celular (MEINEL *et al.*, 2020). O radical hidroxila é o mais reativo causando danos em proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA (BIRBEN *et al.*, 2012).

A mudança no equilíbrio oxidante/antioxidante em favor do oxidante é chamada 'estresse oxidativo' (JENNER *et al.*, 2003; TOSHNIWAL; ZARLING, 1992), que contribui para muitas condições patológicas, como câncer, distúrbios neurológicos, hipertensão, diabetes, doenças pulmonares incluindo asma (BIRBEN *et al.*, 2012) e

em *Leishmania* desencadeia danos aos componentes da cadeia de transporte de elétrons, o que colapsa a funcionalidade mitocondrial, culminando na morte celular semelhante à apoptose (STROPPIA *et al.*, 2017).

A desaminação oxidativa é uma fonte quantitativa grande de peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que contribui para o aumento nas concentrações de estado estacionário de espécies reativas de oxigênio (EROs) tanto na mitocôndria quanto no citosol (CADENAS; DAVIES, 2000). As EROs são considerados subprodutos tóxicos do metabolismo aeróbio e a principal causa de dano macromolecular (CADENAS, 2018). Os três principais EROs são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $-OH$ ) e o  $H_2O_2$  sendo respectivamente os produtos da redução univalente e bivalente de oxigênio ( $O_2$ ), produzidos pelo metabolismo aeróbio normal (CADENAS; DAVIES, 2000) que dentro de condições normais desempenham papéis importantes no metabolismo biológico e na sinalização celular (MEINEL *et al.*, 2020). O radical superóxido é um produto da fosforilação oxidativa que ocorre na cadeia de transporte de elétrons, sendo formado pela redução incompleta de oxigênio molecular (ESCOBAR *et al.*, 2002), sendo também o precursor da maioria dos EROs (EGOROVA; GORDEEV; ANANIKOV, 2017) e deve ser mantido em níveis mais baixos para evitar efeitos tóxicos para a célula (MEINEL *et al.*, 2020).

O aumento na produção de EROs induzem a disfunção mitocondrial, ou seja, alterações no potencial de membrana mitocondrial  $\Delta\Psi_m$  (JOSHI; BAKOWSKA, 2011), induzindo estresse oxidativo mitocondrial (MEINEL *et al.*, 2020). Em *T. cruzi*, o excesso de EROs pode atuar em qualquer membrana (LAZARIN-BIDÓIA *et al.*, 2016).

As alterações de  $\Delta\Psi_m$  induzidas em *Leishmania* por uma variedade de moléculas tem sido associada à geração de EROs e desencadeia danos aos componentes da cadeia de transporte de elétrons o que leva à morte celular semelhante à apoptose (STROPPIA *et al.*, 2017), podendo induzir perda de viabilidade celular (STROPPIA *et al.*, 2017).

Portanto, essas organelas são um alvo ideal para estudos de toxicidade *in vitro* (SAKAMURU; ATTENE-RAMOS; XIA, 2016), já que uma característica peculiar de tripanossomatídeos é a presença de uma mitocôndria única e em algumas condições esta organela pode preencher um grande espaço no volume celular (MEINEL *et al.*, 2020).



#### 4.4 TOXICIDADE E EFEITOS COLATERAIS

É sabido que as leishmanioses requerem uma longa administração parenteral (BAKUNOV *et al.*, 2010), e hoje os medicamentos indicados são os antimoniais (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003), ANB(SILVA-LÓPEZ, 2010), ANB-lipossomal (MARTINS; LIMA, 2013) e pentamidina (VASCONCELOS *et al.*, 2018). Apesar do avanço terapêutico significativo, a toxicidade grave e o possível aumento das incidência da resistência aos medicamentos limitam a eficácia da quimioterapia de primeira linha contra leishmaniose (ANVIKAR *et al.*, 2012; DONDORP *et al.*, 2009). Portanto, é importante descobrir novos medicamentos sem muitos efeitos colaterais (DHEER; SINGH; SHANKAR, 2017).

Neste contexto, os triazóis são uma classe de fármacos relativamente seguros com dose letal 50 próximo de 2000mg/Kg em roedores (SAHU; AGRAWAL; PANDEY, 2019), seus efeitos adversos são geralmente encontrados com altas doses (EMAMI; TAVANGAR; KEIGHOBADI, 2017) e têm chamado atenção da comunidade científica devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas e antimaláricas (CHU *et al.*, 2019; TARIQ *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2017; ZHANG, 2019).

A busca de novas moléculas com atividade antiprotozoária melhorada e toxicidade reduzida o fragmento 1,2,3-triazol tem sido estudado como substrato isostérico adequado para o anel azólico central (BAKUNOV *et al.*, 2010). Sua química se refere a um grupo de reações de baixo custo, rápidas, simples de executar que proporcionam alto rendimento (HEIN; LIU; WANG, 2008).

O perfil de toxicidade dos triazóis em comparação com os imidazóis pode ser explicado por sua maior afinidade com as enzimas do citocromo P450 de fungos do que de mamíferos em concentrações terapêuticas (SHEEHAN; HITCHCOCK; SIBLEY, 1999), tendo seus efeitos colaterais geralmente relacionados a esta afinidade (EMAMI; TAVANGAR; KEIGHOBADI, 2017). Essa potência dos triazóis de danificar a membrana celular patogênica, além de dificultar a biossíntese de ergosterol tem sido amplamente investigada no contexto da atividade leishmanicida (SAHU; AGRAWAL; PANDEY, 2019). Outros efeitos metabólicos dos azóis são a inibição da peroxidase e da catalase do citocromo-c, e o bloqueio do transporte de elétrons na cadeia respiratória (EMAMI; TAVANGAR; KEIGHOBADI, 2017).

Dentre os efeitos adversos se destacam intolerância gastrointestinal, hepatotoxicidade e hipersensibilidade, e em alguns casos ginecomastia e irregularidades menstruais (MARTINEZ, 2006). Já os triazóis possuem efeitos adversos que incluem hepatotoxicidade, erupções cutâneas, fototoxicidade (JHA *et al.*, 1999). Porém estes sintomas raramente são graves o suficiente para exigir a descontinuação da terapia (EMAMI; TAVANGAR; KEIGHOBADI, 2017).

#### 4.5 AÇÃO DOS TRIAZOIS EM OUTRAS DOENÇAS

Os triazóis são fármacos antifúngicos muito conhecidos com ações principalmente com fungos como *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* (NOBRE *et al.*, 2003), porém atualmente os derivados triazólicos tem apresentado diversas propriedades farmacológicas (BOSCH-NICOLAU *et al.*, 2019; CHU *et al.*, 2019), sendo estudados e testados em diversas doenças além de Leishmaniose, como Doença de Chagas (BOZOROV; ZHAO; AISA, 2019), Malária (BOZOROV; ZHAO; AISA, 2019), Toxoplasmose (MARTINS-DUARTE; DE SOUZA; VOMMARO, 2013), tuberculose e câncer (CHU *et al.*, 2019).

A aromaticidade e a rica propriedade em elétrons do triazol permita que se ligue prontamente a vários tipos de enzimas e receptores por meio de interações fracas, como ligações de hidrogênio, íon-dipolo, força de Van der Waals (-H. ZHOU; WANG, 2012; AYATI; EMAMI; FOROUMADI, 2016), habilidades que podem melhorar a solubilidade (CHU *et al.*, 2019) facilitando a utilização destes compostos em vários campos (SONG; DENG, 2018).

Os triazóis atuam como inibidores da síntese de ergosterol do *T. cruzi* se mostrando atividade potente em estudos *in vitro* e *in vivo* (BOSCH-NICOLAU *et al.*, 2019), validadas em muitas etapas diferentes da síntese (URBINA, 2009), sendo considerados fármacos promissores no tratamento de Doença de Chagas (BOSCH-NICOLAU *et al.*, 2019).

URBINA (2009) relatou que os triazóis afetam o CYP51 fúngico e protozoário do citocromo P-450 induzindo a cura parasitológica em modelos murinos de Doença de Chagas aguda e crônica. BOSCH-NICOLAU *et al.* (2019) investigaram um caso clínico onde uma moça estava infectada com *T. cruzi* e soro positivo para HIV. Para o

tratamento com o protozoário foi administrado Benzinidazol durante 60 dias e acompanhamento da carga parasitária de sangue intraperitoneal por qPCR durante 3 anos, obtendo sucesso com o tratamento na redução da carga parasitaria.

Além disso, muitos estudos realizados mostraram que o *T. cruzi* da mesma forma que a maioria dos fungos, depende do ergosterol para seu crescimento, desenvolvimento e proliferação em todas as fases do ciclo de vida (FRANÇA *et al.*, 2014). O cetoconazol, por exemplo, se demonstrou eficiente em ensaios *in vitro* contra *T. cruzi*, porém falhou em tratamentos com pacientes na fase crônica da doença (BOSCH-NICOLAU *et al.*, 2019). Entretanto, muitos fármacos bem-sucedidos no tratamento de doenças fúngicas, como cetoconazol e intraconazol, apresentam apenas efeitos supressivos, porém não curativos contra infecções por *T. cruzi* em humanos ou animais de experimentação, sendo incapazes de deter a progressão da doença (URBINA, 2009).

BRANDÃO *et al.* (2018) realizaram um estudo com derivados triazolicos quanto a atividade antimalárica utilizando as cepas de *P. falciparum* e *P. vivax* resistentes à cloroquina, *in vitro*, obtendo compostos promissores. Já CHU *et al.*, (2019) em sua revisão, mostraram que muitos derivados triazolicos como quinolina-triazol, berbina-triazol, Chalcona-quinolina e híbridos de chalcona-triazola apresentam atividade antimalárica contra *P. falciparum*.

YADAV *et al.* (2018) incorporaram no anel triazolico o norfloxacin, e testaram estes derivados contra as cepas D10, Dd2 e W2 de *P. falciparum* *in vitro* comparando com a cloroquina, com vários compostos obtendo atividades antimaláricas, tendo como alvo desde compostos, o DNA do parasita.

A baixa concentração inibitória 50 *in vitro* de compostos triazolicos, derivados do intraconazol, bem como seu efeito *in vivo* destes compostos contra *T. gondii*, juntamente com o efeito anti-Plasmodium do intraconazol e posaconazol, indicam a presença de um alvo molecular seletivo contra *T. gondii* através de uma competição com NADH através da lactato desidrogenase (MARTINS-DUARTE; DE SOUZA; VOMMARO, 2013), sendo administrados em camundongos infectados com a cepa RH, obtendo diferença significativa na sobrevivência dos camundongos e na proteção obtida contra recaídas e morte da doença (MARTINS-DUARTE; DE SOUZA; VOMMARO, 2013).

LUAN *et al.* (2019) em seus experimentos, fundiram derivados triazólicos e derivados fenólicos e relataram que uma série destes derivados facilitou o desenvolvimento de potenciais agentes antiparasitários, dos quais cinco destes derivados exibiram excelente atividade *in vitro* contra *T. gondii*, chegando à conclusão que os compostos à base de triazol têm potencial atividade inibitória contra *Toxoplasma*.

O aumento na incidência de câncer devido a um aumento do número de pacientes imunocomprometidos, levou a um aumento da resistência aos medicamentos anticâncer (AHMAD *et al.*, 2018). Além disso, é evidente que a maioria dos fármacos anticâncer possuem um único alvo, podendo ser proteína ou enzima, uma vez que as células utilizam as vias metabólicas alternativas que as tornam prontamente mais resistentes a tais fármacos (AHMAD *et al.*, 2018). Este rápido desenvolvimento de resistência aos medicamentos e os efeitos colaterais agudos dos medicamentos anticâncer de uso clínico, ainda são os principais obstáculos para uma quimioterapia eficaz (XU; ZHAO; LIU, 2019).

Muitas abordagens terapêuticas quimiopreservantes e anticâncer estão continuamente na prática, a fim de decifrar novos candidatos a fármacos interagindo com alvos moleculares de vários processos celulares durante o desenvolvimento do tumor (AHMAD *et al.*, 2018). Diante disto, os triazóis e seus derivados se enquadram em estudos anticâncer, pois tem um amplo espectro de ação e cura em várias doenças (AHMAD *et al.*, 2018) já citadas.

Então alguns estudos com hibridização da estrutura de 1,2,3,-triazol com outros fármacos anticâncer tem se mostrado com grande potencial para fornecer novos candidatos anticâncer e com baixa toxicidade e alta eficácia contra cânceres resistentes à medicamentos (XU; ZHAO; LIU, 2019). XU; ZHAO; LIU, (2019) utilizou derivado triazol com Cefatrizina e Carboxiamidotriazol e se revelou um grande potencial como fármaco anticâncer.

#### 4.6 MÉTODOS *IN SILICO*

A pesquisa *in Silico* consiste em modelos matemáticos de um sistema fisiológico ou farmacológico são desenvolvidos e testados em computador, são um

híbrido de técnicas *in vitro* e *in vivo*, sendo projetados para imitar o comportamento de organismos em sua totalidade (COLQUITT; COLQUHOUN; THIELE, 2011). Esta simulação nada mais é que a construção simulada de um modelo ou uma situação real em que depois serão testadas em determinadas situações para avaliar qual seria sua resposta (VALLE, 2009). A terapia direcionada pode levar ao aumento de eficácia do medicamento e melhores resultados gerais no tratamento de doenças com menos efeitos colaterais sistêmicos (COLQUITT; COLQUHOUN; THIELE, 2011). Alguns esforços de descoberta de medicamentos baseados em estrutura fornecem melhor acesso à inovação e também o processo de identificação de agentes terapêuticos com boa relação custo-benefício (SCHUHMACHER; GASSMANN; HINDER, 2016).

O planejamento de fármacos antiparasitários se baseia na investigação de vias bioquímicas do parasita comparando com as vias do hospedeiro, tendo como objetivo identificar alvos para a modulação seletiva através de moléculas pequenas (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). A bioinformática consiste em uma abordagem interdisciplinar baseada em computador para vários fins de predição, como interações peptídeo-receptor (RAHIM, 2010).

Este reconhecimento de associações estrutura-atividade usando a triagem *in silico* pode levar a uma forma eficiente na identificação de alvos específicos para os fármacos de doenças negligenciadas (SAKI *et al.*, 2019). Dentre as diversas abordagens *in silico* que incluem abordagens baseadas em ômicas (SAKI *et al.*, 2019) temos o docking molecular.

O docking molecular consiste em prever a melhor posição e orientação de um ligante em comparação a uma molécula formando um complexo estável, normalmente sendo empregado para proteínas e enzimas (NEIS, 2019a), permitindo entender relações entre diferentes alvos moleculares envolvidos em determinada doença (ANIGHORO; BAJORATH; RASTELLI, 2014).

Utilizando este contexto, o docking molecular está entre os métodos *in silico* mais populares e bem-sucedidos, ajudando a prever as interações que ocorrem em moléculas e alvos biológicos (KITCHEN *et al.*, 2004), provando-se ser uma ferramenta importante para ajudar a compreender como os compostos químicos interagem com seus alvos moleculares e assim facilitando a descoberta e o desenvolvimento de medicamentos (PINZI; RASTELLI, 2019).

Para identificar os alvos moleculares no parasita é preciso seguir duas regras, sendo a primeira observar e identificar um alvo ausente no hospedeiro ou com homologia e funcionalidade diferente, e a segunda é observar quais alvos são essenciais para a sobrevivência do parasita, podendo ser uma enzima presente em qualquer via bioquímica do mesmo (RAJ *et al.*, 2020). Ao conhecer a orientação dos alvos pode se prever a força de associação ou afinidade de ligação entre as moléculas aumentando as chances de encontrar moléculas candidatas ao uso terapêutico (NEIS, 2019b).

Isto permite identificar alvos específicos para *Leishmania spp* principalmente a utilização de vias bioquímicas presentes nos tripanossomatídeos e ausentes nos hospedeiros, fornecendo excelentes alvos para o desenho de compostos antileishmania (ROMERO; LÓPEZ, 2017) com base nas interações proteína-ligante (RAJ *et al.*, 2020).

Outro estudo *in silico* importante é a ‘regra dos cinco’ de Lipinski. Esta regra é baseada em uma distribuição de propriedades calculadas (LIPINSKI *et al.*, 2001), que foi originalmente proposta em resposta ao grande número de bibliotecas feitas de forma aleatória devido à viabilidade sintética e as vezes pela busca obstinada pela potência e pela química combinatória (ZHANG; WILKINSON, 2007). Lidando com compostos ativos oralmente e definindo quatro faixas de parâmetros físico-químicos associados à solubilidade aquosa e a permeabilidade intestinal (LIPINSKI, 2004).

A ‘regra dos cinco’ se tornou um pilar de tomada de decisão tanto para a indústria farmacêutica quanto para os estudos de triagens de compostos não industriais (MCKERROW; LIPINSKI, 2017), sendo uma alternativa de racionalizar o composto de modo a não produzir moléculas muito polares e grandes a ponto que tenham chance menor de exibir propriedades farmacêuticas desejáveis (ZHANG; WILKINSON, 2007). Levando à utilizar esta regra para se concentrar no desenvolvimento de novos medicamentos para doenças infecciosas em particular as parasitárias (MCKERROW; LIPINSKI, 2017).

