

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**Planejamento e desenvolvimento de novos compostos
com atividade frente a *Leishmania* spp.**

Síntese, avaliação da atividade e toxicidade de derivados
5-nitro-2-furfurilidênicos e estudos de relações estrutura-atividade

Carolina Arruda Braz

Orientador: Prof. Dr. *Leoberto Costa Tavares*

Coorientadora: Dra. *Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto*

SÃO PAULO

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**Planejamento e desenvolvimento de novos compostos
com atividade frente a *Leishmania* spp.**

Síntese, avaliação da atividade e toxicidade de derivados
5-nitro-2-furfurilidênicos e estudos de relações estrutura-atividade

Carolina Arruda Braz

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. ***Leoberto Costa Tavares***

Coorientadora: Dra. ***Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto***

SÃO PAULO
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

B794p	Braz, Carolina Arruda Planejamento e desenvolvimento de novos compostos com atividade frente a <i>Leishmania</i> spp: Síntese, avaliação da atividade e toxicidade de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos e estudos de relações estrutura-atividade / Carolina Arruda Braz. - São Paulo, 2021. 270 p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Orientador: Tavares, Leoberto Costa Coorientador: Pasqualoto, Kerly Fernanda Mesquita 1. Farmácia. 2. Química Farmacêutica. 3. Planejamento de Fármacos. 4. Relações estrutura-atividade. 5. <i>Leishmania</i>. I. T. II. Tavares, Leoberto Costa, orientador. III. Pasqualoto, Kerly Fernanda Mesquita, coorientador.
-------	---

Carolina Arruda Braz

Planejamento e desenvolvimento de novos compostos com atividade frente a *Leishmania spp*: Síntese, avaliação da atividade e toxicidade de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos e estudos de relações estrutura-atividade.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do título de Doutor

Prof. Tit. Leoberto Costa Tavares
orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2021

“In a dark place we find ourselves, and a little more knowledge lights our way.”

Yoda. Star Wars: Episode III, Revenge of the Sith (2005).

AGRADECIMENTOS

Ao prof Tit. Leoberto Costa Tavares pela orientação ao transmitir sua sabedoria, pelos ensinamentos e conselhos que foram fundamentais no percorrer do doutorado, além de sua presença como modelo de postura ética e científica. Agradeço principalmente à paciência, compreensão e não ter desistido de mim durante momentos de dificuldades pessoais e profissionais.

À Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, co-orientadora, pelos ensinamentos e oportunidade de aprendizado, pelos preciosos *insights* e indicações indispensáveis para a realização deste trabalho, que tenho certeza serão sempre úteis no futuro.

Ao prof. José Angelo Lauletta Lindoso, pela essencial colaboração e orientação no manejo das *Leishmanias*. Além de proporcionar, juntamente com sua equipe e alunos, oportunidades de aprendizado constantes nessa área tão desafiadora. Agradeço também a disponibilização das cepas de *Leishmania* utilizadas neste trabalho.

À prof. Tit. Bianca Zingales, por proporcionar o primeiro contato técnico com a área de ensaios biológicos, pela postura e oportunidade de aprendizado. Agradeço também a disponibilização das cepas de *Leishmania* utilizadas neste trabalho.

Ao prof Shane Wilkinson, da Queen Mary University of London, por ter aceitado minha presença como pesquisadora no período sanduíche. Pelos ensinamentos e oportunidades, além da grande ajuda durante o começo da pandemia, que mesmo tendo impossibilitado a conclusão do trabalho, foi um período de grande aprendizado. Agradeço também a disponibilização das cepas de *Leishmania* e *Trypanosoma brucei* utilizadas neste trabalho.

Ao grupo LPDF e ao químico João Sussumu, pelo apoio profissional e companhia durante as duras horas e diversos obstáculos encontrados durante o doutorado.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Tecnologia Buiquímico-Farmacêutica pela oportunidade de realizar esse projeto. Aos professores e membros da Secretaria do Programa de Pós-Graduação da FCF da USP, pela atenção e disponibilidade constante.

Aos meus pais (*in memoriam*) e familiares. Aos amigos pelo apoio e companhia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Além da concessão da bolsa durante o período sanduíche (edital PRINT).

RESUMO

BRAZ, C. A. **Planejamento e desenvolvimento de novos compostos com atividade frente a *Leishmania* spp: Síntese, avaliação da atividade e toxicidade de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos e estudos de relações estrutura-atividade.** 2021. 265p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A leishmaniose é uma zoonose de ampla distribuição mundial, causada pelos parasitas tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*. Infelizmente, o arsenal terapêutico disponível é precário, mas vê-se crescente o interesse científico pela busca do potencial de derivados nitroheterocíclicos como alternativas terapêuticas. Nesse contexto, este trabalho analisou o potencial de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos contra diferentes cepas de *Leishmania*, assim como investigou um possível modo de ação para esta classe de nitrocompostos. Para tal, a quimioteca foi sintetizada de acordo com publicações prévias do grupo. O potencial de inibição de crescimento das culturas de promastigotas de *L. (L.) infantum* (Linf) e *L. (L.) major* (Lmaj) foi determinado, utilizando miltefosina (MILT) (Linf - IC₅₀: 8,28±0,33 µM), anfotericina B (AMB) (Linf - IC₅₀: 0,02±0,002 µM) e nifurtimox (NFX) (Lmaj - IC₅₀: 3,5±0,09 µM) como referência. A maioria dos compostos apresentaram maior potencial que as referências, destacando o composto **40** (Linf - IC₅₀: 0,2±0,019 µM/ Lmaj - IC₅₀: 0,087 ± 0,001 µM) como mais eficaz. Contra as formas amastigotas intracelulares, para Linf os compostos **40**, **13** e **15** foram mais eficazes em reduzir a carga parasitária dos macrófagos infectados que fármacos de referência. Para Lmajor, o composto **40** (IC₅₀: 0,006 ± 0,0003 µM) foi mais ativo que o NFX (IC₅₀: 2,15 ± 0,01 µM). Também foi determinada a atividade da quimioteca frente a enzima nitrorredutase (NTR1), utilizando cepas de *T. brucei* superexpressantes de NTR1, e os compostos analisados foram até 18 vezes mais eficazes que à cepa *wild-type*. Ademais, a partir da análise exploratória de dados por análise de componentes principais (PCA) e de agrupamentos hierárquicos (HCA), foi reconhecida a influência das propriedades relacionadas com o equilíbrio hidrófilo-lipófilo e da natureza estérica/geométrica das moléculas para atividade *anti-Leishmania*.