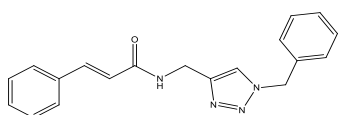
Segundo Lipinski, quando há a má absorção ou permeabilidade de um composto é mais provável que o composto apresenta mais que cinco doadores de ligação de Hidrogênio, sua massa molar é maior que 500, coeficiente de partição (Log P) maior que cinco e a soma dos átomos de Nitrogênio e Oxigênio sendo maiores que dez (ZHANG; WILKINSON, 2007). Esta análise levou ao nome ‘regra dos cinco’

porque os pontos de corte para cada um dos quatro parâmetros eram todos próximos ou múltiplos de cinco (LIPINSKI *et al.*, 2001). E de acordo com esta regra, quaisquer compostos que possam ser ativos por via oral não devem violar mais do que um destes parâmetros (MASOOD *et al.*, 2017), até porque 20% dos compostos ativos por via oral falham em pelo menos um destes parâmetros (ZHANG; WILKINSON, 2007).

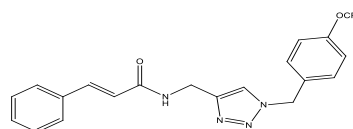
## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 COMPOSTOS

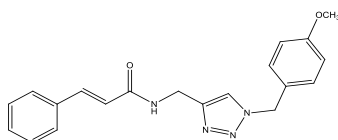
Os compostos derivados de triazóis que serão utilizados foram sintetizados por Silva *et al.* (2019) no Instituto de Ciências Exatas no departamento de Química da UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. Foram 18 compostos testados quanto a atividade leishmanicida contra as formas amastigota e promastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* quanto a toxicidade a macrófagos murinos. As estruturas químicas dos compostos estão dispostas a seguir.



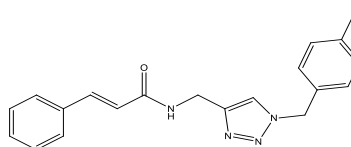
FS10



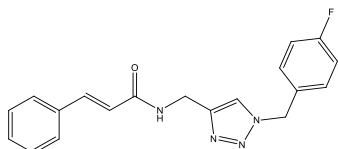
FS28



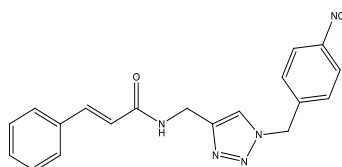
FS29



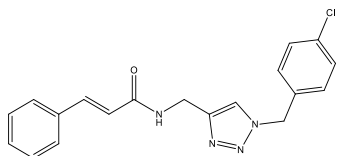
FS32



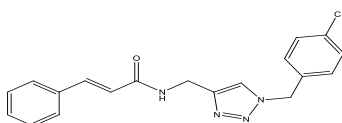
FS33



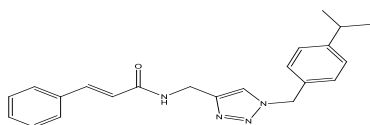
FS34



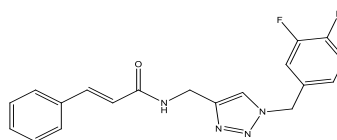
FS40



FS44

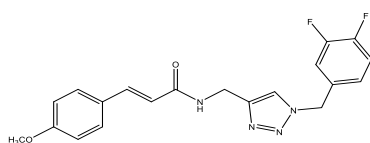


FS49

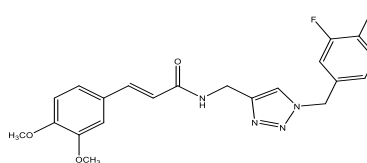


FS53

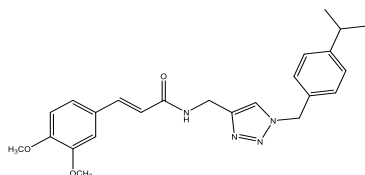




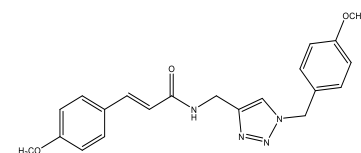
FS68



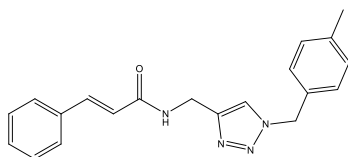
FS71



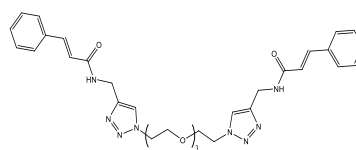
FS65



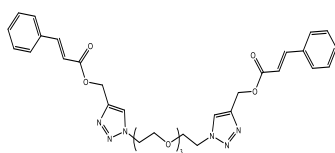
FS66



FS42



FS54

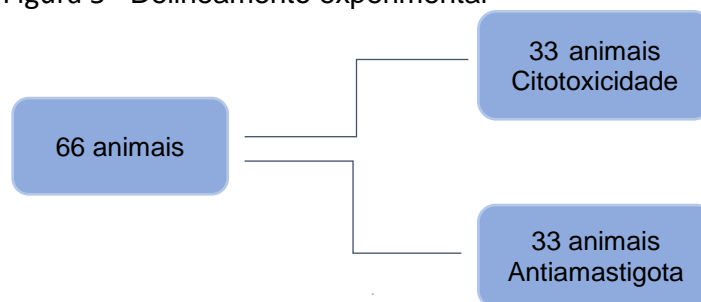


FS35

## 5.2 UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Para a realização dos experimentos que serão descritos a seguir, foram utilizados 66 camundongos SWISS, com idade de nove semanas, com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIFAL), sob o número de protocolo 019/2020. Os animais ficaram no biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), ambiente devidamente refrigerado, com ração e água trocados frequentemente, os quais serão utilizados para a obtenção de macrófagos peritoneais para ensaios de citotoxicidade e infecções para obtenção de promastigotas.

Figura 5 - Delineamento experimental



Fonte: do Autor.

### 5.3 CULTURA E OBTENÇÃO DOS PARASITAS

O presente estudo utilizou as espécies *Leishmania (L.) amazonensis* (cepa MHOM/BR/71973/M2269) e *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/cepa 46) colocadas em frascos de cultura (25 cm<sup>2</sup>) juntamente com meio Schneider, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 5 % (50.000 UI/mL) de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina. Esta cultura foi mantida a 25° C.

### 5.4 CURVA DE PROLIFERAÇÃO

Os parasitos foram adicionados em tubos Falcon e incubados na estufa BOD e durante 9 dias foram retiradas alíquotas (10 µL) deste tubo contendo os parasitas. Estas alíquotas foram adicionadas à câmara de Neubauer para que assim, pudesse se contar as promastigotas existentes no tubo no decorrer destes nove dias, para que assim, pudesse determinar a fase Log e a fase estacionária de crescimento dos parasitos.

### 5.5 ATIVIDADE LEISHMANICIDA CONTRA PROMASTIGOTAS

As promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (cepa MHOM/BR/71973/M2269) e *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/cepa 46) foram colidas em fase logarítmica de crescimento com meio Schneider suplementado com soro fetal bovino e penicilina. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer para o ajuste de concentração em 10<sup>7</sup>. Foram adicionadas à placa de 96 poços os compostos triazólicos em duplicata, na faixa de concentração de 100 - 3.0625 µg/mL, com a proporção de 196 µL de meio e 4 µL do composto, totalizando 200 µL por poço através de diluição seriada. Nas duas últimas colunas colocar em

uma o fármaco controle ANB e na última coluna dividida em duas partes com quatro poços cada deixando o controle celular (meio + parasitas) e controle branco (apenas meio), incubados a 25° C em estufa BOD durante 24, 48 e 72 hs. Após o tempo de incubação foi adicionado 10% do volume final/poço (20 µL) de resazurina e incubados por mais 4 horas a 25° C. Por fim, realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550 à 570 nm e 600 nm (PEREIRA *et al.*, 2010). Assim obtendo a concentração efetiva 50 (CE<sub>50</sub>) de proliferação de promastigotas.

## 5.6 ATIVIDADE LEISHMANICIDA CONTRA AMASTIGOTAS

Os macrófagos peritoneais dos camundongos foram cultivados em placa de 24 poços com lâminas de vidro de 13 mm mantidos em RPMI suplementado com soro fetal bovino e penicilina. Estas células foram infectadas com promastigotas da fase estacionária na proporção 10:1 (parasito 10<sup>7</sup>/ macrófago 10<sup>6</sup>) contadas em câmara de Neubauer e incubados na câmara de CO<sub>2</sub> (5%) por 24 hs. Os parasitos não fagocitados foram lavados com PBS. Então, os compostos foram adicionados aos poços em duplicata na faixa concentrações de 1 - 40 µg/mL e incubados novamente por 24h. Após este período foi retirado o sobrenadante e o mesmo congelado, o material dessas lamínulas foi fixado em metanol e corado com 10% de corante de Giemsa (ESPURI *et al.*, 2019), as formas amastigotas presentes nos macrófagos foram contadas em microscópio óptico (aumento de 100x) contando 200 macrófagos (PEREIRA *et al.*, 2010). Obtendo a concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) em amastigotas.

## 5.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Este teste foi feito a partir do método MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazolium brometo). Macrófagos foram retirados de camundongos SWISS obtidos através de lavagem intraperitoneal. Posteriormente realizou-se a suspensão destes macrófagos (10<sup>6</sup> macrófagos X ml) em meio RPMI 1640, suplementado com 10% soro bovino e 1% de penicilina, que foram adicionadas a placa de 96 poços, juntamente com os compostos na faixa de concentração de 100 - 0,84 µg/mL e o fármaco de referência AFB, com a proporção de 180 µL de meio e 20 µL do composto, totalizando 200 µL por poço através de diluição seriada. A placa foi incubada na câmara de CO<sub>2</sub> à 5,0% 37° C durante 24 hs. Após este período de incubação foi

adicionado 10% do volume total do poço de MTT e incubado novamente por mais 4h. Então, o meio com MTT foi removido dos poços e adicionou-se 100 µL de DMSO e os poços foram homogeneizados por 10 min. Por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550 à 570 nm para determinar a citotoxicidade 50% (CC<sub>50</sub>) (PEREIRA *et al.*, 2010).

## 5.8 INDICE DE SELETIVIDADE

O Índice de seletividade, também chamado de índice de segurança (SI) é a razão entre CC<sub>50</sub> e CE<sub>50</sub> tanto de promastigota quanto de amastigotas. Portanto, a determinação do mesmo é calculada pela razão entre a concentração citotóxica para 50% das células avaliadas no teste de citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) e a concentração efetiva para 50% das células avaliadas no teste de atividade dos compostos, em formas amastigotas e promastigota (CE<sub>50</sub>), segundo a seguinte equação:

$$SI = CC_{50}/CE_{50}$$

## 5.9 LIBERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Com 10<sup>8</sup> promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum* chagasi em fase e log de proliferação foram colocadas em tubos Falcon contendo 10 mL de meio de cultura e juntamente com 10<sup>7</sup> *Leishmania* contadas em câmara de Neubauer, e foram adicionados os compostos nas dosagens de CE<sub>50</sub> (µg/mL) devidamente ajustada para o volume do Falcon (multiplicado por 10) e foi feita a incubação durante 24 H. Posteriormente os parasitos foram novamente contados e ajustados à concentração de 10<sup>7</sup> e reservadas em gelo. Então, em uma placa preta foi adicionado tampão de reação 1X de Amplex Red Kit® na presença de 5 mM de Succinato, digitonina 40 µM, 0,1 U mL de peroxidase e amplex Red de 25 µM (Molecular Probes®), com volume total de 100 µL por poço. Posteriormente foi medida a fluorescência nos comprimentos de onda de excitação e emissão 571 nm e 585 nm, respectivamente, no Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer® (PELOSO *et al.*, 2012).

## 5.10 MÉTODOS *IN SILICO*

### 5.10.1 Previsões ADMET

Com os estudos que foram descritos anteriormente já feitos, com os compostos que obtiveram os melhores valores de IC<sub>50</sub> para promastigota e amastigota, juntamente com os melhores valores de CC<sub>50</sub>, foi realizado o método *in silico*. Foram observados os descritores ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) que tem a finalidade de prever a absorção, solubilidade, hepatotoxicidade e ligação às proteínas plasmáticas (SAHU *et al.*, 2019), através da plataforma SWISS ADME (<http://www.swissadme.ch/>).

### 5.10.2 Homologia E Docking Molecular

As enzimas de *Leishmania* foram selecionadas a partir da literatura, a fim de se obter enzimas distintas do hospedeiro humano, ou estruturalmente diferentes. A homologia das enzimas utilizadas para o docking foram realizadas a partir da sequência FASTA obtidas na plataforma Blast e enviadas para os programas Phyre2 (KELLEY *et al.*, 2015) e Raptrox (KÄLLBERG *et al.*, 2012). Após este passo, foi realizado a verificação das homologias o ERRAT(COLOVOS; YEATES, 1993), Verify 3D (BOWIE; LÜTHY; EISENBERG, 1991; LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992), PROVE (PONTIUS; RICHELLE; WODAK, 1996) e PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993), selecionando assim, a melhor homologia. Feito isso, foi determinado o sítio ativo de cada estrutura utilizando o programa CASTp (TIAN *et al.*, 2018) para que assim posteriormente fosse realizado o docking molecular utilizando dois softwares diferentes SWISSDOCK (<http://www.swissdock.ch/>) e CB-DOCK (<http://clab.labshare.cn/cb-dock/php/blinddock.php>). O desenho das estruturas dos compostos foi feito no programa Avogadro®.

### 5.10.3 Regra Dos 5 De Lipinski

A regra dos 5 de Lipinski foi aplicada apenas nos compostos que obtiveram melhores efeitos Leishmanicidas contra as formas amastigota e promastigota, e obtiveram menores valores de citotoxicidade, os compostos foram desenhados e avaliados quanto à regra na plataforma SWISS ADME (<http://www.swissadme.ch/>).

#### 5.11 ANALISE ESTATÍSTICA

Para testar a normalidade, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, em seguida prosseguiu-se com testes de análise de variância (ANOVA one way), para comparações entre os grupos, seguido do teste de Mann Whitney (não-pareado, bicaudal) com teste de significância  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas no Software GraphPad Prism, versão 8.0.

## 6 RESULTADOS

O presente estudo teve foco a atividade leishmanicida de compostos derivados triazólicos quanto a concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) em *Leishmania (L) amazonensis* e *Leishmania (L) infantum chagasi* contra as formas promastigotas, além dos efeitos citotóxicos utilizando macrófagos murinos e a avaliação contra as formas amastigotas de ambas espécies em contato com os compostos. Posteriormente foi realizada uma análise *in silico*, a fim de prever a farmacocinética dos compostos e a avaliação dos mesmos em relação à regra dos cinco de Lipinski, para avaliar a possibilidade de administração por via oral dos compostos. Através do docking foi possível prever um possível mecanismo de ação dos compostos de acordo com a interação dos mesmos com proteínas chave para algumas vias metabólicas do parasita. Por fim, foram realizados testes bioquímicos a fim de corroborar os resultados do docking molecular.

### 6.1 ATIVIDADE DOS COMPOSTOS CONTRA AS FORMAS PROMASTIGOTAS

Os 19 compostos triazólicos estudados no presente trabalho foram submetidos a testes com a forma promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi* e foram incubados em três períodos de tempo diferentes 24, 48 e 72h, e suas atividades pode ser observada a seguir na tabela 1, sendo possível observar que a incubação de 24h apresentou maior número de compostos com atividade em ambas espécies. Portanto, os demais experimentos foram realizados apenas com incubação de 24h.

Tabela 1- Ação Antipromastigota de Compostos Triazólicos em *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi* nos períodos de incubação de 24, 48 e 72h

Espécies	<i>L. amazonensis</i>			<i>L. infantum chagasi</i>		
	(µg/ml±DESVIO PADRÃO)			(µg/ml±DESVIO PADRÃO)		
Compostos	24h	48h	72h	24h	48h	72h
FS10	>100	>100	>100	11,20±1,18	24,18±0,25	>100
FS28	16,86±1,31	>100	>100	19,07±1,99	25,3±0,45	>100
FS29	>100	>100	>100	>100	>100	>100
FS32	53,26±3,29	>100	>100	11,64±0,69	17,51±0,24	>100
FS34	>100	>100	15,9±1,82	>100	>100	>100
FS40	>100	>100	>100	>100	>100	>100
(Continua)						

(Continua)

(Continuação)						
Compostos	24h	48h	72h	24h	48h	72h
FS41	4,61±0,07	>100	>100	>100	>100	>100
FS42	7,39±0,59	>100	>100	>100	20,3±1,9	>100
FS44	5,23±0,73	>100	>100	4,65±1,99	>100	>100
FS49	>100	>100	>100	12,47±2,5	>100	>100
FS53	>100	>100	>100	9,45±0,97	>100	>100
FS68	>100	>100	>100	>100	>100	26,02±0,14
FS71	8,75±0,17*	8,8±2,75	10,24±3,86	1,24±0,12	12,14±1,07	12,37±0,78
FS65	>100	>100	>100	13,16±1	>100	29,7±0,84
FS66	>100	>100	>100	1,87±0,71	24,47±1,61	>100
FS14	1,54±2,06*	5,62±2,08 *	>100	>100	>100	>100
FS54	>100	>100	76,79±0,4	0,8±0,77	>100	>100
FS35	9,41±1,58	33,44±1,58	14,3±2,55	27,75±2,4	24,16±1,26	23,21±0,6
ANB	12,04±2,84*	14,11±0,52*	6,62 ± 0,50	0,12±0,45	0,54±0,0,17	0,34±0,04

Fonte: do autor.

Legenda: ANB – Anfotericina B; os compostos marcados com \* possuem diferença estatística com Anfotericina ( $p<0,05$ );

Observando a tabela 1 é possível observar que os compostos com melhores ED<sub>50</sub> foram FS33, FS41, FS14 e FS35 em *L. amazonensis*, com 2,71; 4,61; 1,54 e 9,41 µg/mL respectivamente e FS44, FS71, FS66 e FS54 em *L. infantum chagasi* com 4,65; 1,24; 1,87 e 0,8 µg/mL respectivamente. Analisando a atividade em *L. amazonensis* os compostos citados apresentaram CE<sub>50</sub> melhores que o fármaco de referência ANB, que apresentou 12,04 µg/mL. Já em *L. infantum chagasi* a ANB ainda foi o mais ativo do que os compostos citados, pois apresentou 0,12 µg/mL de CE<sub>50</sub>.

Se observar os compostos ativos em ambas espécies do estudo, há algumas diferenças dos compostos ativos, alguns que apresentaram atividade em *L. amazonensis* não apresentaram atividades em *L. infantum chagasi*. Entretanto, os compostos FS28, FS32, FS44, FS71 e FS35 apresentaram atividades em ambas espécies, porém com valores de CE<sub>50</sub> diferentes.

Entretanto, outros compostos que não foram destacados acima, que também são ativos em ambas espécies apresentam valores de Índice de Seletividade (IS) em promastigota, como observado na tabela 2.



Tabela 2 - Tabela com os compostos ativos contra as formas promastigotas de *L. (L) amazonensis* e *L. (L) infantum chagasi* e seus IS

	<i>L. amazonensis</i>		<i>L. infantum chagasi</i>	
	CE50	IS	CE50	IS
FS10	-	-	11,2	5,56
FS28	16,86	6,88	-	-
FS32	53,26	2,05	11,64	9,40
FS33	2,71	25,36	-	-
FS41	4,61	46,63	-	-
FS42	7,39	2,26	-	-
FS44	5,23	6,41	4,65	7,21
FS49	-	-	12,47	2,82
FS53	-	-	9,45	6,14
FS71	8,75	2,40	1,24	16,93
FS65	-	-	13,16	1,84
FS66	-	-	1,87	8,02
FS14	1,54	15,42	-	-
FS54	-	-	0,8	179,50
FS35	9,41	2,15	27,75	0,73
ANB	12,4	2,38	0,12	246,25

Fonte: do Autor

Legenda: Valores de EC<sub>50</sub> em µg/mL; compostos com '-' não são ativos e não possuem IS

Os compostos que não apresentaram atividade e os experimentos com os tempos de incubação de 48 e 72h foram descontinuados.

## 6.2 CITOTOXICIDADE

Os ensaios de citotoxicidade são importantes na pesquisa de novos medicamentos com atividade leishmanicida, tanto para avaliar a toxicidade em células de mamíferos e estudar amastigotas intracelulares, uma vez que esta forma parasitária pelas manifestações clínicas da leishmaniose (ALIANÇA *et al.*, 2017). Os resultados obtidos de citotoxicidade 50 (CC<sub>50</sub>) em células murinas durante o período de incubação de 24h estão demonstrados a seguir na tabela 3.

Tabela 3 – Concentração Citotóxica dos Compostos Triazólicos em Células Murinas

Compostos	CC <sub>50</sub> (µg/ml±DESVIO PADRÃO)
FS10	62,22±0,88
FS28	115,95±1,2
FS29	81,18±0,53*
FS32	109,4±1,98
FS33	68,73±0,12*
FS34	45,52±1,98*
FS40	43,64±1,41
FS41	214,95±0,78
FS42	16,67±1,24*
FS44	33,52±1,92
FS49	35,16±0,26
FS53	58,01±2,43
FS68	37,06±0,35
FS71	20,99±2,79
FS65	24,2±0,96
FS66	14,99±0,98*
FS14	23,75±1,29
FS54	143,6±0,57
FS35	20,27±1,8*
ANB	29,55±0,58*

Fonte: do Autor

Legenda: ANB – Anfotericina B; os compostos marcados com \* possuem diferença estatística com Anfotericina B.  $p < 0,05$

Ao comparar os valores de CC<sub>50</sub> encontrados com a ANB (CC<sub>50</sub> 29,55), é possível observar que em sua maioria os compostos apresentaram melhores valores de CC<sub>50</sub>, indicando que os derivados triazólicos estudados são menos tóxicos que o fármaco de referência. Os compostos que apresentaram os valores mais altos de CC<sub>50</sub> foram FS10, FS28, FS29, FS32, FS33, FS41, FS53 e FS54, com 62,22; 115,95; 81,18; 109,4; 68,73; 214,95; 58,01; 143,6 µg/mL respectivamente.

### 6.3 ATIVIDADE ANTIAMASTIGOTA E ÍNDICE DE SELETIVIDADE

Os compostos ativos contra a forma promastigota de *L. amazonensis* foram selecionados para a realização do teste em amastigota, os resultados estão descritos a seguir na tabela 4. Já para *L. infantum chagasi* foram selecionados os compostos ativos que possuem os menores valores de CE<sub>50</sub> contra as formas promastigotas, resultados também demonstrados na tabela 4.

Tabela 4 - Tabela dos valores de  $CE_{50}$  dos compostos contra as formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi* em comparação com o fármaco padrão ANB

Espécies	<i>L. amazonensis</i>		<i>L. infantum chagasi</i>	
Compostos	EC50 $\mu\text{g/mL}$	IS	EC50 $\mu\text{g/mL}$	IS
FS28	0,9	128,9	-	-
FS32	7,6	14,4	-	-
FS33	8,6	8,01	-	-
FS41	16,6	12,9	-	-
FS42	14,1	1,19	-	-
FS44	6,94*	4,8	3,1	10,8
FS53	-	-	2,88	20,1
FS71	19,6	1,07	5,2	4,03
FS14	7,3	3,3	-	-
FS35	1,1	18,4	-	-
ANB	11,2*	2,6	8,6	3,4

Fonte: do Autor

Legenda: ANB – Anfotericina B; EC50 – concentração efetiva 50; IS – Índice de seletividade; compostos com \* possuem diferença significativa com o fármaco padrão.  $P < 0,05$

As  $CE_{50}$  em amastigota de *L. amazonensis* foram relativamente melhores do que a ANB (11,2  $\mu\text{g/mL}$ ), com exceção dos compostos FS41 e FS71 com 16,6 e 19,6  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Os compostos com o maior destaque foram FS28 e FS35, com 0,9  $\mu\text{g/mL}$  e 1,1  $\mu\text{g/mL}$  de  $CE_{50}$  respectivamente, indicando que são os mais ativos contra as formas amastigotas de *L. amazonensis*. Outro parâmetro também calculado que está descrito na tabela 4 é o índice de seletividade (IS) em amastigota, em *L. amazonensis* os compostos possuem altos valores, dando destaque também aos compostos FS28 e FS35 que apresentaram 128,9 e 18,43. Entretanto, apenas o composto FS44 obteve diferença significativa com a ANB.

Dentre os compostos do ensaio piloto de amastigota de *L. infantum chagasi* (tabela 4) os compostos apresentaram  $CE_{50}$  melhores que ANB (8,6  $\mu\text{g/mL}$ ) tendo o composto FS53 maior destaque por apresentar o menor valor de EC50 2,88  $\mu\text{g/mL}$ , também apresentando o melhor IS 20,1. Entretanto, nenhum composto até o momento apresentou diferença significativa com ANB. O experimento com os outros compostos ativos contra as formas promastigotas desta espécie será realizado posteriormente.

## 6.4 PREVISÕES ADME

Parte dos estudos *in silico* que serão analisados neste trabalho foi feito através da plataforma SWISSADME, plataforma online que analisa através da estrutura química de compostos parâmetros da farmacocinética dos mesmos, como absorção gastrointestinal, barreira hematoencefálica, permeabilidade glicoproteica e permeabilidade na pele (Log Kp). Além disso também foram analisadas a possível inibição dos compostos de algumas proteínas da família do Citocromo P450.

Para este experimento foram usados apenas os compostos que apresentaram atividade contra as formas promastigota de ambas espécies de *Leishmania* presentes neste estudo, comparando com os parâmetros ADME dos fármacos ANB e Glucantime (GLU).

Os resultados obtidos durante o experimento estão representados na tabela 5, sendo possível observar que os compostos em sua maioria possuem alta absorção gastrointestinal, com exceção dos compostos FS35 e FS54. E além destes o composto FS14 não ultrapassam a barreira hematoencefálica. A maioria dos compostos não possuem permeabilidade glicoproteica, com exceção dos compostos FS35 e FS54. O Log Kp dos compostos se apresentaram relativamente menos negativos do que os fármacos controle.

Os compostos também apresentaram algumas inibições das proteínas do Citocromo P450, o FS41 inibe todas as proteínas, já os compostos FS66 e FS71 inibem apenas CPY450 1A2.

## 6.5 LIPINSKI

Outro experimento também já realizado com os compostos ativos contra promastigotas foi o que analisa as propriedades físico-químicas dos compostos a fim de avaliar se os mesmos podem vir a ser administrados por via oral em um possível estudo *in vivo*. Neste caso, os parâmetros analisados foram a massa molecular, os aceptores de ligação de Hidrogênio, a função doadora de Hidrogênio, o coeficiente de partição (Log P) os pontos de corte de cada parâmetro devem ser próximos a 5 ou múltiplos de 5 (LIPINSKI *et al.*, 2001), além da solubilidade em água.

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 6, em comparação com os fármacos ANB e GLU, sendo possível observar que a maioria dos compostos não

apresentaram violações das regras dos 5 de Lipinski, com exceção de FS35 e FS54, assim como os fármacos controle.

## 6.6 LIBERAÇÃO DE PEROXIDO DE HIDROGÊNIO

A seguir serão demonstrados os resultados dos testes de Peróxido de Hidrogênio, os derivados selecionados para este teste foram os que apresentam menores valores de  $CE_{50}$ , que são FS33, FS14, FS41 e FS35 para interação com a espécie *L. amazonensis* e FS44, FS54, FS66 e FS71 para interações com *L. infantum chagasi*.

O gráfico 1 demonstra a liberação de peróxido de Hidrogênio dos compostos FS33 e FS14 em *L. amazonensis* também em fase Log, comparado com o controle não tratado e o controle positivo. Sendo possível observar que apenas o composto FS33 apresentou um aumento na liberação de peróxido pelo parasita e FS14 obteve liberação próximo ao controle não tratado, entretanto nenhum composto apresentou diferença estatística com o controle.

O gráfico 2 está representando a liberação de peróxido dos compostos FS44 e FS54 em contato com *L. infantum chagasi* em fase Log, em comparação com o controle positivo e o controle celular, onde não há tratamento. De acordo com o gráfico é possível observar que ambos compostos analisados até o momento inibem a liberação de peróxido pela mitocôndria dos parasitas, não apresentando diferenças estatísticas.

Tabela 5 – Previsões ADME dos Compostos Triazolicos

Parâmetros	FS10	FS14	FS28	FS32	FS33	FS35	FS41	FS42	FS44	FS49	FS53	FS54	FS65	FS66	FS71	ANB	GLU
AGI	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Baixa	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Baixa	Alta	Alta	Alta	Baixa	Baixa
BHE	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
Pgp	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não
Log Kp	-6,45	-6,43	-6,13	-6,76	-6,49	-8,17	-6,52	-6,28	-6,24	-5,91	-6,53	-8,97	-6,32	-6,86	-6,94	-11,94	-11,34
CPY450 1A2	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
CPY450 2C19	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
CPY450 2C9	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
CPY450 2D6	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
CPY450 3A4	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: do Autor

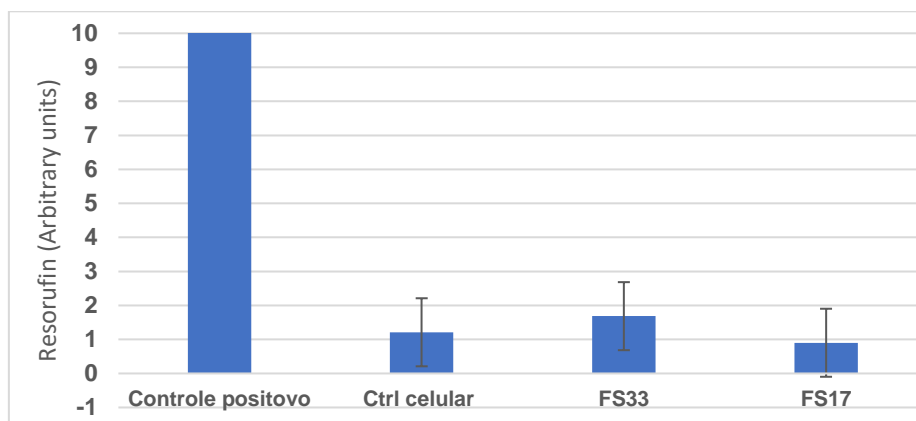
Legenda: ANB – Anfotericina B; GLU – Glucantime; AGI – Absorção gastrointestinal; BHE – Barreira hematoencefálica; Pgp – Permeabilidade glicoproteica; Log Kp – Permeabilidade à pele; CYP – Cisteíno Proteases.

Tabela 6 – Avaliação dos Compostos Quanto à ‘Regra dos Cinco’ de Lipinski.

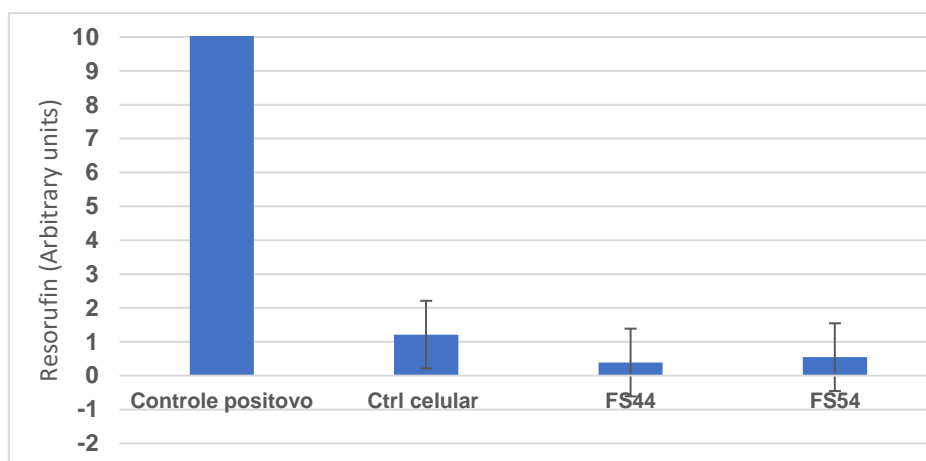
Lipinski	FS10	FS14	FS28	FS32	FS33	FS35	FS41	FS42	FS44	FS49	FS53	FS54	FS65	FS66	FS71	ANB	GLU
Solubilidade em água	MS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	MS	MS	PS	MS	MS	PS	PS
MM ( $\leq 500$ )	318,37	443,5	402	444,3	336,4	616,7	397,3	332,4	386,4	360,5	354,4	614,7	390,5	348,4	414,4	924,1	365,98
ALH ( $\leq 10$ )	3	5	7	3	4	11	4	3	6	3	5	9	5	5	7	18	9
DLH ( $\leq 5$ )	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	12	7
Log P ( $\geq 5$ )	3,35	3,51	4,88	4,71	3,51	4,19	4,18	3,84	4,27	4,58	3,67	2,83	4,33	3,1	3,41	0,8	-2,9
Violações	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim

Fonte: do Autor

Legenda: ANB – Anfotericina B; GLU – Glucantime; MS – moderadamente solúvel; PS – Pouco solúvel; MM- massa molecular; ALH – acceptor de ligação de Hidrogênio; DLH – doador de ligação de Hidrogênio; Log P – Coeficiente de Partição.

Gráfico 1 - Gráfico de colunas de liberação de Peroxido de Hidrogênio em *L. amazonensis*

Fonte: do Autor

Gráfico 2 - Gráfico de colunas de liberação de Peroxido de Hidrogênio em *L. infantum chagasi*

Fonte: do Autor

## 6.2 DOCKING MOLECULAR

Juntamente com os ensaios *in vitro* foi realizado um docking molecular a fim de tentar verificar uma possível inibição dos compostos triazolicos em enzimas específicas das espécies utilizadas no trabalho, e assim comparar os resultados obtidos no docking com os dos experimentos bioquímicos para tentar justificar o possível mecanismo de ação dos compostos, com a inibição da ação de alguma enzima.

As enzimas alvo que foram selecionadas foram Topoisomerase I e II, Glicose-6-fosfato desidrogenase e Piruvato Lanosterol C14-desmetilase. Estas enzimas específicas para ambas espécies foram desenhadas por homologia, exceto a Piruvato Lanosterol C14-desmetilase da *L. infantum chagasi* pois já estava no banco de dados Protein Data Bank (PDB) com o código 3l4d.