Palavras chave: *Leishmania*, nitrocompostos, promastigota, amastigota, nitrorredutase, análise exploratória de dados.

ABSTRACT

BRAZ, C. A. **Design of new compounds against *Leishmania* spp: synthesis, biological evaluation and toxicity of 5-nitro-2-furfurylidene derivates and structure-activity relationship studies.** 2021. 265p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Leishmaniasis is a worldwide zoonosis caused by trypanosomatid parasites of the genus *Leishmania*. Unfortunately, the available therapeutic arsenal is precarious, but there is growing scientific interest in searching the potential of nitroheterocyclic derivatives as therapeutic alternatives. In this context, this work analyzed the potential of 5-nitro-2-furfurylidene derivatives against different *Leishmania* strains, as well as investigated the potential mode of action for this nitro compounds class. To this end, the chemolibrary was synthesized according to our group's previous publications. The growth inhibitory potential for promastigote cultures of *L. (L.) infantum* (Linf) and *L. (L.) major* (Lmaj) was determined using miltefosine (MILT) (Linf - IC₅₀: 8.28±0.33 µM), amphotericin B (AMB) (Linf - IC₅₀: 0.02±0.002 µM) and nifurtimox (NFX) (Lmaj - IC₅₀: 3.5±0.09 µM) as reference. Most of the compounds were more potent than the references, highlighting compound **40** (Linf - IC₅₀: 0.2±0.019 µM/ Lmaj - IC₅₀: 0.087 ± 0.001 µM) as the most effective. Against intracellular amastigote, for Linf, compounds **40**, **13** and **15** were more effective in reducing the parasite load of infected macrophages than reference drugs. For Lmajor, compound **40** (IC₅₀: 0.006 ± 0.0003 µM) was more active than NFX (IC₅₀: 2.15 ± 0.01 µM). The activity against nitroreductase (NTR1) enzyme was determined using overexpressing NTR1 mutant *T. brucei* strains, and the analyzed compounds were up to 18 times more effective than wild-type. Furthermore, exploratory data analysis using principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering (HCA) methods were used. The influence of properties related to the hydrophilic-lipophilic balance and the steric/geometric nature of the molecules was associated with the anti-Leishmanial activity.

Keywords: *Leishmania*, nitrocompounds, promastigotes, amastigotes, nitroreductases, exploratory data analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da ultraestrutura das fases evolutivas de amastigota (A) e promastigota (B) de <i>Leishmania</i>	23
Figura 2. Fármacos utilizados na terapêutica de leishmanioses.	31
Figura 3. Estruturas químicas dos candidatos à fármacos em estudo para o tratamento de leishmanioses.	37
Figura 4. Estrutura química da nifuroxazida (NF) e fármacos 5-nitro furano relacionados.	38
Figura 5. Estrutura química da nifuroxazida.	40
Figura 6. Redução de nitrofuranos por nitrorredutases do tipo 1 e 2 (NTR 1 e NTR 2).	45
Figura 7. Representação geral de mapas de similaridade estrutura-atividade demonstrando as quatro regiões principais.	55
Figura 8. Derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos azometínicos (esquerda) e composto protótipo nifuroxazida (direita).	59
Figura 9. Rota sintética dos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos.	61
Figura 10. Layout do ensaio de inibição da atividade de <i>L. (L.) infantum</i> na forma promastigota contra a quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.	65
Figura 11. Mecanismo de esterificação de Fischer.	87
Figura 12. Mecanismo da reação de hidrazinólise.	87
Figura 13. Mecanismo de reação para obtenção da base de Schiff.	88
Figura 14. Curva de crescimento relativo às culturas da forma promastigota de <i>L. (L.) infantum</i> durante 96 horas de incubação.	90
Figura 15. Redução do MTT em formazan.	91
Figura 16. Estrutura química dos reagentes 5-nitro-2-furaldeído, 5-nitro-2-tiofeno-carbaldeído e estrutura do arcabouço químico que compõe a quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.	93
Figura 17. Curva dose-resposta correspondente à inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do 5-nitro-2-furaldeído.	94
Figura 18. Curva dose-resposta correspondente à inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do 5-nitro-2-tiofeno carbaleído.	94
Figura 19. Curva dose-resposta correspondente à inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações de nifuroxazida.	96

Figura 20. Curva dose-resposta correspondente à inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações de miltefosina.	96
Figura 21. Curva dose-resposta correspondente à inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações de anfotericina B.	97
Figura 22. Atividade anti- <i>Leishmania</i> (IC ₅₀) de derivados furfurilidênicos e fármacos de referência.	98
Figura 23. Viabilidade celular de macrófagos THP-1 correspondentes a culturas não tratadas (100% viáveis) incubadas durante 24, 48 e 72 horas.	102
Figura 24. Redução da resazurina com formação da resorfurina	105
Figura 25. Valores de citotoxicidade (CC ₅₀ µM) da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos contra as células THP-1 diferenciadas.....	107
Figura 26. Número de amastigotas por 100 células e porcentagem de infecção dos macrófagos infectados com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	108
Figura 27. Parasitismo (n. de amastigota/100 células) em resposta à anfotericina B, miltefosina e nifuroxazida durante 24 e 48 horas.....	111
Figura 28. Parasitismo (n. de amastigota/100 células) em resposta aos compostos 2 , 13 , 15 e 40 durante 24 e 48 horas de incubação.	113
Figura 29. Produção de NO para dos compostos 2 e 15 durante 24 e 48 horas de tratamento em macrófagos infectados com amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	115
Figura 30. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos THP-1 infectados com <i>Leishmania (L.) infantum</i>	118
Figura 31. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos THP-1 diferenciados infectados com amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> tratados com miltefosina e anfotericina B.	119
Figura 32. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos THP-1 diferenciados infectados com amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> tratados com os compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos 2 , 15 e 40	122
Figura 33. Atividade anti- <i>Leshmania</i> convertida em pIC ₅₀ (-logIC ₅₀) do conjunto de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos, nifuroxazida (NF) e nifurtimox (NFX).	125
Figura 34. Mecanismo da reação de emissão de bioluminescência através da oxidação da luciferina.....	126
Figura 35. Suscetibilidade de formas amastigotas de <i>L. (L.) major</i> que expressam luciferase em relação a 30 µM dos compostos nitro-heterocíclicos.....	127

Figura 36. Curvas dose-resposta de inibição do crescimento para <i>L. (L.) major</i> e células THP-1 referentes aos compostos 2 (esquerda) e 40 (direita).....	132
Figura 37. Valores de atividade anti- <i>T. brucei</i> convertida em pIC ₅₀ (-logIC ₅₀ M) da quimioteca de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos.....	135
Figura 38. Curva dose-resposta correspondente à inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações de nifurtimox para as condições de indução da super expressão da NTR1 <i>TbNTR</i> (+) e expressão normal da proteína <i>TbNTR</i> (-).....	136
Figura 39. Diferenças entre as suscetibilidades de culturas mutantes de <i>T. brucei</i> induzidas à superexpressão de nitrorredutase (NTR 1) em relação aos compostos.	138
Figura 40. Representação dos compostos 5-nitro2-furfurilidênicos.....	146
Figura 41. Mapas de superfície de potencial eletrostático (A) e distribuição de cargas CHELP por átomos (B) dos compostos 15 e 28	147
Figura 42. Atividade anti- <i>Leishmania</i> convertida em pIC ₅₀ (-logIC ₅₀) do conjunto de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos, nifuroxazida, anfotericina B e miltefosina.	149
Figura 43. Gráficos de dispersão dos descritores moleculares: <i>acceptor count</i> (a), momento dipolo total (b), <i>carbo ring count</i> (c) e CHELPG O3 (d) <i>versus</i> atividade biológica anti- <i>Leishmania</i> contra a forma promastigota de <i>L. (L.) infantum</i>	151
Figura 44. Correlação dos descritores calculados em relação à atividade biológica anti- <i>T. cruzi</i> (a) (PALACE-BERL <i>et al.</i> , 2018) e anti- <i>Leishmania</i> (b).	152
Figura 45. Resultados da PCA [(a) Gráfico de seleção de fatores ou PCs e (b) Gráfico de escores para os fatores 1 e 2] e dendrograma de amostras (n = 39) do método HCA..	156
Figura 46. Gráfico da distância de Mahalanobis <i>versus</i> resíduos das amostras.	158
Figura 47. Mapas de superfície de potencial eletrostático (A) e superfície acessível ao solvente (B) dos compostos 40 , 25 e nifuroxazida.	161
Figura 48. Mapa de similaridade estrutura-atividade do conjunto de compostos ativos contra a forma promastigota de <i>L. (L.) infantum</i>	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Leishmania</i> causadoras da leishmaniose no Brasil.	26
Tabela 2. Coeficientes de similaridade 2D.	53
Tabela 3. Avaliação da variação de absorbância em diferentes concentrações de DMSO comparadas com controle positivo para cepa de <i>L. (L.) infantum</i>	92
Tabela 4. Inibição do crescimento parasitário de <i>L. (L.) infantum</i> para diferentes concentrações do 5-nitro-2-furaldeído.	94
Tabela 5. Inibição do crescimento parasitário de <i>L. (L.) infantum</i> para diferentes concentrações do 5-nitro-2-tiofeno carbaldeído.	94
Tabela 6. Inibição do crescimento parasitário de culturas de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> para diferentes concentrações de nifuroxazida.	96
Tabela 7. Inibição do crescimento parasitário de culturas de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> para diferentes concentrações de miltefosina.	96
Tabela 8. Inibição do crescimento parasitário de <i>L. (L.) infantum</i> para diferentes concentrações de anfotericina. B.	97
Tabela 9. Atividade anti- <i>Leishmania</i> dos compostos nitro-heterocíclicos. composto protótipo e fármacos de referência contra a forma promastigota da <i>L. (L.) infantum</i>	99
Tabela 10. Concentração citotóxica (CC ₅₀) em células THP-1 durante os tempos 24, 48 e 72 horas e IC ₅₀ atividade anti- <i>Leishmania</i> (IC ₅₀) tratados com compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos e fármacos de referência.	103
Tabela 11. Concentração citotóxica (CC ₅₀) para as células THP-1 diferenciadas tratadas com compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos determinados pelo método de viabilidade com resazurina.	106
Tabela 12. Avaliação da porcentagem de infecção dos macrófagos infectados após tratamento com anfotericina B, miltefosina e nifuroxazida.	112
Tabela 13. Porcentagem de infecção dos macrófagos infectados com amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> após o tratamento com diferentes concentrações dos compostos 2, 13, 15 e 40 durante 24 e 48 horas de incubação.	113
Tabela 14. Atividade anti- <i>Leishmania</i> dos compostos nitro-heterocíclicos, composto protótipo e fármaco de referência contra a forma promastigota da <i>L. (L.) major</i>	124
Tabela 15. Valores de porcentagem de inibição do crescimento de amastigotas intracelulares e luminescência emitida correspondente para 30 µM dos compostos avaliados.	128

Tabela 16. Suscetibilidade dos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos para as formas promastigotas e amastigotas de <i>L (L.) major</i>	130
Tabela 17. Atividade dos compostos nitro-heterocíclicos e nifurtimox em relação à forma tripomastigotas de <i>T. brucei</i>	134
Tabela 18. Inibição do crescimento parasitário de culturas de tripomastigotas de <i>T. brucei</i> para as condições de indução da super expressão da NTR1 <i>TbNTR</i> (+) e expressão normal da proteína <i>TbNTR</i> (-) relativos a diferentes concentrações de nifurtimox.	137
Tabela 19. Suscetibilidade da forma tripomastigota de <i>T. brucei</i> para as condições de indução da superexpressão da NTR1 <i>TbNTR</i> (+) e expressão normal da proteína <i>TbNTR</i> (-) em relação aos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.	139
Tabela 20. Descritores calculados para a quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.	142
Tabela 21. Tabela de pesos (<i>loadings</i>) da análise de PC. Em destaque, descritores com altos valores de peso nas duas primeiras componentes principais, PC1 e PC2.....	155