As outras enzimas após a homologia realizada, foram testadas em programas de verificação de qualidade da homologia nos quatro programas de verificação, resultados nas tabelas no anexo 2, sendo assim, selecionada a homologia que mais foi aprovada nas verificações. Após a determinação da melhor homologia de cada enzima, a homologia selecionada foi submetida a dois programas para a determinação dos aminoácidos resíduos de cadeia, que fazem parte dos respectivos sítios ativos, representados na tabela 7.

Tabela 7 - Determinação dos aminoácidos resíduos de cadeia comparando 3D Ligant e CASTp

Espécies	Enzimas	Aminoácidos	Posição na cadeia
<i>L. amazonensis</i>	Topoisomerase I	PHE, ARG, THR, ALA, SER, CYS	210, 314, 411, 414, 415
	Topoisomerase II	GLU, ASP	508, 510
	Glicose-6-fosfato desidrogenase	LYS, HIS	220, 250, 254, 411
	Piruvato Lanosterol C-14 desmetilase	TYR, LEU, MET, THR, SER, ARG, HIS, CYS, PHE, GLY	102, 115, 126,129,133,288,290,291,294,295,298,355,358,360,414, 415, 416, 420, 422,424, 428
<i>L. infantum chagasi</i>	Topoisomerase I	PHE, ARG, THR, ALA, SER, HIS	270, 314, 411, 414, 415, 453
	Topoisomerase II	ASP	508,51
	Glicose-6-fosfato desidrogenase	LYS, HIS	317, 347, 351, 508
	Piruvato Lanosterol C-14 desmetilase	TYR, LEU, MET, THR, SER, ARG, HIS, CYS, PHE, GLY	66, 67, 68, 85, 104, 105, 106, 114, 118

Fonte: do Autor

Legenda: ALA – Alanina; ARG – Arginina; ASP – Aspartato; CYS – Cisteína; GLU – Glutamato; GLY – Glicina; HIS – Histidina; ILE – Isoleucina; LEU – Leucina; LYS – Lisina; MET – Metionina; PHE – Fenilalanina; PRO – Prolina; SER – Serina; THR – Treonina; TYR – Tirosina; VAL – Valina. (UFMG, [s.d.]) Não foram repetidas as siglas dos aminoácidos repetidos, os números de posição de cadeia incluem os repetidos

Na tabela 7, os aminoácidos resíduos de cadeia, considerados sítio ativo das enzimas do estudo são bem semelhantes nas duas espécies, geralmente alterando apenas um aminoácido, Glicose-6-fosfato desidrogenase, possui os mesmos aminoácidos e o mesmo sítio ativo para ambas espécies, as diferenças observadas nos resíduos de cadeia são apenas as posições dos aminoácidos na cadeia peptídica.



Assim, os compostos ativos contra as formas promastigotas de ambas espécies (tabela 1) juntamente com as homologias das enzimas descritas acima foram submetidos ao docking cego pela plataforma CB-DOCK. Neste tipo de docking especificamente não foram utilizados os resíduos de cadeia (tabela 7), pois o docking cego utiliza dos compostos para determinar o sítio ativo, as dimensões do sítio de cada enzima, para cada composto estão dispostos no anexo 3. Os resultados do docking com as enzimas de *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi* (tabela 8) estão dispostos a seguir.

Tabela 8 - Resultados do docking cego dos derivados de triazóis com *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*

Enzima/ Composto	<i>L. amazonensis</i>				<i>L. infantum chagasi</i>			
	Topoisomerase I	Topoisomerase II	Glicose-6-fosfato desidrogenase	Lanosterol C14-desmetilase	Topoisomerase I	Topoisomerase II	Glicose-6-fosfato desidrogenase	Lanosterol C14-desmetilase
FS10	-	-	-	-	-6,4	-6,6	-7	-8,1
FS28	-7,2	-7,7	-6,6	-7,3	-4,9	-6,7	-7	-8,6
FS32	-6,9	-7,4	-5,4	-6,9	-6,3	-6,3	-6,6	-8,4
FS33	-7,2	-7,3	-6,8	-7,1	-	-	-	-
FS41	-7	-7,4	-6,7	-7	-	-	-	-
FS42	-6,8	-7,5	-6,5	-7	-	-	-	-
FS44	-6,8	-7,4	-7,5	-7,2	-7	-7	-7	-8,4
FS49	-	-	-	-	-6,22	-6,5	-6,3	-8,5
FS53	-	-	-	-	-6,4	-5,5	-6,5	-8,4
FS71	-6,9	-7,6	-6,8	-6,8	-6,4	-6,6	-6,6	-8,2
FS65	-	-	-	-	-6	-6,3	-6,7	-8,5
FS66	-	-	-	-	-6,3	-7	-6,6	-9
FS54	-	-	-	-	-10,2	-12,8	-11,1	-16,5
FS14	-6,7	-7,3	-5,9	-6,7	-	-	-	-
FS35	-11,5	-19,5	-11	-11,4	-10,4	-11,6	-10,4	-17

Fonte: do Autor

Legenda: Valores em Kcal/Mol. Compostos com “-” não foi realizado o docking.

Demonstrando que o composto FS32 e FS14 em contato com *L. amazonensis* possui energia de ligação de -5,4 e -5,9 Kcal/Mol com Glicose-6fosfato desidrogenase. Os demais compostos apresentaram energias entre -6,0 e -7,9 Kcal/Mol, mas em contrapartida o composto FS35 apresentou os valores de energia de ligação mais negativos em todas as enzimas, o mesmo ocorre com este composto quando em contato com *L. infantum chagasi* sendo a maior energia de ligação com Piruvato Lanosterol C-14 desmetilase que apresentou -17kcal/Mol. O composto FS54 também apresentou

valores de energia bem negativos, sendo também o maior em contato com Piruvato Lanosterol C-14 desmetilase (-16,5 Kcal/Mol). O composto que apresentou menor energia de ligação foi FS28 em contato com Topoisomerase I (-4,9 Kcal/Mol) e FS53 em contato com Topoisomerase II (-5,5 Kcal/Mol). Todos os outros compostos apresentaram valores relativamente altos de energia de ligação contra Piruvato Lanosterol C-14 desmetilase, e relativamente baixos contra Topoisomerase II.

O outro docking molecular executado pela plataforma SWISSDOCK tem seus resultados apresentados nas tabelas 10 e 11 dispostas a seguir. A tabela 10 demonstra os valores de energia de ligação dos derivados nas enzimas de *L. amazonensis*, destacando o composto FS42 quando ligado a Glicose-6-fosfato desidrogenase, com a menor energia de ligação (-5,4 kcal/Mol) e o FS35 quando ligado a Topoisomerase tipo I, -6,5 kcal/Mol. A enzima que apresentou os valores mais negativos de energia de ligação foi C14-desmetilase. Os resultados com as enzimas de *L. infantum chagasi* (tabela 11) destacam-se os compostos FS10, FS44 e FS49, com os menores valores de energia de ligação, -6; -5,1 e -5,8 kcal/Mol respectivamente. Já os compostos FS66 e FS35 apresentaram os valores mais negativos de energia de ligação -11,7 e -12,2 kcal/Mol respectivamente quando ligadas à Glicose-6-fosfato desidrogenase, e o FS54 (-11,1 kcal/Mol) ligada à Topoisomerase do tipo I.

Tabela 9 - Resultados do docking em SWISSDOCK dos derivados de triazóis com *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*

<i>L. amazonensis</i>					<i>L. infantum chagasi</i>			
Enzima/Composto	Topoisomerase I	Topoisomerase II	Glicose-6-fosfato desidrogenase	Lanosterol C14-desmetilase	Topoisomerase I	Topoisomerase II	Glicose-6-fosfato desidrogenase	Lanosterol C14-desmetilase
FS10	-	-	-	-	-8,6	-6,2	-6	-9,7
FS28	-7,3	-7,8	-6,3	-9,5	-8,9	-7,8	-8,3	-9,5
FS32	-7,6	-9,1	-6,2	-8,8	-8,2	-9,7	-6,2	-8,8
FS33	-8,5	-8,2	-11,9	-7,9	-	-	-	-
FS41	-6,6	-7,7	-6,8	-8,2	-	-	-	-
FS42	-6,5	-9,2	-5,4	-8,8	-	-	-	-
FS44	-6,9	-8,4	-6,9	-8,8	-8,6	-7,7	-5,1	-8,8
FS49	-	-	-	-	-9,2	-7,4	-5,8	-8,9
FS53	-	-	-	-	-8,2	-9,7	-8,6	-8,4
FS71	-7,5	-7,8	-7,8	-9	-8,8	-8,3	-6	-9
FS65	-	-	-	-	-8	-7,9	-6,5	-7,2
FS66	-	-	-	-	-8,5	-7,9	-11,7	-7,7
FS54	-	-	-	-	-11,1	-8,9	-9,6	-10,5
FS14	-11,3	-8,5	-6,4	-9,3	-	-	-	-
FS35	-6,5	-10,9	-9,1	-9,6	-8	-9,5	-12,2	-9,6

Fonte: do Autor

Legenda: Valores em Kcal/Mol. Compostos com “-” não foi realizado o docking.

## 7 DISCUSSÃO

As Leishmanioses são doenças parasitárias endêmicas em vários países do mundo, inclusive no Brasil (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003), causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania* (MAJI *et al.*, 2018). Constituem em um problema de saúde pública no país devido à alta toxicidade dos medicamentos que são utilizados para o tratamento (BADIRZADEH *et al.*, 2020). No presente trabalho, foram testados alguns compostos derivados de triazóis quanto a atividade leishmanicida em duas espécies de *Leishmania*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum chagasi*. Os triazóis são compostos antifúngicos (BRAGA, 2019), conhecidos por sua baixa toxicidade (FRANÇA *et al.*, 2014; MARTINS-DUARTE *et al.*, 2010), e vem sendo estudados quanto à atividade em *Leishmania* (DE SOUZA *et al.*, 2020; SALAS *et al.*, 2017).

Os ensaios de toxicidade realizados em macrófagos murinos obtiveram resultados que corroboram com a baixa toxicidade, sendo possível observar que a maioria dos compostos foram menos tóxicos que ANB, os compostos FS33, FS41 e FS54 foram os melhores avaliados. Fato que pode estar relacionado ao fato de que compostos heterocíclicos contendo nitrogênio em suas estruturas podem ter importantes interações biológicas (BOZOROV; ZHAO; AISA, 2019).

Quanto aos ensaios de atividades dos compostos quanto as formas promastigotas, foi possível observar que em ambas espécies o período de incubação de 24h mostrou mais compostos ativos, podendo ser relacionado à metabolização e degradação molecular. Já quando comparando as atividades de 24h entre as espécies (tabela 1) *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi* é possível observar uma diferença dos compostos ativos, por exemplo FS33, FS41, FS42 e FS14 foram ativos apenas em *L. amazonensis* e os compostos FS10, FS49, FS53, FS65, FS66 e FS54 foram ativos apenas em *L. infantum chagasi*, estas diferenças estão relacionadas ao fato de serem espécies diferentes (ESCOBAR *et al.*, 2002) sendo analisadas, com susceptibilidades diferentes à átomos presentes nos compostos.

Os compostos apresentaram em sua maioria CE<sub>50</sub> próximo ou menor que a ANB em ambas espécies, com exceção FS32 em *L. amazonensis* e FS35 em *L. infantum chagasi* que apresentaram concentrações acima dos demais. Entretanto, se observar na literatura, TEMRAZ *et al.*, (2018) realizou ensaio com triazóis em *L. major*

os EC<sub>50</sub> estavam na faixa de 0,1403-7,41 µM contra promastigotas e 1-6,46 µM e HOLANDA *et al.*, (2020) em ensaios com triazóis e suas atividades com *L. amazonensis* e *L. braziliensis* os IS para as formas promastigotas foram 13,94 e 5,4, mostrando que os derivados apresentados no estudo estão apresentando atividade aceitável diante dos resultados de outros autores. Os compostos melhores avaliados quanto à atividade antipromastigota em *L. amazonensis* foram FS33, FS41, FS14 e FS35 e em *L. infantum chagasi* foram FS44, FS71, FS66 e FS54. Dentre estes, os melhores incluindo os valores de CC<sub>50</sub> foram, FS33, FS41 e FS54.

O estudo realizado por BRAGA (2019) demonstrou que os valores de CE<sub>50</sub> de fármacos azólicos, como o Cetoconazol e Itraconazol são também relativamente baixos, isso indica que os compostos analisados neste estudo também são bem viáveis contra as formas amastigotas de ambas espécies. Apesar da maioria dos compostos não apresentaram significância com a ANB em amastigota de *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi* eles apresentaram bons valores de CE<sub>50</sub> e de IS, o que indica que os compostos são ativos contra a forma amastigota desta espécie porém mantendo a sobrevivência dos macrófagos murinos (RODRIGUES *et al.*, 2019), corroborando com a literatura, que descreve e demonstra que os triazóis e seus derivados são compostos com baixa toxicidade às células de mamíferos (MEINEL *et al.*, 2020; SALAS *et al.*, 2017).

Mesmo o composto FS35 que é o mais tóxico em relação aos outros e à ANB (tabela 3), sendo um composto bem promissor para infecções em ambas formas com *L. amazonensis*. Entretanto, apesar de ser um composto bem ativo e com um ótimo IS, ele viola alguns parâmetros descritos por Lipinski (LIPINSKI, 2004) (tabela 6), não podendo assim, ser administrado oralmente em um possível ensaio *in vivo*, além disso não possui boa absorção gastrointestinal (tabela 5) e seu log Kp é bastante negativo, o que pode dificultar na utilização de cremes ou géis nas lesões na pele, sendo possível um desenvolvimento de um análogo deste composto para que seja possível sua administração por via oral, ou que possa ser usado utopicamente nas lesões cutâneas. Já o composto FS28 também apresenta ótimos valores de CE<sub>50</sub> e IS sendo o melhor avaliado no contexto de atividade anti-amastigota, devido a sua boa atividade contra a espécie e manutenção da viabilidade dos macrófagos. Sendo também um dos compostos mais bem avaliados nos parâmetros farmacológicos possuindo alta

absorção gastrointestinal e não inibindo a atividade da maioria das enzimas hepáticas estudadas, além de não violar as regras de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 2001).

O composto FS53 foi o melhor avaliado quanto a atividade contra *L. infantum chagasi* sendo também o que melhor mantém a vitalidade dos macrófagos murinos (HOLANDA *et al.*, 2020), possuindo também alta absorção gastrointestinal, não violando as regras de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 2001), porém há inibição de ao menos três das cinco enzimas hepáticas estudadas, o que pode implicar em efeitos colaterais indesejados (YIM *et al.*, 2020).

Os outros compostos que são ativos contra as formas promastigotas (tabela 2) apresentam altos valores de IS-PRO, resultados que vão ao encontro dos valores de IS-AMA dos derivados analisados, o que indica que os compostos são altamente ativos contra o parasito e são capazes de manter a viabilidade das células murinas, demonstrando também que os mesmos são promissores no tratamento de Leishmaniose.

Os tripanossomatídeos, incluindo as leishmanias possuem apenas uma mitocôndria (ESPURI *et al.*, 2019), e esta única mitocôndria está relacionada ao balanço oxirredução e programação de morte celular (DUCHEN, 2000), além de ser responsável pela liberação de EROs, o que inclui peróxido de Hidrogênio (WILKINSON *et al.*, 2000). O peróxido é uma substância que induz a produção de radicais hidroxila (LIAO *et al.*, 2020), sendo uma consequência inevitável do vazamento de elétrons (HALLIWELL, 2006).

Por isso, analisar a liberação de peróxido de Hidrogênio pela mitocôndria de *Leishmania* pode demonstrar um possível mecanismo de ação de algum composto candidato a fármaco. A presença de um grande número de radicais livres potencialmente causa rápido aumento nos níveis de EROs (LIAO *et al.*, 2020) induzindo um estresse oxidativo, levando à morte celular por apoptose. Caso que pode ser associado ao composto FS33 em *L. amazonensis* que apresentou grande aumento na liberação de peróxido de Hidrogênio, indicando que este composto sinaliza o aumento das enzimas antioxidantes (PELOSO *et al.*, 2012), composto que apresenta 2,71 µg/mL de CE<sub>50</sub>, sendo bem ativo contra as formas promastigotas, sendo assim a indução do aumento da liberação de peróxido de Hidrogênio pode ser o mecanismo de ação deste composto.

Os demais compostos analisados, tanto em *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi* apresentaram uma diminuição da liberação de peróxido, fato este que pode estar relacionado com um aumento do consumo de oxigênio pela mitocôndria, indicando uma diminuição do vazamento de elétrons (BARROS *et al.*, 2004), diminuindo a produção de EROs. Outra explicação para esta diminuição da produção de peróxido é uma possível diminuição da expressão das enzimas antioxidantes (PELOSO *et al.*, 2012). Entretanto, a liberação de peróxido pode não ser o mecanismo de ação dos demais compostos analisados (FS34, FS54 e FS17), pois eles mantêm a integridade da mitocôndria (LIAO *et al.*, 2020), assim, a manutenção da integridade da mitocôndria é fundamental para a sobrevivência do parasita (ESPURI *et al.*, 2019).