LISTA DE ABREVIATURAS E MÈTODOS

μ : Momento de dipolo

λ : Comprimento de onda

A: Ângulo de torsão das diedrais

AC: *Activity cliff*

ANOVA: análise de variância (*analysis of variance*)

ASA: Superfície acessível ao solvente

ASA+: Superfície acessível ao solvente de todos os átomos com carga positiva

aSA-: Superfície acessível ao solvente de todos os átomos de carga negativa

ASAH: Superfície acessível ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos

ASAP: Superfície acessível ao solvente de todos os átomos hidrofílicos

avdW: área de superfície molecular de van der Waals

AMB: Anfotericina B

CADD: *Computer-aided drug design* (Planejamento de fármacos auxiliado por computador)

CC₅₀: Concentração testada correspondente a 50% de inibição do crescimento das células THP-1.

CHELPG: *Charges from electrostatic potential using a grid based method* (Cargas de potencial eletrostático)

ClogP: Coeficiente de partição octanol/água calculado (método de pesos)

ClogD: Coeficiente de partição aparente

CP: Controle positivo

CS: Controle de meio de cultura com DSMO – controle de solvente

CSP: Controle de crescimento da suspensão parasitária

CM: Controle de meio – branco

DNDi: *Drug for Neglected Disease*

DO: Densidade óptica

DP: Desvio-padrão

FMN: Mononucleotídeo de flavina

Gap: Diferença entre HOMO e LUMO (HOMO-LUMO)

HCA: Análise hierárquica de agrupamentos (*Hierarchical cluster analysis*)

HOMO: Orbital molecular ocupado de maior energia (*highest occupied molecular orbital*)

HTS: triagem de alta produtividade (*high throughput screening*)

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%

IC (%): Porcentagem de inibição de crescimento

IC₅₀: Concentração que corresponde a 50% de inibição do crescimento dos parasitas.

IS: Índice de seletividade

IS': Índice de similaridade utilizado nos dendrogramas resultantes da HCA

LM: Leishmaniose mucocutânea

LOMO: Orbital molecular desocupado de menor energia (*lowest unoccupied molecular orbital*)

LV: Leishmaniose visceral

LT: Leishmaniose tegumentar

MEP: Mapa de potencial eletrostático

MM+: Campo de força derivado do MM2

NEQ: Novas entidades químicas

NTR: Nitrorreductases

PAC: Perfil de amostragem conformacional

PBS: *Phosphate-buffered saline* (tampão salino fosfatado)

PC: Componente principal (*principal component*)

PCA: Análise de componentes principais

PM3: *Parametric method 3*

PSA: Área de superfície polar

R: Coeficiente de correlação de Pearson

RB: Ligações rotáveis

RM: Refratividade molar

RMN ¹H e ¹³C: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono 13

SAR: Relação estrutura-atividade (*structure-activity relationship*)

vvdW: Volume de van der Waals

SUMÁRIO

1	Fundamentação teórica	21
1.1	Leishmaniose	21
1.1.1	<i>Leishmania</i> spp: características morfológicas e ciclo evolutivo	21
1.1.2	Epidemiologia e características clínicas da doença	24
1.2	Terapia medicamentosa	30
1.2.1	Antimoniais pentavalentes e pentamidina	31
1.2.2	Anfotericina B	32
1.2.3	Miltefosina.....	33
1.2.4	Terapias alternativas	35
1.3	Derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos.....	38
1.3.1	Nitrorredutases	42
1.4	Planejamento e desenvolvimento de fármacos auxiliados por metodologias computacionais	46
2	Justificativa.....	56
3	Objetivos.....	58
3.1	Objetivo geral	58
3.2	Objetivos Específicos	58
4	Metodologia.....	58
4.1	Quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos	59
4.2	Determinação da atividade anti- <i>Leishmania</i> contra a forma promastigota da <i>L. (L.) infantum</i>	62
4.2.1	Cultivo das formas promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	62
4.2.2	Determinação da curva de crescimento	62
4.2.3	Padronização método colorimétrico MTT para ensaios em promastigota	63
4.2.4	Determinação da curva de calibração	63

4.2.5	Determinação da atividade inibitória dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos contra a forma promastigota da <i>L. (L.) infantum</i>	64
4.2.6	Tratamento dos dados obtidos para a determinação da atividade anti- <i>Leishmania</i> (IC ₅₀)	66
4.3	Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos em células THP-1 diferenciadas	66
4.3.1	Cultivo e diferenciação celular das células THP-1.....	67
4.3.2	Determinação da citotoxicidade dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos em células THP-1 diferenciadas em macrófagos pelo método de redução MTT... 67	
4.3.3	Determinação da citotoxicidade <i>in vitro</i> da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos em células THP-1 diferenciadas em macrófagos pelo método de redução da resazurina.....	69
4.4	Padronização da infecção de macrófagos THP-1 diferenciados com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	70
4.5	Capacidade anti- <i>Leishmania</i> de compostos nitro-heterocíclicos contra a forma amastigota da <i>L. (L.) infantum</i>	71
4.6	Dosagem de óxido nítrico (NO) em macrófagos THP-1 diferenciados infectados com amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> expostos aos compostos nitro-heterocíclicos... 72	
4.7	Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de macrófagos THP-1 infectados com amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> e tratados com compostos nitro-heterocíclicos 73	
4.8	Determinação da atividade anti- <i>Leishmania</i> contra a forma promastigota e amastigota de <i>L. (L.) major</i>	73
4.8.1	Cultivo das formas promastigotas e amastigotas de <i>L. (L.) major</i>	74
4.8.2	Ensaio de inibição de crescimento das formas promastigotas de <i>L. (L.) major</i> 75	
4.8.3	Ensaio de inibição de crescimento das culturas de amastigotas de <i>L. (L.) major</i> 75	
4.8.4	Tratamento de dados obtidos para determinação da atividade anti- <i>Leishmania</i> (IC ₅₀)	76

4.9	Investigação do mecanismo de ação da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos envolvendo a enzima nitroredutase	77
4.10	Métodos de modelagem molecular e quimiometria utilizados para a investigação das relações entre estrutura química-propriedades moleculares-atividade biológica. 79	
4.10.1	Conjunto de dados e construção dos modelos tridimensionais (3D) da quimioteca de compostos	79
4.10.2	Cálculo dos descritores/propriedades moleculares da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.....	80
4.10.3	Análise exploratória de dados.....	81
4.10.4	Identificação dos activity cliffs dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com atividade contra a <i>L. (L.) infantum</i>	83
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
5.1	Quimioteca de compostos 5-nitro-furfurilidênicos.....	85
5.2	Determinação da atividade anti- <i>Leishmania</i> contra a forma promastigota de <i>L. (L.) infantum</i>	89
5.3	Determinação do valor de CC ₅₀ dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos em macrófagos THP-1 diferenciados	101
5.4	Determinação da citotoxicidade <i>in vitro</i> da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos em células THP-1 diferenciadas em macrófagos pelo método utilizando a resazurina	104
5.5	Padronização da infecção de macrófagos THP-1 por amastigotas da <i>L. (L.) infantum</i>	107
5.6	Determinação do potencial anti- <i>Leishmania</i> dos compostos nitro-heterocíclicos contra a forma amastigota da <i>L. (L.) infantum</i>	109
5.7	Avaliação da dosagem de óxido nítrico (NO) em células de macrófagos THP-1 diferenciados infectadas com amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> expostas aos compostos nitro-heterocíclicos	114
5.8	Avaliação das alterações morfológicas provocadas pelos compostos nitro-heterocíclicos em macrófagos THP-1 infectados com amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	

5.9	Avaliação atividade dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos contra a formas promastigotas e amastigota de <i>L. (L.) major</i>	123
5.10	Investigação do mecanismo de ação da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos envolvendo a enzima nitroredutase	132
5.11	Estudos aplicando métodos de modelagem molecular e quimiometria para a investigação das relações entre estrutura química-propriedades moleculares-atividade biológica	141
5.11.1	Conjunto de dados, construção dos modelos moleculares 3D e cálculo das propriedades moleculares	141
5.11.2	Investigação das relações estrutura/propriedades moleculares-atividade: análise exploratória de dados.....	148
5.11.3	Activity Cliff	162
6	Conclusões e perspectivas.....	167
	Referências	172
	ANEXO 1 – Faixas de fusão experimentais e da literatura da quimioteca de compostos 5-nitro-2furfurilidênicos	188
	ANEXO 2 – Espectros de RMN ¹ H dos compostos sintetizados da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.....	190
	ANEXO 3 – Curva de calibração para culturas de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	198
	ANEXO 4 – Curvas dose-resposta correspondentes à inibição de crescimento parasitário para as formas promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	199
	ANEXO 5 – Curvas dose-resposta relativas à toxicidade dos compostos frente a células THP-1 durante 24, 48 e 72 horas.....	218
	ANEXO 6 - Curva dose-resposta correspondentes à inibição de crescimento parasitário para as formas promastigotas de <i>L. (L.) major</i>	225
	ANEXO 7 - Curva dose-resposta correspondentes à inibição de crescimento parasitário para as formas amastigota de <i>L. (L.) major</i>	237
	ANEXO 8 - Curva dose-resposta correspondentes à inibição de crescimento parasitário para as formas tripomastigotas de <i>T. brucei</i>	241

ANEXO 9 – Valores dos descritores calculados para os compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos	256
ANEXO 10 – Gráficos de dispersão dos descritores moleculares calculados <i>versus</i> atividade biológica (pIC ₅₀) frente à forma promastigota de <i>L. (L.) infantum</i>	266
ANEXO 11 -Valores absolutos de coeficiente de correlação de Pearson para o conjunto T e L	268
ANEXO 12 - Script utilizado para cálculo do coeficiente de Tanimoto	270

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Leishmaniose

1.1.1 *Leishmania* spp: características morfológicas e ciclo evolutivo

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários incluídos na família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastidae*, gênero *Leishmania* e subgênero *Leishmania* e *Viannia*. São organismos parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, macrófagos, principalmente. Clinicamente, traduzem-se em parasitose complexa e diversificada, com diversas espécies de parasitas que podem ser transmitidas para o ser humano pelo inseto flebotomíneo (HANDLER *et al.*, 2015).

Também conhecidos como “mosquito-palha” e “tatuquira”, os flebotomíneos são hospedeiros naturais de vários micro-organismos e se comportam como vetores (hospedeiros invertebrados) dos agentes etiológicos responsáveis pela leishmaniose. Pertencentes à ordem *Diptera*, família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*, esses pequenos insetos, raramente maiores que 3 mm, apresentam coloração amarelada, corpo pequeno e piloso, asas que se mantêm eretas sobre o corpo em formato de “V” característico quando posados e voo saltitante. Os insetos adultos de ambos os sexos se alimentam dos açúcares de plantas, entretanto as fêmeas apresentam hábitos hematofágicos, necessários para a maturação dos ovos. Em geral, os flebotomíneos são altamente suscetíveis à desidratação, portanto, costumam se alimentar durante o crepúsculo e à noite, abrigando-se durante o dia (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; VILELA *et al.*, 2014).

Os vetores dípteros podem ser pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, distribuídos geograficamente pelo Velho e Novo Mundo, respectivamente. Existem cerca de 400 espécies do subgênero *Lutzomyia* nas Américas, dentre as quais 20 são consideradas vetores comprovados do parasita. No Brasil, as principais espécies transmissoras são *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. Wellcomei*, *Lu. Migonei* e *Lu. Longipalpis*. Vale ressaltar, que a espécie *Lu. Longipalpis* se constitui como o principal vetor para a leishmaniose visceral, a forma mais letal da doença (BRASIL, 2017a; SANTOS *et al.*, 2019).