As previsões ADME realizada através de modelos computacionais tem sido uma alternativa válida especialmente em etapas iniciais de experimentação (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017), dentre os parâmetros analisados, foi observada que a maioria dos compostos ativos em promastigota possuem alta absorção gastrointestinal, indicando que os compostos podem ser facilmente absorvidos pelo intestino em possíveis ensaios *in vivo* com administração por via oral dos mesmos, sendo possível prever que o composto possa penetrar na corrente sanguínea através das vilosidades presentes nas células intestinais.

A permeabilidade glicoproteica está relacionada aos transportes de ligação de ATP, sendo a chave para avaliar o efluxo ativo através das membranas biológicas (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017), muitos compostos tem ação inibitória de P-gp, o que pode indicar um possível acúmulo de metabolitos no interior da célula e uma possível passagem dos compostos através na barreira hematoencefálica (MIYAMA *et al.*, 1998), uma vez que P-gp está diretamente relacionado a passagem pela barreira. Além disso, a P-gp também se associa às proteínas do citocromo, para melhorar a proteção de tecidos e organismos (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Os valores de permeabilidade na pele são mais positivos do que os fármacos controle também avaliados, ANB e GLU e os valores de Kp indicam que quanto mais negativo, menor é a permeabilidade na pele de um composto (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Dando a possibilidade que algum dos compostos sejam bem ativos se em contato com as lesões de leishmaniose cutânea, na forma de gel, creme ou pomada, e os compostos já destacados quanto ao CC<sub>50</sub> e CE<sub>50</sub> o composto FS33 pode ser uma boa alternativa.

A análise sobre a inibição de proteínas da família do Citocromo P450 está relacionada à metabolização dos compostos em fase I (MILLECAM *et al.*, 2018). A maioria dos medicamentos é metabolizada pelo citocromo P450 (YIM *et al.*, 2020). Estas proteínas analisadas catalisam muitas reações bioquímicas importantes e estão relacionadas à metabolização de xenobióticos em organismos (DE ARRUDA *et al.*, 2020). Estas enzimas estão localizadas no retículo endoplasmático liso das células do fígado e são responsáveis por metabolizar até 80% dos medicamentos (MILLECAM *et al.*, 2018). Os derivados triazólicos avaliados no presente estudo inibem a ação de algumas destas enzimas, o que pode gerar algum acúmulo de metabolitos no organismo.

A inibição dessas isoenzimas é certamente uma das principais causas de interações medicamentosas relacionadas à farmacocinética, podendo causar interações medicamento-medimento ou alimento-medimento (YIM *et al.*, 2020), o que pode levar a efeitos tóxicos ou indesejáveis devido à menor depuração e acúmulo do composto ou de alguns de seus metabolitos (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Esta inibição pode estar relacionada com a baixa citotoxicidade dos compostos, podendo deduzir que os compostos possam ter poucos efeitos colaterais em ensaios *in vivo*. Os fármacos controle GLU e ANB inibem todas as isoformas analisadas (HOLANDA *et al.*, 2020), estando relacionada aos efeitos tóxicos destes fármacos descritos na literatura.

Dentre a avaliação quanto as regras de Lipinski, os compostos não apresentaram violações, com exceção de FS35 e FS54, além dos fármacos controle, demonstrando que esta regra pode ser levada em conta e podemos elucidar que os compostos que não apresentam violações podem sim ser administrados por via oral, entretanto estes compostos são ativos contra ambas formas evolutivas do parasito em *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*, respectivamente apresentando altos valores de IS (tabelas 2 e 4), podendo também ser promissores no tratamento de Leishmaniose, sendo administrado de maneira injetável, do mesmo modo que os fármacos já utilizados.

Outro ponto importante avaliado nesta parte dos estudos *in silico* é a solubilidade em água dos compostos. Um parâmetro importante, pois devido à alta interação com o epitélio gastrointestinal já observado na tabela 6, e os compostos



serem considerados pouco ou moderadamente solúveis em água mostram que os compostos podem sim ser bem absorvidos pelas células intestinais, demonstrando mais uma vez que os compostos podem ser administrados por via oral, uma vez que uma molécula solúvel facilita muito as atividades de desenvolvimento de novos fármacos, principalmente manuseio e formulação, além disso a solubilidade é uma propriedade importante que influencia a absorção de um composto (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

As interações proteínas-peptídeos são essenciais em vários processos biológicos (AGRAWAL *et al.*, 2019), pensando nisso a utilização de softwares para auxiliar nas previsões destas interações foi introduzida para explicar a especificidade de uma enzima (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011). Assim, ao encaixar um mesmo composto em vários alvos proteicos auxilia na pesquisa sobre mecanismos moleculares (CAI *et al.*, 2006), permitindo classificar moléculas de acordo com a complementaridade estrutural e eletrônica dos ligantes em um determinado alvo (KITCHEN *et al.*, 2004).

Os triazóis tem maior afinidade com a proteína Piruvato Lanosterol C14-desmetilase (DE MACEDO-SILVA *et al.*, 2013) enzima importante na síntese do ergosterol de membrana (URBINA, 2002), tanto de fungos quanto de Tripanossomatídeos (URBINA, 2009). As Topoisomerases são proteínas que estão envolvidas na replicação de DNA (VELÁSQUEZ *et al.*, 2017), e a Topoisomerase tipo I de *Leishmania* é estruturalmente diferente do que a Topoisomerase I de humanos (GUTIÉRREZ-CORBO *et al.*, 2019). A Topoisomerase de tipo II também está envolvida na replicação de DNA, mas especificamente na indução do corte da fita dupla (RAJ *et al.*, 2020). A Glicose-6-fosfato desidrogenase é uma enzima importante da via glicolítica (GOMES *et al.*, 2021) tanto de *Leishmania* quanto de mamíferos (RAJ *et al.*, 2020). Nos tripanossomatídeos as enzimas da via glicolítica ficam compactadas em um glicossomo desempenhando papel importante na via glicolítica, incluindo a glicólise (RAJ *et al.*, 2020) via a qual essa enzima está inserida (GOMES *et al.*, 2021).

Comparando com o docking regular, o cego é menos confiável e estável, pois o espaço de encaixe para o docking geralmente é muito grande para amostrar suficientemente usando um número limitado de pesquisas aleatórias, pois utiliza de toda superfície da proteína (LIU *et al.*, 2020). No entanto, o docking cego é particularmente valioso para descobrir interações inesperadas que podem ocorrer em

modos de ligação não identificados (IORGA *et al.*, 2006). Entretanto, atualmente, muitas ferramentas de detecção de sítio de ligação foram desenvolvidas (LIU *et al.*, 2020).

Os resultados do docking cego nos dá a energia de ligação entre as enzimas e os compostos, quanto menor for esta energia, melhor e mais estável é o composto analisado (BARROS, 2015), assim os derivados analisados podem ter ação nas enzimas estudadas devido à baixa energia de ligação apresentada na maioria dos compostos, com exceção de FS35 em ambas espécies e FS54 em *L. infantum chagasi*, dando destaque para as energias de ligação dos mesmos com a enzima Piruvato Lanosterol C-14 desmetilase. Mesmo outros compostos como FS28, FS14, FS53 e FS32 apresentem baixa energia de ligação em relação com os outros valores obtidos, não é possível inferir que há uma real inibição dos mesmos com as enzimas Topoisomerase I e II e assim poder supor o mecanismo de ação dos compostos, pois será necessária a realização do docking molecular em outro programa cujo método de obtenção das energias seja distinto do que o utilizado neste teste, que também serão utilizados os aminoácidos que fazem parte do sítio ativo da enzima, obtendo assim um resultado mais confiável para o docking molecular.

A plataforma SWISSDOCK aborda limitações como configuração de estrutura e busca conformacional, preparando automaticamente a enzima e o ligante para que ocorra o docking molecular (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011), analisando o resultado deste docking, é possível analisar que alguns compostos possuem baixas energias de ligação (kcal/Mol), podendo indicar um possível mecanismo de ação de FS44 e FS49 quando ligados à Glicose-6-fosfato desidrogenase em *L. infantum chagasi*, fato que pode ter verificação apenas com o derivado FS49 no docking cego. O composto FS32 quando ligado a mesma enzima porém de *L. amazonensis* obteve pouca variação de energia de ligação entre os docking, podendo assim inferir um possível mecanismo de ação. Os derivados com os maiores valores de energia de ligação foram FS35 em *L. amazonensis* e FS53 e FS54 em *L. infantum chagasi*, em ambos docking a enzima C14-desmetilase apresentou os maiores valores de energia de ligação principalmente em *L. infantum chagasi*.

Assim, ao comparar os resultados dos dois docking molecular, é possível inferir que o mecanismo de ação dos compostos FS44 e FS49 possa ser através da inibição da enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase em *L. infantum chagasi* e FS32 em *L.*

*amazonensis*, porém é necessário a realização de docking moleculares com outras enzimas das vias já estudadas a fim de verificar se alguma poderá possuir energias de ligação menores do que as observadas.

Os aminoácidos de resíduos de cadeia apresentam diferenças sutis na maioria das enzimas, indicando semelhança entre as espécies, estando relacionado com o fato das duas espécies de *Leishmania* estão classificadas no mesmo subgênero (LAINSON, 2010b) (anexo 1).

Analisando os resultados o composto mais promissor considerando a atividade antiamastigota em *L. amazonensis* é o FS28, pois tem o menor valor de CE<sub>50</sub> e o maior IS, além disso é um composto que pode ser administrado oralmente pois não viola as regras estabelecidas por Lipinski. É também um dos compostos que inibe menos ação de enzimas hepáticas, além de ser bem absorvido pelo epitélio gastrointestinal. O composto FS35 em infecções por *L. amazonensis* também é bem ativo contra as amastigotas, apesar de violar as regras de Lipinski e não poder ser administrados oralmente, pode ser com composto promissor para o desenvolvimento de alguma pomada ou gel para uso utópico nas lesões cutâneas.

Em *L. infantum chagasi* o composto mais promissor é o FS53, sendo este também passível de administração por via oral com alta absorção gastrointestinal e sendo pouco solúvel em água. Entretanto, pode ser um composto que gere alguns efeitos colaterais pois inibe as três enzimas hepáticas das estudadas, outros possíveis compostos promissores serão avaliados com experimentos futuros.

É provável que o mecanismo de ação de três dos compostos analisados nos docking molecular, FS32, FS44 e FS49 seja a inibição da enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observando os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que os compostos derivados de triazóis avaliados no estudo possuem atividades consideráveis contra as formas promastigotas e amastigotas de ambas espécies analisadas, mostrando também bons valores de concentrações efetivas e se mostrando pouco tóxicos contra macrófagos murinos.

As previsões ADME e Lipinski demonstraram que os compostos podem ser ativos quando administrados oralmente em ensaios *in vivo*. Dentre todos os compostos avaliados, o FS33, FS41 e FS44 até o presente momento são os mais promissores, se considerar as atividades em promastigota e amastigota, além das previsões ADME. Em três compostos é possível inferir o mecanismo de ação, FS32, FS44 e FS49.

Mesmos os dois compostos que violam as regras de Lipinski FS35 e FS54 podem também ser promissores no tratamento sendo administrados de maneira injetável em possíveis ensaios *in vivo*.

## 9 ETAPAS FUTURAS

- Experimentos nas formas amastigota de *L. chagasi*;
- Realizar os experimentos de potencial de membrana mitocondrial e permeabilidade de membrana plasmática;
- Avaliar a liberação de Óxido Nítrico pelos Macrófagos

## REFERÊNCIAS

-H. ZHOU, C.; WANG, Y. Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. **Current medicinal chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 239–280, 16 out. 2012.

**Agência Fiocruz de Notícias**. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doencas-negligenciadas>, Brasil. Acesso em: 25 jun. 2020.

AHMAD, K. *et al.* Role of Azoles in Cancer Prevention and Treatment: Present and Future Perspectives. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 46–56, 2018.

AL-ABDELY, H. M. *et al.* Efficacy of the triazole SCH 56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v. 43, n. 12, p. 2910–2914, 1999.

ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **Journal of immunology**, Baltimore, Md. : 1950, v. 161, n. 12, p. 6794–801, 1998.

ALIANÇA, A. S. DOS S. *et al.* In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 105, p. 1–10, 2017.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. *et al.* Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 853–882, dez. 2003.

ALVAR, J. *et al.* The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 334, abr. 2008.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 35671, 31 maio 2012.

ANIGHORO, A.; BAJORATH, J.; RASTELLI, G. Polypharmacology : Challenges and Opportunities in Drug Discovery Department of Life Science Informatics , B-IT , LIMES Program Unit Chemical Biology and Medicinal. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 57, n. 19, p. 7874–7887, 2014.

ANVIKAR, A. R. *et al.* In vitro assessment of drug resistance in *Plasmodium falciparum* in five States of India. **The Indian Journal of Medical Research**, [s. l.], v. 135, n. 4, p. 494, abr. 2012.

ARAÚJO, M. V. *et al.* Flavonoids induce cell death in: *Leishmania amazonensis*: In vitro characterization by flow cytometry and Raman spectroscopy. **Analyst**, [s. l.], v.

144, n. 17, p. 5232–5244, 2019.

AYATI, A.; EMAMI, S.; FOROUMADI, A. The importance of triazole scaffold in the development of anticonvulsant agents. **European journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 109, p. 380–392, 15 fev. 2016.

BADIRZADEH, A. *et al.* Antileishmanial activity of *Urtica dioica* extract against zoonotic cutaneous leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. e0007843, 2020.

BAKUNOV, S. A. *et al.* Synthesis and antiprotozoal activity of cationic 1,4-diphenyl-1H-1,2,3- triazoles. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 254–272, 2010.

BALARDIN, R. **Fungicidas sistêmicos: benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas | Materiais Técnicos | Elevagro**. Disponível em: <https://elevagro.com/materiais-didaticos/fungicidas-sistemicos-benzimidazois-triazois-e-estrobilurinas/>. [s. l.], Acesso em: 25 maio. 2020.

BARROS, M. E. DE S. B. Estudo de Docking Molecular, Síntese e Atividade Biológica de Análogos da (-)-Massoialactona e da Combretastatina A-4. **Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco**, Pernambuco. p. 129, 2015.

BARROS, M. H. *et al.* Higher Respiratory Activity Decreases Mitochondrial Reactive Oxygen Release and Increases Life Span in *Saccharomyces cerevisiae*\*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 48, p. 49883–49888, 26 nov. 2004.

BART, G. *et al.* Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. **Molecular and biochemical parasitology**. México v. 88, n. 1–2, p. 53–61, set. 1997.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades Em Fármacos Antifúngicos: Uma Revisão. **Visão Acadêmica**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 159–172, 2004.

BERMAN, J. Liposomal Amphotericin B Treatment and the Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 101, n. 4, p. 727, 2019.

BERMAN, J. D. In vitro susceptibility of antimony-resistant *Leishmania* to alternative drugs. **The Journal of infectious diseases**, [s. l.], v. 145, n. 2, p. 279, 1982.

BERMAN, J. D. *et al.* Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes in murine macrophage tumor cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**. México. v. 20, n. 1, p. 85–92, jul. 1986.

BIRBEN, E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.

BORGES DE LIMA, E. *et al.* **Educação Médica Continuada Tratamento da**

**Leishmaniose Tegumentar Americana \* Treatment of American cutaneous leishmaniasis \*An Bras Dermatol.** [s.l: s.n.].

BOSCH-NICOLAU, P. *et al.* A case report of long treatment with Itraconazole in a patient with chronic Chagas disease. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 9–11, 2019.

BOWIE, J. U.; LÜTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**. New York, N.Y. v. 253, n. 5016, p. 164–170, 1991.

BOZOROV, K.; ZHAO, J.; AISA, H. A. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 27, n. 16, p. 3511–3531, 2019.

BRAGA, S. S. Multi-target drugs active against leishmaniasis: A paradigm of drug repurposing. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 183, p. 111660, 2019.

BRAGA<sup>1</sup>, V. L. L. *et al.* **Uso clínico de miltefosina para tratamento de Leishmaniose Tegumentar: uma revisão sistemática.** [s.l: s.n.].

BRAJTBURG, J. *et al.* MINIREVIEW Amphotericin B: Delivery Systemst. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 381–384, 1990.

BRANDÃO, G. C. *et al.* Antimalarial naphthoquinones. Synthesis via click chemistry, in vitro activity, docking to PfDHODH and SAR of lapachol-based compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 145, n. 2018, p. 191–205, 2018.

BRAY, P. G. *et al.* Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: Past, present and future. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 232–239, 2003.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, [s. l.], v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 29, n. 3–4, p. 222–230, 2000.

CADENAS, S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1859, n. 9, p. 940–950, 2018.

CHACÓN-VARGAS, K. F. *et al.* Isopropyl quinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide derivatives induce regulated necrosis-like cell death on Leishmania (Leishmania) mexicana. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 117, n. 1, p. 45–58, 2018.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 167, 2010.



CHU, X. M. *et al.* Triazole derivatives and their antiplasmodial and antimalarial activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 166, p. 206–223, 2019.

CLÉMENCEAU, B. *et al.* Microchimerism and transmission of porcine endogenous retrovirus from a pig cell line or specific pathogen-free pig islets to mouse tissues and human cells during xenografts in nude mice. **Diabetologia**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 914–923, 2002.

COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, [s. l.], v. 2, n. 9, p. 1511, 1993.

COLQUITT, R. B.; COLQUHOUN, D. A.; THIELE, R. H. In silico modelling of physiologic systems. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 499–510, 2011.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 111, jan. 2006.

DA CÂMARA ROCHA, J. *et al.* Biological activity of Morita-Baylis-Hillman adduct homodimers in *L. infantum* and *L. amazonensis*: anti-Leishmania activity and cytotoxicity. **Parasitology Research**, Brasil v. 118, n. 10, p. 3067–3076, 2019.

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**, [s. l.] v. 7, n. October 2016, p. 1–13, 2017.

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

DE ARRUDA, C. C. P. *et al.* A triazole hybrid of neolignans as a potential antileishmanial agent by triggering mitochondrial dysfunction. **Molecules**, Brasil. v. 25, n. 1, 2020.

DE MACEDO-SILVA, S. T. *et al.* In vitro activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, Brasil. v. 8, n. 12, 2013.

DE SOUZA LEO, S. *et al.* Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **Journal of cell science**, França. v. 108 ( Pt 1, n. 10, p. 3219–3231, 1995.

DE SOUZA, T. B. *et al.* Synthesis, activity, and molecular modeling studies of 1,2,3-triazole derivatives from natural phenylpropanoids as new trypanocidal agents. **Chemical Biology and Drug Design**, [s. l.] v. 95, n. 1, p. 124–129, 2020.

DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.] v. 71, p. 30–54, 1 abr. 2017.

DIAZ-GUERRA, T. M. *et al.* A Point Mutation in the 14 $\alpha$ -Sterol Demethylase Gene *cyp51A* Contributes to Itraconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Espanha. v. 47, n. 3, p. 1120, 3 mar. 2003.

DICKSON, R. C.; SUMANASEKERA, C.; LESTER, R. L. Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Progress in Lipid Research**, [s. l.] v. 45, n. 6, p. 447–465, nov. 2006.

DIEKEMA, D. J. *et al.* Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. **Journal of clinical microbiology**, Estados Unidos. v. 41, n. 8, p. 3623–3626, 1 ago. 2003.

DIRO, E. *et al.* Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in East Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.] v. 8, n. 6, 2014.

DONDORP, A. M. *et al.* Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. **The New England journal of medicine**, [s. l.] v. 361, n. 5, p. 455, 30 jul. 2009.

DOS SANTOS NOGUEIRA, F. *et al.* Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, Brasil. v. 12, n. 1, 8 fev. 2019.

DUCHEN, M. R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. **The Journal of Physiology**, [s. l.] v. 529, n. Pt 1, p. 57, 15 nov. 2000.

EGOROVA, K. S.; GORDEEV, E. G.; ANANIKOV, V. P. Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceuticals and Medicine. **Chemical Reviews**, [s. l.] v. 117, n. 10, p. 7132–7189, 2017.

EL-SAGHIER, A. M. *et al.* Green synthesis, antileishmanial activity evaluation, and in silico studies of new amino acid-coupled 1,2,4-triazoles. **Medicinal Chemistry Research**, [s. l.] v. 28, n. 2, p. 169–181, 2019.

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

ESCOBAR, P. *et al.* Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Tropica**, [s. l.] v. 81, n. 2, p. 151–157, 2002.

ESPURI, P. F. *et al.* Synthesis and evaluation of the antileishmanial activity of silver compounds containing imidazolidine-2-thione. **Journal of Biological Inorganic**

**Chemistry**, Brasil. v. 24, n. 3, p. 419–432, 2019.

EUE, I.; ZEISIG, R.; ARNDT, D. Alkylphosphocholine-induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor  $\alpha$  by U 937 cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [s. l.] v. 121, n. 6, p. 350–356, 1995.

FERA, M. T.; SARRO, A. DE. New triazoles and echinocandins : mode of action , in vitro activity and mechanisms of resistance. [s. l.] p. 981–998, 2009.

FILEMON, P. *et al.* **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular A Interação do Protozoário Leishmania com seus Insetos Vetores**. [s.l: s.n.].

FIOCRUZ. **As Leishmanioses - FIOCRUZ**. Disponível em: [http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/classifica\\_\\_o\\_das\\_esp\\_cie\\_s.htm](http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/classifica__o_das_esp_cie_s.htm). Brasil Acesso em: 31 jul. 2020.

FRANÇA, R. R. F. *et al.* Artigo Inibidores Potentes da Enzima Esterol 14 $\alpha$  -desmetilase Contra Trypanosoma cruzi Potent Inhibitors of the Enzyme Sterol 14  $\alpha$  -demethylase Against Trypanosoma cruzi Inibidores Potentes da Enzima Esterol 14 $\alpha$  -desmetilase Contra Trypanosoma cruzi. [s. l.] v. 6, n. 5, p. 1483–1516, 2014.

FREITAS-JUNIOR, L. H. *et al.* Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology, Drugs and Drug Resistance**, [s. l.] v. 2, p. 11, dez. 2012.

FROMTLING, R. A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.] v. 1, n. 2, p. 187, 1988.

G RWILLIANS, B. C. **THE RESPIRATORY CHAIN AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION**. volume 17 ed. Philadelphia, Pennsylvania: Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, [s. l.] 1956.

GABRIEL, Á. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. **Journal of Immunology Research**, Lisboa. v. 2019, 2019.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, Karaj. v. 12, p. 25, 2018.

GOAD, L. J.; HOLZ, G. G.; BEACH, D. H. Sterols of ketoconazole-inhibited *Leishmania mexicana mexicana* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.] v. 15, n. 3, p. 257–279, 1985.

GODINHO, J. L. P. *et al.* Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice. **International journal of antimicrobial agents**, Brasil v. 39, n. 4, p. 326–331, abr. 2012.

GOMES, M. T. *et al.* 3-Bromopyruvate: A new strategy for inhibition of glycolytic

enzymes in *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, [s. l.] v. 229, n. November 2020, 2021.

GONÇALVES, G. *et al.* Increased *Leishmania infantum* resistance to miltefosine and amphotericin B after treatment of a dog with miltefosine and allopurinol. **Parasites & Vectors**, [s. l.] v. 14, n. 1, p. 599, 9 dez. 2021.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. DE L. R. Leishmaniose tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.] v. 36, n. 1, p. 71–80, jan. 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [s. l.] v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

GONTIJO, V. S. *et al.* Leishmanicidal, antiproteolytic, and mutagenic evaluation of alkyltriazoles and alkylphosphocholines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Brasil. v. 101, p. 24–33, 2015.

GRANT, G. J.; BANSINATH, M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, [s. l.] v. 26, n. 1, p. 61–63, 2001.

GRAZZIA, N. *et al.* Dihydroartemisinin, an active metabolite of artemisinin, interferes with *Leishmania braziliensis* mitochondrial bioenergetics and survival. **Parasitology Research**, [s. l.] v. 120, n. 2, p. 705–713, 2021.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [s. l.] v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: Aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avancados**, [s. l.] v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

GUTIÉRREZ-CORBO, C. *et al.* Topoisomerase IB poisons induce histone H2A phosphorylation as a response to DNA damage in *Leishmania infantum*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, Espanha. v. 11, p. 39, 1 dez. 2019.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, Singapura. v. 141, n. 2, p. 312, 2006.

HARAYAMA, T.; RIEZMAN, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. **Nature Publishing Group**, Geneva. v. 19, 2018.

HAWTHORN, A. *et al.* Peripheral Intravenous Catheter Protection : **British Journal of Nursing**, [s. l.] v. 30, n. February, p. 28, 2018.

HEADLEY, S. A. *et al.* Immunohistochemical characterization of cutaneous leishmaniasis in cats from Central-west Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional**

**Studies and Reports**, [s. l.] v. 17, n. April, p. 100290, 2019.

HEIN, C. D.; LIU, X. M.; WANG, D. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. **Pharmaceutical research**, [s. l.] v. 25, n. 10, p. 2216–2230, out. 2008.

HOLANDA, V. N. *et al.* Antileishmanial activity of 4-phenyl-1-[2-(phthalimido-2-yl)ethyl]-1H-1,2,3-triazole (PT4) derivative on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*: In silico ADMET, in vitro activity, docking and molecular dynamic simulations. **Bioorganic Chemistry**, Recife. v. 105, p. 104437, 2020.

INACIO, J. D. F. *et al.* The Effect of (-)-Epigallocatechin 3-O - Gallate In Vitro and In Vivo in *Leishmania braziliensis*: Involvement of Reactive Oxygen Species as a Mechanism of Action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.] v. 8, n. 8, 2014.

IORGA, B. *et al.* Acetylcholine nicotinic receptors: Finding the putative binding site of allosteric modulators using the “blind docking” approach. **Journal of Molecular Modeling**, [s. l.] v. 12, n. 3, p. 366–372, 2006.

IRANPOUR, S.; HOSSEINZADEH, A.; ALIPOUR, A. Efficacy of miltefosine compared with glucantime for the treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. **Epidemiology and health**, [s. l.] v. 41, p. e2019011, 2019.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, [s. l.] v. 18, n. 23–24, p. 1272–1281, 2013.

JENNER, P. *et al.* Oxidative stress in Parkinson's disease. **Annals of neurology**, [s. l.] v. 53 Suppl 3, n. SUPPL. 3, 1 abr. 2003.

JHA, T. K. *et al.* Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **The New England journal of medicine**, [s. l.] v. 341, n. 24, p. 1795–1800, 9 dez. 1999.

JHINGRAN, A. *et al.* Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular and biochemical parasitology**, [s. l.] v. 164, n. 2, p. 111, abr. 2009.

JOSHI, D. C.; BAKOWSKA, J. C. Determination of Mitochondrial Membrane Potential and Reactive Oxygen Species in Live Rat Cortical Neurons. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.] v. 14, n. 51, p. 19–23, 23 maio 2011.

KÄLLBERG, M. *et al.* Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. **Nature protocols**, Chicago, Illinois. v. 7, n. 8, p. 1511, ago. 2012.

KEIGHOBADI, M. *et al.* Repurposing azole antifungals into antileishmanials: Novel 3-triazolylflavanones with promising in vitro antileishmanial activity against *Leishmania major*. **Parasitology International**, Iran. v. 69, n. November 2017, p. 103–109, 2019.

KELLEY, L. A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols** 2015 10:6, Londres, UK. v. 10, n. 6, p. 845–858, 7 maio 2015.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, [s. l.] v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KHALIL, E. A. G. *et al.* Safety and Efficacy of Single Dose versus Multiple Doses of AmBisome® for Treatment of Visceral Leishmaniasis in Eastern Africa: A Randomised Trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.] v. 8, n. 1, p. 21, 2014.

KITCHEN, D. B. *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.] v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [s. l.] v. 1, n. 2, p. 13–32, jun. 2010a.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [s. l.] v. 1, n. 2, p. 13–32, jun. 2010b.

LANFRANCO, M. F. *et al.* Expression and substrate specificity of a recombinant cysteine proteinase B of Leishmania braziliensis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.] v. 161, n. 2, p. 91–100, 2008.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, [s. l.] v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.

LAZARIN-BIDÓIA, D. *et al.* Dibenzylideneacetones Are Potent Trypanocidal Compounds That Affect the Trypanosoma cruzi Redox System. [s. l.] 2016.

LE FICHOUX, Y. *et al.* Short- and Long-Term Efficacy of Hexadecylphosphocholine against Established Leishmania infantum Infection in BALB/c Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.] v. 42, n. 3, p. 654, 1998.

LEPESHEVA, G. I.; FRIGGERI, L.; WATERMAN, M. R. **CYP51 as drug targets for fungi and protozoan parasites: Past, present and future** *Parasitology* Cambridge University Press, , 1 dez. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6185833/>. [s. l.] Acesso em: 25 maio. 2021

LIAO, L. *et al.* Synthesis and biological evaluation of 1,2,4-triazole derivatives as potential neuroprotectant against ischemic brain injury. **European Journal of Medicinal Chemistry**, China. v. 190, p. 112114, 2020.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in Advanced Drug Delivery Reviews 23 (1997) . **Advanced Drug Delivery Reviews**, Estados

Unidos. v. 46, n. 1–3, p. 3–26, mar. 2001.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, Estados Unidos. v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004.

LIRA, R. *et al.* Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. **Journal of Infectious Diseases**, Estados Unidos. v. 180, n. 2, p. 564–567, 1999.

LIU, Y. *et al.* CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein–ligand blind docking. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s. l.] v. 41, n. 1, p. 138–144, 2020.

LUAN, T. *et al.* Synthesis and biological evaluation of ursolic acid derivatives bearing triazole moieties as potential anti-Toxoplasma gondii agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, China. v. 34, n. 1, p. 761–772, 2019.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, [s. l.] v. 356, n. 6364, p. 83–85, 1992.

MAAROUF, M. *et al.* Biochemical alterations in paromomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes. **Parasitology Research**, [s. l.] v. 83, n. 2, p. 198–202, 1997.

MACHADO-SILVA, A. *et al.* New perspectives for leishmaniasis chemotherapy over current anti-leishmanial drugs: A patent landscape. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, Minas Gerais. v. 25, n. 3, p. 247–260, 2015.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.] v. 10, n. SUPPL. 1, p. 1–10, 2004.

MAHMOUDZADEH-NIKNAM, H.; MCKERROW, J. H. *Leishmania tropica*: Cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. **Experimental Parasitology**, Iran. v. 106, n. 3–4, p. 158–163, 2004.

MAJI, K. *et al.* Potential Antileishmanial Activity of a Triazole-Based Hybrid Peptide against *Leishmania major*. **ChemistrySelect**, [s. l.] v. 3, n. 36, p. 10220–10225, 2018.

MARTINEZ, R. An update on the use of antifungal agents. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasil. v. 32, n. 5, p. 449–460, 2006.

MARTINS-DUARTE, É. S. *et al.* *Toxoplasma gondii*: Fluconazole and itraconazole activity against toxoplasmosis in a murine model. **Experimental Parasitology**, Rio de Janeiro. v. 124, n. 4, p. 466–469, 2010.

MARTINS-DUARTE, É. S.; DE SOUZA, W.; VOMMARO, R. C. *Toxoplasma gondii*: The effect of fluconazole combined with sulfadiazine and pyrimethamine against acute toxoplasmosis in murine model. **Experimental Parasitology**, Brasil. v. 133, n. 3, p. 294–299, 2013.

MARTINS, F. T. *et al.* Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and

serine proteases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.] v. 44, n. 3, p. 1230–1239, 2009.

MARTINS, G. A. DE S.; LIMA, M. D. DE. Leishmaniose: do diagnóstico ao tratamento. **Enciclopédia Biosfera**, [s. l.] v. 9, n. September, p. 487–492, 2013.

MASOOD, M. M. *et al.* Anti-leishmanial and cytotoxic activities of amino acid-triazole hybrids: Synthesis, biological evaluation, molecular docking and in silico physico-chemical properties. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.] v. 27, n. 9, p. 1886–1891, 2017.

MCCALL, L. I. *et al.* Targeting Ergosterol Biosynthesis in *Leishmania donovani*: Essentiality of Sterol 14 $\alpha$ -demethylase. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.] v. 9, n. 3, p. 1–17, 2015.

MCKERROW, J. H. *et al.* Proteases in parasitic diseases. **Annual review of pathology**, [s. l.] v. 1, p. 497–536, 2006.

MCKERROW, J. H.; LIPINSKI, C. A. The rule of five should not impede anti-parasitic drug development. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, San Diego. v. 7, n. 2, p. 248, 1 ago. 2017.

MEINEL, R. S. *et al.* Novel functionalized 1,2,3-triazole derivatives exhibit antileishmanial activity, increase in total and mitochondrial-ROS and depolarization of mitochondrial membrane potential of *Leishmania amazonensis*. **Chemico-Biological Interactions**, Juiz de Fora v. 315, n. October 2019, p. 108850, 2020.

MICHALICK, M. S. M. Gênero *Leishmania*. In: **Parasitologia Humana**. [s.l.] David Pereira Neves, 2005.

MILLECAM, J. *et al.* The ontogeny of cytochrome P450 enzyme activity and protein abundance in conventional pigs in support of preclinical pediatric drug research. **Frontiers in Pharmacology**, Bélgica. v. 9, n. MAY, 14 maio 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico 2019**, Brasil. 2019. (Nota técnica).

MIYAMA, T. *et al.* P-glycoprotein-mediated transport of itraconazole across the blood-brain barrier. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.] v. 42, n. 7, p. 1738–1744, 1998.

MOKNI, M. Cutaneous leishmaniasis. **Annales de Dermatologie et de Venereologie**, [s.l.] v. 146, n. 3, p. 232–246, 2019.

MONTENEGRO, J. CUTANEOUS REACTION IN LEISHMANIASIS. **Archives of Dermatology and Syphilology**, [s.l.] v. 13, n. 2, p. 187–194, 1 fev. 1926.

MOREIRA, M. I. D. M. C. G. **Azóis: Farmacologia e Interações Medicamentosas**, Brasil. 2010. (Nota técnica).



MOTTRAM, J. C. *et al.* Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l.] v. 93, n. 12, p. 6008–6013, 1996.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, [s.l.] v. 417, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2009.