Quanto ao seu ciclo evolutivo, o parasita apresenta duas formas morfológicas principais: a forma promastigota, encontrada de forma extracelular no trato digestor dos hospedeiros invertebrados, e a forma amastigota, de vida intracelular obrigatória,

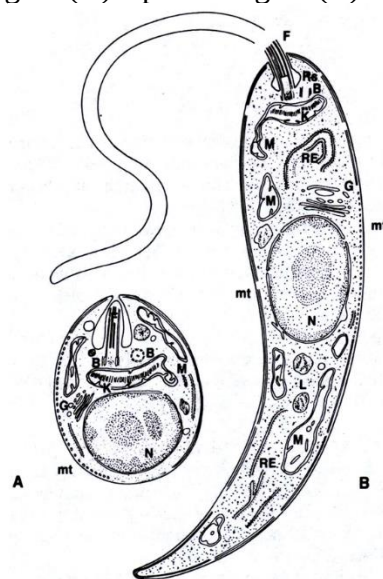
encontrada principalmente dentro do fagolisossomos, estrutura formada pelo lisossoma e fagossoma, presente nos hospedeiros vertebrados (Figura 1) (REY, 2008; RODRIGUEZ *et al.*, 2018).

As formas promastigotas se desenvolvem em diferentes regiões do trato intestinal do flebotomíneo. Dessa forma, a diferenciação entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* se dá justamente pela localização no intestino em que ocorre o desenvolvimento dos parasitas. Os parasitas do subgênero *Viannia* se desenvolvem no intestino posterior e migram para o intestino médio e anterior do inseto. Em relação ao subgênero *Leishmania*, os promastigotas se desenvolvem somente entre o intestino médio e o anterior (AKHOUNDI *et al.*, 2016; LAINSON, 2010). Dessa maneira, ainda no intestino do vetor, o parasita passa por vários estágios morfológicos até se transformar em promastigotas metacíclicos, a forma infecciosa da *Leshmania* (ANVERSA *et al.*, 2018; BATES; ROGERS, 2004).

Quanto à morfologia, os promastigotas apresentam forma alongada, com um longo flagelo livre que emerge da região anterior do parasita, e extremidade posterior afilada. Podem apresentar tamanho variável entre 1,5 e 3 µm de largura e entre 16 e 40 µm de comprimento. Apresentam núcleo arredondado, localizado na região mediana da célula com o cinetoplasto localizado na extremidade anterior do núcleo, próximo à bolsa flagelar. A forma amastigota, por sua vez, apresenta formato ovoide, com flagelo curto e internalizado, com tamanho que varia de acordo com a espécie do parasita, núcleo arredondado, que ocupa um terço do corpo do amastigota, e cinetoplasto, localizado próximo à bolsa flagelar (CDC, 2015; SILVA *et al.*, 2014).

O cinetoplasto é uma estrutura característica de tripanossomatídeos da ordem *Kinetoplastidae* e apresenta aspecto baciliforme, reto ou curvado, posicionado próximo à base do bolso flagelar, presente nas formas promastigotas e amastigotas do parasita (REY, 2008). A estrutura se constitui de grande massa de DNA fibrilar (kDNA) mitocondrial, que representa 30% do DNA total da célula e é responsável por desempenhar funções relacionadas à respiração celular, condição vital para sobrevivência do parasita (CAVALCANTI; DE SOUZA, 2018).

Figura 1. Representação esquemática da ultraestrutura das fases evolutivas de amastigota (A) e promastigota (B) de *Leishmania*.



N – núcleo; K – cinetoplasto; M – mitocôndria; RE – retículo endoplasmático; mt – microtúbulos; G – aparelho de Golgi; L – lisossoma; B – corpúsculo basal e F – flagelo.
Fonte: Rey (2008)

Quanto ao ciclo biológico, as espécies de *Leishmania* necessitam de dois tipos de hospedeiros para o seu desenvolvimento. Os flebótomos se comportam como hospedeiros invertebrados e os hospedeiros vertebrados incluem os seres humanos, cães e animais silvestres. As formas promastigotas presentes nas glândulas salivares das fêmeas infectadas dos vetores são inoculadas, durante a hematofagia, nos hospedeiros vertebrados.

Após a fagocitose dos parasitas pelas células do sistema mononuclear do hospedeiro (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas), a transformação da forma promastigota em amastigotas ocorre no interior do vacúolo parasitóforo dessas células. Já no interior dos macrófagos, a *Leishmania*, então na forma amastigota, comporta-se como parasita intracelular obrigatório e se reproduz por divisão binária dentro das células. Essa variante é a forma responsável pelas infecções e pode ocasionar lesões cutâneas e viscerais aos hospedeiros vertebrados. Se os hospedeiros infectados são novamente picados pelo flebotomíneo, os parasitas são transferidos para o intestino do inseto, transformando-se, novamente, em promastigotas, enquanto se preparam para novas infecções (CDC, 2020).

1.1.2 Epidemiologia e características clínicas da doença

A leishmaniose é uma zoonose primária que apresenta como reservatório o cão silvestre, as raposas e os marsupiais. Em ambientes peridomésticos, o cão doméstico passa a ser o principal reservatório e grande fonte de transmissão de *Leishmania* nas Américas. Além disso, humanos também funcionam geralmente como reservatório secundário, a não ser em países com situação de transmissão antroponótica, isto é, situação em que a transmissão ocorre de pessoa para pessoa, assim, nesse caso, os seres humanos passam a se constituir como o principal reservatório para o vetor flebotomíneo. Tais situações de transmissão são encontradas em países como a Índia e o leste da África (CONCEIÇÃO-SILVA; FÁTIMA CONCEIÇÃO-SILVA, 2014; TABBABI, 2019).

A leishmaniose apresenta duas manifestações clinicamente distintas, a leishmaniose tegumentar (LT) e a visceral (LV), esta também conhecida como calazar. A LT ainda pode se desdobrar em manifestações clínicas mais severas, sendo classificada como leishmaniose mucocutânea/mucosa (LM). A forma clínica tegumentar é a forma de acometimento mais prevalente da doença e a forma visceral, a mais grave, pode ser fatal se não tratada (VASIEVICH *et al.*, 2016; WHO, 2016a).