NEIS, A. **Introdução ao Docking Molecular**. Disponível em: <<https://medium.com/omixdata/introdução-ao-docking-molecular-7f60bedfae8b>> Brasil. Acesso em: 25 nov. 2021a.

NEIS, A. **Tutorial: Docking Molecular com o AutoDock Tools**. Disponível em: <<https://medium.com/omixdata/tutorial-docking-molecular-com-o-autodock-tools-cc285496af33>>. Brasil. Acesso em: 29 nov. 2021b.

NETO, R. A. B. **Terapia antifúngica**. Disponível em: <[http://www.medicinanet.com.br/conteudos/casos/2352/terapia\\_antifungica.htm](http://www.medicinanet.com.br/conteudos/casos/2352/terapia_antifungica.htm)> Brasil. Acesso em: 30 ago. 2020.

NOBRE, V. *et al.* Opportunistic infections in patients with AIDS admitted to an university hospital of the Southeast of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [s.l.] v. 45, n. 2, p. 69–74, 2003.

OPAS, O. **Informe Epidemiológico das Américas**, [s.l.] 2019. (Nota técnica).

OPAS, O. Situação epidemiológica Leishmaniose cutânea e mucosa. [s.l.] p. 10, 2021.

ORTEGA, V.; GIORGIO, S.; DE PAULA, E. Liposomal formulations in the pharmacological treatment of leishmaniasis: a review. **Journal of Liposome Research**, [s.l.] v. 27, n. 3, p. 234–248, 2017.

OSWALDO CRUZ, F.; DOUGLAS DE SOUZA MOREIRA BELO HORIZONTE, POR. Ministério da Saúde ANÁLISE FOSFOPROTEÔMICA E GENÔMICA FUNCIONAL DE LINHAGENS DE *Leishmania* spp. SENSÍVEIS E RESISTENTES AO ANTIMÔNIO TRIVALENTE. [s.l.] 2017.

PELOSO, E. F. *et al.* Tryparedoxin peroxidases and superoxide dismutases expression as well as ROS release are related to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes growth phases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Brasil. v. 520, n. 2, p. 117–122, 15 abr. 2012.

PEREIRA, I. O. *et al.* Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine**, Alfenas. v. 17, n. 5, p. 339–345, 1 abr. 2010.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery.

**International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.] v. 20, n. 18, 1 set. 2019.

PODEŠVOVÁ, L. *et al.* Suicidal leishmania. **Pathogens**, [s.l.] v. 9, n. 2, p. 1–12, 2020.

PONTIUS, J.; RICHELLE, J.; WODAK, S. J. Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. **Journal of molecular biology**, [s.l.] v. 264, n. 1, p. 121–136, 22 nov. 1996.

PRATTI, J. E. S. *et al.* The role of TLR9 on leishmania amazonensis infection and its influence on intranasal LaAg vaccine efficacy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Rio de Janeiro. v. 13, n. 2, p. 1–28, 2019.

RAHIM, F. An in silico development of selective inhibitor for histamine receptors. **Biotechnology**, [s.l.] v. 9, n. 2, p. 157–163, 2010.

RAJ, S. *et al.* An overview of biochemically characterized drug targets in metabolic pathways of Leishmania parasite. **Parasitology Research**, [s.l.] v. 119, n. 7, p. 2025–2037, 2020.

RANA, S. *et al.* CPDB: Cysteine protease annotation database in Leishmania species. **Integrative Biology**, Reino Unido. v. 4, n. 11, p. 1351–1357, 2012.

RIBEIRO, R. R. *et al.* Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, Brasil. v. 2018, n. CI, 2018.

RODRIGUES, M. P. *et al.* Synthesis of cinnamic acid derivatives and leishmanicidal activity against Leishmania braziliensis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Viçosa. v. 183, p. 111688, 2019.

RODRIGUEZ, F. *et al.* Development of thiophene compounds as potent chemotherapies for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania major. **Molecules**, [s.l.] v. 23, n. 7, p. 1–16, 2018.

ROMERO, A. H.; LÓPEZ, S. E. In silico molecular docking studies of new potential 4-phthalazinyl-hydrazones on selected Trypanosoma cruzi and Leishmania enzyme targets. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, [s.l.] v. 76, p. 313–329, 2017.

SAHU, A.; AGRAWAL, R. K.; PANDEY, R. K. Synthesis and systemic toxicity assessment of quinine-triazole scaffold with antiprotozoal potency. **Bioorganic Chemistry**, [s.l.] v. 88, p. 102939, 2019.

SAHU, S. *et al.* In silico ADMET study, docking, synthesis and antimalarial evaluation of thiazole-1,3,5-triazine derivatives as Pf-DHFR inhibitor. **Pharmacological Reports** [s.l.] v. 71, n. 5, p. 762–767, 2019.

SAKAMURU, S.; ATTENE-RAMOS, M. S.; XIA, M. Mitochondrial Membrane Potential Assay. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [s.l.] v. 1473, p. 17, 2016.

SAKI, J. *et al.* In-Silico Identification of the Best Compound Against Leishmania

infantum: High Throughput Screening of All FDA Approved Drugs. **Turkiye parazitoloji dergisi**, [s.l.] v. 43, n. 4, p. 158–164, 2019.

SALAS, J. M. *et al.* Leishmanicidal and Trypanocidal Activity of Metal Complexes with 1,2,4-Triazolo[1,5-a]pyrimidines: Insights on their Therapeutic Potential against Leishmaniasis and Chagas Disease. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.] v. 24, n. 25, p. 2796–2806, 2017.

SANDERSON, S. J. *et al.* Expression and characterization of a recombinant cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. **Biochemical Journal**, [s.l.]v. 347, n. 2, p. 383–388, 2000.

SANDS, M.; KRON, M. A.; BROWN, R. B. Pentamidine: A Review. [s.l.] v. 7, n. 5, p. 625–634, 1985.

SANTOS-PEREIRA, S. *et al.* *Leishmania amazonensis* resistance in murine macrophages: Analysis of possible mechanisms. **PLoS ONE**, [s.l.] v. 14, n. 12, p. 1–16, 2019.

SCHUHMACHER, A.; GASSMANN, O.; HINDER, M. Changing R&D models in research-based pharmaceutical companies. **Journal of Translational Medicine**, [s.l.] v. 14, n. 1, p. 105, 27 abr. 2016.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. **Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 18 jun. 2017. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/6/1296>. [s.l.] Acesso em: 23 jul. 2020

SELZER, P. M. *et al.* *Leishmania major*: Molecular modeling of cysteine protease and prediction of new nonpeptide inhibitors. **Experimental Parasitology**, [s.l.] v. 87, n. 3, p. 212–221, 1997.

SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clinical microbiology reviews**, [s.l.] v. 12, n. 1, p. 40–79, 1999.

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

SILVEIRA, F. T. *et al.* Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and L. (L.) *amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [s.l.] v. 31, n. 8, p. 423–431, 2009.

SINGH, J. *et al.* L-Asparaginase of *Leishmania donovani*: Metabolic target and its role in Amphotericin B resistance. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [s.l.]v. 7, n. 3, p. 337, 1 dez. 2017.

SIQUEIRA-NETO, J. L. *et al.* Cysteine proteases in protozoan parasites. **PLoS**

**Neglected Tropical Diseases**, [s.l.] v. 12, n. 8, p. 1–20, 2018.

SIQUEIRA, A. M. Subfilo Mastigophora. In: **Parasitologia Humana**. 11<sup>a</sup> edição ed. [s.l.] David Pereira Neves, 2005. p. 37–41.

SONG, M.; DENG, X. Recent developments on triazole nucleus in anticonvulsant compounds : a review. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s.l.] v. 0, n. 0, p. 453–478, 2018.

SOUZA, A. E. *et al.* Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. **FEBS letters**, [s.l.] v. 311, n. 2, p. 124–127, 19 out. 1992.

STROPPIA, P. H. F. *et al.* Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s.l.] v. 25, n. 12, p. 3034–3045, 2017.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Liposomal Amphotericin B and Leishmaniasis: Dose and Response. **Journal of Global Infectious Diseases**, [s.l.] v. 2, n. 2, p. 159, 2010.

SVENSJÖ, E. *et al.* Maxadilan, the *Lutzomyia longipalpis* vasodilator, drives plasma leakage via PAC1-CXCR1/2-pathway. **Microvascular Research**, Brasil. v. 83, n. 2, p. 185–193, mar. 2012.

TARIQ, S. *et al.* 1,2,4-Triazole-based benzothiazole/benzoxazole derivatives: Design, synthesis, p38 $\alpha$  MAP kinase inhibition, anti-inflammatory activity and molecular docking studies. **Bioorganic chemistry**, India. v. 81, p. 630–641, 1 dez. 2018.

TEIXEIRA, R. R. *et al.* Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Brasil. v. 146, p. 274–286, 2018.

TEMRAZ, M. G. *et al.* Anti-leishmanial click modifiable thiosemicarbazones: Design, synthesis, biological evaluation and in silico studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.] v. 151, p. 585–600, 2018.

TIAN, W. *et al.* CASTp 3.0: Computed atlas of surface topography of proteins. **Nucleic Acids Research**, [s.l.] v. 46, n. W1, p. W363–W367, 2018.

TOSHNIWAL, P. K.; ZARLING, E. J. Evidence for increased lipid peroxidation in multiple sclerosis. **Neurochemical research**, Chicago. v. 17, n. 2, p. 205–207, fev. 1992.

UFMG. **Símbolo dos aminoácidos**. Disponível em: <http://labs.icb.ufmg.br/lbcd/grupo4/simbol.html>. [s.l.] Acesso em: 9 abr. 2022.

URBINA, J. Chemotherapy of Chagas Disease. **Current Pharmaceutical Design**, Caracas. v. 8, n. 4, p. 287–295, 1 fev. 2002.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Caracas v. 104, n. SUPPL. 1, p. 311–318, 2009.

URIBE-JEREZ, P.; TARAZONA-GUARANGA, L.; ROBLES, R. Azoles de antes y ahora: una revisión. [s.l.] v. 1, n. 3, p. 219–230, 2020.

VALLE, M. **In silico – uma alternativa viável aos experimentos in vivo?** [s.l.]

VASCONCELOS, J. M. et al. American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Brasil. v. 50, n. 3, 2018.

VELÁSQUEZ, A. M. A. *et al.* Efficacy of a Binuclear Cyclopalladated Compound Therapy for Cutaneous Leishmaniasis in the Murine Model of Infection with *Leishmania amazonensis* and Its Inhibitory Effect on Topoisomerase 1B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Araraquara. v. 61, n. 8, 1 ago. 2017.

VICKERS, T. J.; GREIG, N.; FAIRLAMB, A. H. A trypanothione-dependent glyoxalase I with a prokaryotic ancestry in *Leishmania major*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Dundee. v. 101, n. 36, p. 13186, 7 set. 2004.

VIGILÂNCIA, SECRETARIA DE; SAUDE, M. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: , 2007. (Nota técnica).

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. **JDDG - Journal of the German Society of Dermatology**, [s.l.] v. 13, n. 3, p. 191–200, 2015.

WILKINSON, S. R. *et al.* Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.] v. 275, n. 11, p. 8220–8225, 17 mar. 2000.

WOOLLEY, D. W. SOME BIOLOGICAL EFFECTS PRODUCED BY BENZIMIDAZOLE AND THEIR REVERSAL BY PURINES. [s.l.] 1944.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1). [s.l.] Acesso em: 22 mar. 2022.

XIE, F. *et al.* Design, synthesis, and in vitro evaluation of novel antifungal triazoles. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, China. v. 27, n. 10, p. 2171–2173, 2017.

XU, Z.; ZHAO, S. J.; LIU, Y. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as potential anticancer agents: Current developments, action mechanisms and structure-activity relationships. **European Journal of Medicinal Chemistry**, China. v. 183, p. 111700, 2019.

YADAV, N. *et al.* In vitro antiplasmodial efficacy of synthetic coumarin-triazole analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Nova Deli. v. 145, p. 735–745, 2018.

YESILOVA, Y. *et al.* Meglumine antimoniate is more effective than sodium stibogluconate in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Dermatological Treatment**, Turquia v. 27, n. 1, p. 83–87, 2 jan. 2016.

YIM, S. K. *et al.* Screening of Human CYP1A2 and CYP3A4 Inhibitors from Seaweed In Silico and In Vitro. **Marine drugs**, [s.l.] v. 18, n. 12, p. 1–15, 2020.

ZHANG, B. Comprehensive review on the anti-bacterial activity of 1,2,3-triazole hybrids. **European journal of medicinal chemistry**, China v. 168, p. 357–372, 15 abr. 2019.

ZHANG, M. Q.; WILKINSON, B. Drug discovery beyond the “rule-of-five”. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.] v. 18, n. 6, p. 478–488, 2007.

## ANEXO 1

**Tabela suplementar 1:** Tabela de Aprovação das homologias de Topoisomerase I de *L. amazonensis*

Homologias	ERRAT	Verify 3D	Prove	Procheck
4	71.78%	85%	Falha	Falha
3	58.65%	84.58%	Falha	Falha
2	76.16%	Falha	falha	Passou
15	94.33%	Falha	Falha	Falha
1	78.75%	Passou	50%	Passou
11	64.64%	Falha	falha	Falha
10	62.13%	Falha	falha	50%
13	95.49%	Falha	50%	passou
19	100%	Falha	falha	passou
17	99.30%	Falha	falha	passou
14	70.2%	Falha	falha	passou
5	67%	Falha	Falha	Falha
20	100%	Falha	50%	passou
16	83.45%	Falha	falha	passou
12	64%	Falha	falha	50%
6	87%	Falha	Falha	50%
8	58.83%	83.84%	Falha	Passou
9	72.95%	92.6%	falha	Passou
7	79.19%	Falha	Falha	50%
18	23.5%	Falha	Falha	Passou
casp	78.75%	83.95%	50%	Passou
720926	82%	Falha	50%	passou
720926.1	83%	80%	50%	passou

**Tabela suplementar 2:** Tabela de Aprovação das homologias de Topoisomerase II de *L. amazonensis*

Homologias	ERRAT	Verify 3D	Prove	Procheck
7	71.71%	84.4%	falha	falha
10	78.01%	89.15%	falha	falha
11	66.76%	90.26%	falha	falha
16	55.38%	falha	falha	falha
15	56.03%	falha	falha	falha
13	54.68%	falha	falha	falha
5	85.63%	83.73%	falha	falha
4	78.46%	86.63%	falha	50%
2	72.3%	falha	falha	50%
8	51%	falha	falha	falha
17	61.03%	falha	falha	falha
18	61.19%	falha	falha	50%
3	80.28%	89.45%	falha	50%
9	46%	falha	falha	falha
14	51.21%	falha	falha	falha
19	62.88%	falha	falha	falha
1	69.6%	falha	falha	falha
12	67.38%	85.82%	falha	falha
6	71..70%	84.4%	falha	falha
20	69.78%	84.03%	falha	falha
casp	70%	falha	falha	falha
720927	74%	85%	50%	50%
(3)720927	76%	86%	Passou	50%
(4)720927	78%	87%	50%	50%

**Tabela suplementar 3:** Tabela de Aprovação das homologias de Glicose-6-fosfato desidrogenase de *L. amazonensis*

Homologias	ERRAT	Verify 3D	Prove	Procheck
15	18%	93.6%	falha	falha
16	falha	falha	falha	falha
7	59%	83%	falha	falha
17	36%	84.11%	falha	falha
3	70%	85%	falha	falha
2	68%	86%	falha	50%
20	falha	falha	falha	falha
18	falha	falha	falha	falha
19	falha	falha	falha	falha
1	79%	90%	falha	50%
12	falha	falha	falha	falha
8	56%	falha	falha	50%

13	falha	falha	falha	falha
5	75%	84%	falha	falha
14	74%	84%	falha	falha
4	falha	falha	falha	falha
11	63%	falha	falha	passou
9	68%	falha	falha	passou
10	73%	82%	falha	50%
6	78%	falha	falha	falha
casp	79%	90%	falha	50%

**Tabela suplementar 4:** Tabela de Aprovação das homologias de Piruvato Lanosterol C-14 Desmetilase de *L. amazonensis*

Homologias	ERRAT	Verify 3D	Prove	Procheck
17	55.2%	falha	falha	falha
12	60%	falha	falha	falha
2	80%	93.72%	falha	falha
11	56%	falha	falha	50%
14	70%	falha	falha	50%
15	57%	falha	falha	falha
1	84%	89%	falha	50%
4	64%	falha	falha	falha
8	67%	falha	falha	falha
10	54%	falha	falha	50%
18	72%	falha	falha	falha
7	65%	falha	falha	falha
16	69%	falha	falha	50%
6	70%	falha	falha	50%
13	53%	falha	falha	falha
5	82%	falha	falha	50%
3	75%	falha	falha	50%
20	69%	falha	falha	50%
19	52%	81%	falha	50%
9	68%	81%	falha	falha
casp	84%	89%	falha	50%

**Tabela suplementar 5:** Tabela de Aprovação das homologias de Topoisomerase I de *L. chagasi*

Homologias	ERRAT	Verify	Prove	Procheck
3	78%	86%	falha	50%
4	54%	83%	falha	50%
2	75%	falha	falha	passou