Classificada como doença negligenciada, assim como a malária, a doença de Chagas, a dengue e outras (DNDi, 2014), a leishmaniose é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes endemias do mundo, devido ao alto coeficiente de detecção, além da capacidade de produzir deformidades importantes (BRASIL, 2014). No Brasil, a diversidade de biomas e climas decorrente da ampla extensão territorial aliada à situação de iniquidade social e urbana, tornam a população altamente vulnerável a doenças parasitárias (BRASIL, 2019).

Dessa maneira estima-se que, atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas, em mais de 98 países, com risco de contrair a doença. Cerca de 1 milhão de casos são reportados anualmente, sendo cerca de 90 mil casos de LV e 600 mil a 1 milhão de LT. Em 2017, o Brasil foi o país mais afetado na América Latina, pois reportou cerca de 4.297 novos casos de LV (WHO, 2020).

A maioria dos casos de LT acontece nas Américas, Ásia, Mediterrâneo e Oriente Médio. Em 2018, 85% dos novos casos de LT aconteceram no Afeganistão, Argélia, Brasil, Bolívia, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão e Tunísia. Quanto à LV, os casos se concentram principalmente no Brasil, Índia e leste da África (WHO, 2019, 2020).

Nas Américas, foram reportados cerca de 900 mil casos de leishmaniose tegumentar e mucocutânea entre 2001 e 2017 e cerca de 60 mil casos de LV. Entre os países endêmicos,

o Brasil reúne o maior número de casos da doença (PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION; ORGANIZATION, 2019). Segundo o Ministério da Saúde, nas últimas duas décadas, somaram-se 48.455 casos de LV, que ocorreram, principalmente, na Bahia, no Ceará, no Maranhão e no Piauí (BRASI, 2014a).

No país, a leishmaniose se tornou um problema crescente de saúde pública. A doença que apresentava outrora um caráter rural agora vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte, apresentando ampla distribuição geográfica nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (MADALOSSO *et al.*, 2012; WERNECK, 2014). Inclusive, ambas as formas de leishmaniose estão incluídas na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública do Ministério da Saúde, tendo casos reportados em todos os estados do país (BRASIL, 2020).

Conforme as mudanças do habitat natural das espécies envolvidas no ciclo de transmissão da leishmaniose e o processo de urbanização, fatores agravantes foram agregados à doença. Entre eles, um terço dos indivíduos infectados são crianças com menos de dois anos, que rapidamente desenvolvem o quadro grave com elevados níveis de complicações, como infecções bacterianas e outras consequências (COSTA; COSTA, 2014; LAULETTA; CUNHA; QUEIROZ, 2016).

A forma clínica da doença humana varia, sobretudo, de acordo com a região geográfica, envolvendo diferentes espécies vetores, reservatórios e espécies de *Leishmania*, tanto do subgênero *Viannia* quanto do subgênero *Leishmania*. Mais de 50 espécies de *Leishmania* foram identificadas mundialmente e, entre elas, as espécies causadoras de LV são *L. (L.) donovani* na Índia e na África Oriental e *L. (L.) infantum* nas demais regiões. Na Europa, Ásia e África as espécies responsáveis pelos casos de LT são as *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) infantum* (SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA, 2020; WHO, 2016b).

Além das espécies de *Leishmania* identificadas no chamado “Velho Mundo”, no Brasil são atualmente reconhecidas 8 espécies do parasita que apresentam relevância médica. As espécies do parasita são pertencentes ao subgênero *Viannia* (V) e *Leishmania* (L), que são as: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (L.) infantum* (Tabela 1) (ANVERSA *et al.*, 2018; BRASIL, 2017; STEVERDING, 2017).

Tabela 1. Espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose no Brasil.

Leishmaniose Tegumentar				Leishmaniose Visceral
Cutânea localizada	Cutânea disseminada	Mucosa	Cutânea difusa	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonenses</i>	<i>L. (L.) infantum</i>
<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) amazonenses</i>		
<i>L. (V.) guyamensis*</i>		<i>L. (V.) guyanensis*</i>		
<i>L. (V.) lainsoni*</i>				
<i>L. (V.) lindenbergi*</i>				
<i>L. (V.) shawi*</i>				
<i>L. (V.) naiffi*</i>				

* Espécies menos frequentes.

Fonte: ANVERSA *et al.*, 2018; BRASIL, 2014, 2017.

O Brasil é considerado o país com maior prevalência de casos de leishmaniose visceral e tegumentar das Américas, além de apresentar a maior variedade de espécies dermatópicas. As principais espécies responsáveis pelas manifestações clínicas da LT em humanos são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyamensis* (BRASIL, 2017). Além delas, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* que são menos frequentemente isoladas de pacientes com LT, principalmente nas regiões do Norte e Nordeste do país (ANVERSA *et al.*, 2018; GUIMARÃES-E-SILVA *et al.*, 2017).

A leishmaniose visceral em humanos no Brasil e nas Américas, por sua vez, é causada pela espécie *Leishmania (L.) infantum* (BRASIL, 2014; WHO, 2018). O parasita foi previamente identificado como uma nova espécie denominada de *Leishmania (L.) chagasi*, mas que a partir de investigações subsequentes reportadas na literatura, é, atualmente, considerado sinônimo para *L. (L.) infantum*. A *L. (L.) chagasi* foi primeiro reportada como agente causador da leishmaniose visceral nas Américas por Cunha e Chagas (CUNHA; CHAGAS, 1937), mas, após estudos de comparação do material genético de cepas isoladas na América do Sul com cepas de *L. (L.) infantum* isoladas de áreas endêmicas do Mediterrâneo, foi demonstrado que ambas são indistinguíveis (BENCHIMOL, 2020; MAURICIO *et al.*, 1999; STEVERDING, 2017).

Como mencionado, as manifestações clínicas das leishmanioses dependem das diferentes espécies do parasita envolvidos. De maneira que, não só apresentam diferenças entre as infecções que ocorrem nas Américas, Europa, África e Ásia, como também o curso da infecção pode ser definido por uma série de fatores relacionados ao parasita, ao vetor e ao hospedeiro (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; WHO, 2020).