18	61%	falha	falha	50%
17	43%	falha	falha	passou
1	79%	85%	50%	passou
11	72%	falha	falha	falha
10	66%	falha	falha	passou
19	74%	falha	falha	passou
14	53%	falha	falha	50%
5	71%	falha	falha	falha
12	68%	falha	falha	50%
13	100%	falha	50%	passou
6	88%	81%	falha	passou
8	59%	83%	falha	passou
20	48%	falha	falha	passou
9	74%	93%	falha	passou
7	88%	falha	falha	50%
15	29%	falha	falha	passou
.casp	79%	85%	50%	passou

**Tabela suplementar 6:** Tabela de Aprovação das homologias de Topoisomerase II de *L. chagasi*

Homologias	ERRAT	Verify	Prove	Procheck
6	68%	82%	falha	falha
11	73%	89%	falha	falha
10	69%	88%	falha	falha
18	53%	falha	falha	falha
14	57%	falha	falha	50%
15	50%	falha	falha	falha
7	86%	falha	falha	50%
4	77%	80%	falha	falha
2	71%	86%	falha	falha
8	51%	falha	falha	falha
16	56%	falha	falha	falha
17	55%	80%	falha	50%
3	76%	87%	falha	50%
9	49%	falha	falha	falha
13	53%	falha	falha	falha
19	57%	falha	falha	falha
1	70%	falha	falha	falha
12	66%	falha	falha	falha
5	68%	82%	falha	falha
20	63%	85%	falha	falha
.casp	70%	falha	falha	falha

**Tabela suplementar 7:** Tabela de Aprovação das homologias de Glicose-6-fosfato desidrogenase de *L. chagasi*

Homologias	ERRAT	Verify	Prove	Procheck
18	19%	92%	falha	falha
7	58%	82%	falha	50%
2	69%	84%	falha	50%
3	66%	86%	falha	50%
19	37%	falha	falha	falha
17	32%	falha	falha	falha
12	35%	falha	falha	falha
16	29%f	falha	falha	falha
1	75%	87%	falha	50%
15	33%	falha	falha	falha
20	29%	falha	falha	falha
8	62%	falha	falha	falha
13	22%	86%	falha	falha
5	77%	84%	falha	falha
14	36%	falha	falha	falha
4	83%	82%	falha	falha
11	65%	falha	falha	50%
9	60%	falha	falha	50%
10	65%	86%	falha	50%
6	77%	falha	falha	falha
.casp	75%	87%	falha	50%

## ANEXO 2

Tabelas suplementares com os resultados do docking cego realizado pela plataforma CB-DOCK

*L. infantum chagasi*

- Topoisomerase I

FS10				FS28			
Vina	x	Centro	z	Vina	x	Centro	z
pontuação		y		pontuação		y	
-7,2	33	59	-10	-7.1	42	56	10
-6,7	38	39	11	-6.7	38	39	11
-6,6	42	56	10	-6.6	33	59	-10
-5,7	18	68	-10	-5.5	18	68	-10
-5,6	56	54	-20	-4.9	56	54	-20
-6,36				-4,9			
FS32				FS35			
Vina	Centro			Vina	Centro		

pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-6,8	42	56	10	-10,9	42	56	10
-6,8	38	39	11	-10,8	38	39	11
-6,6	33	59	-10	-10,5	33	59	-10
-6,1	18	68	-10	-10,2	18	68	-10
-5,5	56	54	-20	-9,6	56	54	-20
-6,3				-10,4			

FS44				FS49			
Vina	Centro			VinA	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7	33	59	-10	-7,2	33	59	-10
-6,5	42	56	10	-6,2	42	56	10
-6,5	18	68	-10	-6,2	38	39	11
-6,5	38	39	11	-5,9	56	54	-20
-5,4	56	54	-20	-5,6	18	68	-10
-7				-6,22			

FS53				FS54			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-6,9	42	56	10	-12,2	33	59	-10
-6,7	33	59	-10	-12	38	39	11
-6,7	38	39	11	-10,8	18	68	-10
-6	18	68	-10	-10,3	42	56	10
-5,7	56	54	-20	-8,6	56	54	-20
-6,4				-10,78			

FS65				FS66			
VinA	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7,2	42	56	10	-6,7	42	56	10
-6,9	38	39	11	-6,5	33	59	-10
-6,4	33	59	-10	-6,3	18	68	-10
-6	18	68	-10	-6,3	38	39	11
-5,5	56	54	-20	-5,7	56	54	-20
-6				-6,3			

FS71			
Vina	Centro		
pontuação	x	y	z
-7,2	38	39	11
-6,9	42	56	10
-6,5	33	59	-10

-6.1	18	68	-10
-5.2	56	54	-20
-6,4			

- Topoisomerase II

FS10				FS28			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-6.8	59	-7	19	-7	59	-7	19
-6.6	56	-23	15	-6.8	56	-23	15
-6.5	62	-13	33	-6.7	57	25	23
-6.5	57	25	23	-6.7	80	14	26
-6.5	80	14	26	-6.1	62	-13	33
-6,6				-6,7			

FS32				FS35			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7.1	56	-23	15	-12,8	62	-13	33
-6,6	80	14	26	-12.1	80	14	26
-6,5	59	-7	19	-12	59	-7	19
-6,5	57	25	23	-11,7	56	-23	15
-5,6	62	-13	33	-10,9	57	25	23
-6,3				-11,533			

FS44				FS49			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7	56	-23	15	-6,8	59	-7	19
-6.9	80	14	26	-6,7	57	25	23
-6.8	57	25	23	-6,4	56	-23	15
-6.7	59	-7	19	-6,4	80	14	26
-6.4	62	-13	33	-6	62	-13	33
-7				-6,46			

FS53				FS54			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7.5	62	-13	33	-14,1	80	14	26
-6.8	59	-7	19	-13	59	-7	19
-6.7	80	14	26	-12,6	56	-23	15
-6.4	57	25	23	-12,3	62	-13	33
-6.3	56	-23	15	-11,9	57	25	23
-5,46				-12,78			

FS65				FS66			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-6.8	56	-23	15	-7	59	-7	19

-6.6	59	-7	19	-6.6	62	-13	33
-6.1	57	25	23	-6.4	56	-23	15
-6.1	80	14	26	-6.2	57	25	23
-5.9	62	-13	33	-6.1	80	14	26
-6,3				-7			

FS71			
Vina	Centro		
pontuação	x	y	z
-6,8	62	-13	33
-6,8	59	-7	19
-6,7	56	-23	15
-6,4	57	25	23
-6,2	80	14	26
-6,58			

- Glicose-6-fosfato desidrogenase

FS10				FS28			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7	5	-73	32	-7.2	5	-73	32
-6.7	15	-71	11	-7	-8	-81	25
-6.5	28	-50	32	-6.8	28	-50	32
-6.3	-8	-81	25	-6.5	15	-71	11
-5.9	-7	-60	15	-5.7	-7	-60	15
-7				-7			

FS32				FS35			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7	5	-73	32	-12,3	15	-71	11
-6,7	-7	-60	15	-11,3	-8	-81	25
-6,6	-8	-81	25	-11.1	5	-73	32
-6,4	15	-71	11	-9,7	28	-50	32
-6,4	28	-50	32	-8,3	-7	-60	15
-6,62				-10,4			

FS44				FS49			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7	28	-50	32	-6.9	5	-73	32
-6.8	15	-71	11	-6.5	15	-71	11
-6.1	5	-73	32	-6.5	28	-50	32
-5.9	-7	-60	15	-6.4	-8	-81	25
-5.2	-8	-81	25	-5.3	-7	-60	15
-7				-6,3			

FS53		FS54	
Vina	Centro	Vina	Centro

pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-6.9	28	-50	32	-11,6	28	-50	32
-6.7	5	-73	32	-11,5	5	-73	32
-6.7	-8	-81	25	-11,4	15	-71	11
-6.5	15	-71	11	-10,7	-7	-60	15
-5.8	-7	-60	15	-10,3	-8	-81	25
-6,5				-11,1			

FS65				FS66			
VinA	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7.1	5	-73	32	-6.9	5	-73	32
-6.9	15	-71	11	-6.7	-8	-81	25
-6.9	-8	-81	25	-6.5	28	-50	32
-6.4	-7	-60	15	-6.4	15	-71	11
-6.3	28	-50	32	-6.4	-7	-60	15
-6,7				-6,6			

FS71			
Vina	Centro		
pontuação	x	y	z
-6.9	28	-50	32
-6.8	5	-73	32
-6.6	-8	-81	25
-6.5	-7	-60	15
-6.4	15	-71	11
-6,6			

- Piruvato Lanosterol C14-desmetilase

FS10				FS28			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-8,5	36	-33	-28	-8,9	36	-33	-28
-8,3	63	-37	-19	-8,8	63	-37	-19
-8	42	-27	-52	-8,6	42	-27	-52
-7,9	15	-44	-36	-8,4	15	-44	-36
-7,8	50	-31	-10	-8,1	50	-31	-10
-8,1				-8,56			

FS32				FS35			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-9,6	36	-33	-28	-17,9	36	-33	-28
-8,7	42	-27	-52	-17,4	42	-27	-52
-8,1	63	-37	-19	-17	15	-44	-36
-7,8	15	-44	-36	-16,5	63	-37	-19
-7,8	50	-31	-10	-16,1	50	-31	-10

-8,4				-16,98			
FS44				FS49			
Vina		Centro		Vina		Centro	
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-9,1	63	-37	-19	-8,6	63	-37	-19
-8,8	15	-44	-36	-8,5	36	-33	-28
-8,6	42	-27	-52	-8,5	50	-31	-10
-8,1	36	-33	-28	-8,4	15	-44	-36
-8	50	-31	-10	-8,4	42	-27	-52
-8,375				-8,48			

FS53				FS54			
Vina		Centro		Vina		Centro	
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-8,9	63	-37	-19	-19,3	36	-33	-28
-8,6	15	-44	-36	-17	50	-31	-10
-8,5	42	-27	-52	-16,6	63	-37	-19
-8,1	50	-31	-10	-15,2	42	-27	-52
-7,7	36	-33	-28	-14,5	15	-44	-36
-8,36				-16,52			

FS65				FS66			
Vina		Centro		Vina		Centro	
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-9,7	36	-33	-28	-9	36	-33	-28
-8,6	15	-44	-36	-8,4	50	-31	-10
-8,4	42	-27	-52	-8,3	15	-44	-36
-8,3	63	-37	-19	-8,2	42	-27	-52
-7,7	50	-31	-10	-8,1	63	-37	-19
-8,54				-9			

FS71			
Vina		Centro	
pontuação	x	y	z
-8,7	36	-33	-28
-8,3	15	-44	-36
-8,1	63	-37	-19
-8,1	50	-31	-10
-7,8	42	-27	-52
-8,2			

*L. amazonensis*

- Topoisomerase I

FS28		FS32	
Vina		Centro	

pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7.4	39	55	-4	-7.7	40	59	1
-7.3	40	59	1	-6.9	26	34	25
-6.9	26	34	25	-6.6	39	55	-4
-6.5	45	67	10	-6.6	42	76	23
-6.3	42	76	23	-6.6	45	67	10
-6,9				-6,9			

FS33				FS35			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-8.3	39	55	-4	-12.1	42	76	23
-7.6	40	59	1	-11.6	45	67	10
-6.9	42	76	23	-11.6	40	59	1
-6.8	45	67	10	-11.4	26	34	25
-6.7	26	34	25	-11	39	55	-4
-7,2				-11,5			

FS41				FS42			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-8.1	39	55	-4	-7.1	42	76	23
-6.9	26	34	25	-6.8	39	55	-4
-6.8	42	76	23	-6.8	40	59	1
-6.8	45	67	10	-6.7	45	67	10
-6.8	40	59	1	-6.5	26	34	25
-7				-6,8			

FS44				FS71			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7.7	39	55	-4	-7.4	39	55	-4
-7.3	40	59	1	-6.9	42	76	23
-6.7	42	76	23	-6.7	45	67	10
-6.1	45	67	10	-6.7	26	34	25
-6.1	26	34	25	-6.6	40	59	1
-6,8				-6,9			

FS14			
Vina	Centro		
pontuação	x	y	z
-7.3	39	55	-4
-7.1	40	59	1
-6.8	45	67	10
-6.3	26	34	25
-6.2	42	76	23
-6,7			

- Topoisomerase II

FS28				FS32			
Vina	Centro			Vina	Centro		



pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-8.7	8	-14	-3	-8.5	8	-14	-3
-7.9	52	-8	-22	-7.4	9	24	-14
-7.4	8	-15	10	-7.2	52	-8	-22
-7.3	29	-11	-13	-7.1	29	-11	-13
-7.1	9	24	-14	-6.9	8	-15	10
-7,7				-7,4			

FS33				FS35			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-8	8	-14	-3	-14.5	8	-14	-3
-7.5	52	-8	-22	-13.8	29	-11	-13
-7.3	29	-11	-13	-12.5	8	-15	10
-7	9	24	-14	-12.2	9	24	-14
-6.7	8	-15	10	-11.1	52	-8	-22
-7,3				-12,9			

FS41				FS42			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-8.2	8	-14	-3	-8.5	8	-14	-3
-7.4	9	24	-14	-7.5	9	24	-14
-7.3	29	-11	-13	-7.4	52	-8	-22
-7.2	52	-8	-22	-7	29	-11	-13
-6.8	8	-15	10	-6.9	8	-15	10
-7,4				-7,5			

FS44				FS71			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-8.2	8	-14	-3	-8.6	8	-14	-3
-7.4	9	24	-14	-7.6	29	-11	-13
-7.3	29	-11	-13	-7.6	9	24	-14
-7.2	52	-8	-22	-7.5	52	-8	-22
-6.8	8	-15	10	-6.9	8	-15	10
-7,4				-7,6			

FS14			
VinA	Centro		
pontuação	x	y	z
-8.5	8	-14	-3
-7.3	9	24	-14
-7.3	52	-8	-22
-6.8	29	-11	-13
-6.8	8	-15	10
-7,3			

- Glicose-6-fosfato desidrogenase

FS28		FS32	
Vina	Centro	Vina	Centro

pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7.4	5	-73	31	-7.2	5	-73	31
-7.3	28	-50	34	-6.9	28	-50	34
-6.5	15	-71	11	-6.9	-9	-82	24
-6.5	-9	-82	24	-6.5	15	-71	11
-5.4	-7	-60	15	-6.3	-7	-60	15
-6,6				-5,4			

FS33				FS35			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7.1	5	-73	31	-11.8	-9	-82	24
-6,9	15	-71	11	-11.3	15	-71	11
-6,7	-7	-60	15	-10.9	-7	-60	15
-6,6	28	-50	34	-10.8	5	-73	31
-6,5	-9	-82	24	-10.2	28	-50	34
-6,8				-11			

FS41				FS42			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7,2	28	-50	34	-7,9	28	-50	34
-6,9	-9	-82	24	-7	5	-73	31
-6,6	5	-73	31	-6.1	15	-71	11
-6,4	-7	-60	15	-6	-7	-60	15
-6,2	15	-71	11	-5,6	-9	-82	24
-6,7				-6,5			

FS44				FS71			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7,6	5	-73	31	-7.2	5	-73	31
-7,4	28	-50	34	-7	28	-50	34
-6.1	15	-71	11	-6.9	15	-71	11
-5,8	-9	-82	24	-6.5	-7	-60	15
-5,2	-7	-60	15	-6.1	-9	-82	24
-7,5				-6,8			

FS14			
Vina	Centro		
pontuação	x	y	z
-6,7	5	-73	31
-6	15	-71	11
-5,9	-9	-82	24
-5,7	-7	-60	15
-5,2	28	-50	34
-5,9			

- Piruvato Lanosterol C14-desmetilase

FS28				FS32			
Vina	Centro			Vina	Centro		

pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-7.9	19	53	32	-8	20	42	27
-7.8	20	42	27	-7,4	19	53	32
-7.7	1	49	28	-7,3	1	49	28
-6.6	12	50	6	-6,8	35	53	24
-6.5	35	53	24	-5,2	12	50	6
-7,3				-6,9			

FS33				FS35			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-8.1	20	42	27	-14,2	1	49	28
-7.7	19	53	32	-11,8	20	42	27
-7.5	1	49	28	-10,8	19	53	32
-6.6	35	53	24	-10,3	12	50	6
-5.7	12	50	6	-9,7	35	53	24
-7,1				-11,4			

FS41				FS42			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-8	20	42	27	-7.5	20	42	27
-7.4	19	53	32	-7.3	1	49	28
-7.2	1	49	28	-7.3	19	53	32
-6.5	35	53	24	-6.7	35	53	24
-5.9	12	50	6	-6	12	50	6
-7				-7			

FS44				FS71			
Vina	Centro			Vina	Centro		
pontuação	x	y	z	pontuação	x	y	z
-8	19	53	32	-7.6	20	42	27
-7.8	1	49	28	-7.6	19	53	32
-7.4	20	42	27	-7.4	1	49	28
-7.1	35	53	24	-6.3	35	53	24
-5.9	12	50	6	-5.1	12	50	6
-7,2				-6,8			

FS14			
VinA	Centro		
pontuação	x	y	z
-7,9	20	42	27
-6,7	1	49	28
-6,7	19	53	32
-6,6	35	53	24
-5,7	12	50	6
-6,7			