Fatores relacionados ao vetor dependem da sua competência vetorial, isto é, fatores fisiológicos e bioquímicos dos flebotomíneos que influenciam na sobrevivência do parasita no interior do tubo digestório dos insetos. (RANGEL *et al.*, 2018; VILELA *et al.*, 2014). A população de flebotomíneos também é fortemente afetada pelas mudanças climáticas, como alterações de temperatura, umidade e precipitação pluviais; o que influencia sua distribuição, seu metabolismo e as interações parasita-vetor. De fato, no Brasil observa-se maior distribuição geográfica dos casos de leishmaniose tegumentar e visceral devido às mudanças de comportamento dos vetores. Acredita-se que esse fenômeno ocorre devido à expansão desordenada das cidades que agora ocupam o habitat natural dos insetos, o que resulta na urbanização do vetor e, conseqüentemente, na disseminação da doença (ROMA *et al.*, 2017; SHAW; RANGEL, 2018).

Entre os fatores relacionados ao parasita, podemos destacar a virulência da espécie envolvida, a forma evolutiva e a concentração inicial inoculada de promastigotas metacíclicos na picada do vetor infectado (CONCEIÇÃO-SILVA; LEITE-SILVA; MORGADO, 2018; CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2019). Além disso, a sobrevivência e a persistência da *Leishmania* no organismo dependem de diversos mecanismos de escape do sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro. Entre eles, a inibição da cascata de ativação do sistema complemento, um dos primeiros fatores da resposta imune que interagem com o parasita. O parasita é capaz de evitar a lise por meio das glicoproteínas e açúcares (lipofosfoglicano – LPG e gp63) presentes em sua membrana (McCONVILLE MJ, SCHNUR LF, JAFFE C *et al.*, 1995).

Estão relacionados aos fatores competentes ao hospedeiro o estado nutricional, comorbidades, faixa etária e a habilidade do sistema imune em responder adequadamente à presença do parasita (CONCEIÇÃO-SILVA; LEITE-SILVA; MORGADO, 2018; CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2019). Em casos de leishmaniose visceral, pacientes com AIDS que já se encontram em estado imunocomprometido podem apresentar a parasitose como uma infecção oportunista, já que ambas as doenças compartilham do mesmo mecanismo imunopatológico, ou seja, através do comprometimento das células dendríticas e macrófagos. Em casos de coinfeção HIV-

Leishmania os pacientes apresentam rápida progressão de ambas as doenças com diminuição da expectativa de vida (LAULETTA; CUNHA; QUEIROZ, 2016).

Sabendo disso, a classificação das diversas formas de LT é baseada no quadro clínico e aspecto morfológico das lesões, que, por sua vez, sofrem influência da resposta imune do hospedeiro. Em humanos, a LT apresenta um espectro de formas clínicas que pode se manifestar como lesões cutâneas únicas em áreas localizadas, múltiplas, disseminadas e lesões cutâneo mucosas (AZEREDO-COUTINHO; MENDONÇA, 2014; BRASIL, 2017a).

A forma cutânea clínica mais branda é a leishmaniose cutânea localizada, caracterizada por úlceras (uma a dez) que se apresentam com bordas em moldura, de coloração rubra e alta parasitemia. Tais úlceras se desenvolvem no local de inoculação do parasito, em um período de incubação variável entre quinze dias a três meses. Tal quadro clínico pode apresentar cura espontânea, decorrente da eficácia da resposta imune do hospedeiro, além da resposta ao tratamento medicamentoso. A leishmaniose difusa cutânea localizada pode evoluir para cura clínica em até 95% dos casos (HASHIGUCHI *et al.*, 2016).

Uma das formas clínicas da leishmaniose tegumentar pode apresentar a forma anérgica, isto é, caracterizada por ausência da resposta imune específica e produção de antígenos. A leishmaniose difusa é uma rara manifestação da leishmaniose, caracterizada por lesões nodulares disseminadas, sem ulceração, porém com alta parasitemia, isto é, rico em formas amastigotas. A leishmaniose difusa, inclusive, era inicialmente confundida com hanseníase virchowiana (SILVA, 1970), devido ao teste negativo baseado na produção de antígenos, conhecido como teste intradérmico de Montenegro (HASHIGUCHI *et al.*, 2016).

A leishmaniose disseminada ocorre quando a infecção se desenvolve de forma atípica, acarretando manifestação cutânea bem mais severa. Caracteriza-se pela presença de múltiplas lesões, em geral, em mais de uma dezena, podendo chegar a centenas, distribuídas pelo corpo do hospedeiro (HASHIGUCHI *et al.*, 2016).

A leishmaniose mucosa, por sua vez, pode ser caracterizada por forte resposta pró-inflamatória (forma hiperérgica) e é considerada uma das formas mais graves da doença, causada pela reativação da infecção latente em geral, alguns anos após a lesão cutânea primária. A doença é associada à resposta inflamatória intensa do hospedeiro e segue um percurso crônico, causando lesões nos lábios, palato mole e partes moles do nariz,

podendo produzir uma doença inflamatória fatal (AZEREDO-COUTINHO; MENDONÇA, 2014; BRASIL, 2017a).

As manifestações clínicas associadas com a LV, forma mais grave da doença, demonstra sintomatologia variável e, em casos de falta de diagnóstico e tratamento adequados, pode evoluir para óbito em quase 100% dos casos. A LV apresenta período de incubação entre 10 dias e 24 meses e caracteriza-se pela proliferação dos parasitas preferencialmente em órgãos e vísceras do sistema linfo-hematopoiético (fígado, gânglios, baço e medula óssea), podendo estar presente em outros órgãos, como rim e pulmão. Os sintomas característicos da doença são perda de peso, febre diária, anemia, hemorragia, mucosas coradas e distensão abdominal causadas pela hepatoesplenomegalia (ANVERSA *et al.*, 2018). O óbito na fase avançada da doença é decorrente do quadro geral de pancitopenia, isto é, diminuição das três linhagens de células sanguíneas (anemia, leucopenia e plaquetopenia), alterações do sistema de coagulação (hemorragias) e supressão da resposta imune. Tais fatores são responsáveis pelas complicações comumente associadas às infecções bacterianas bronco-pulmonares e intestinais (BRASIL, 2020a; COSTA; COSTA, 2014).

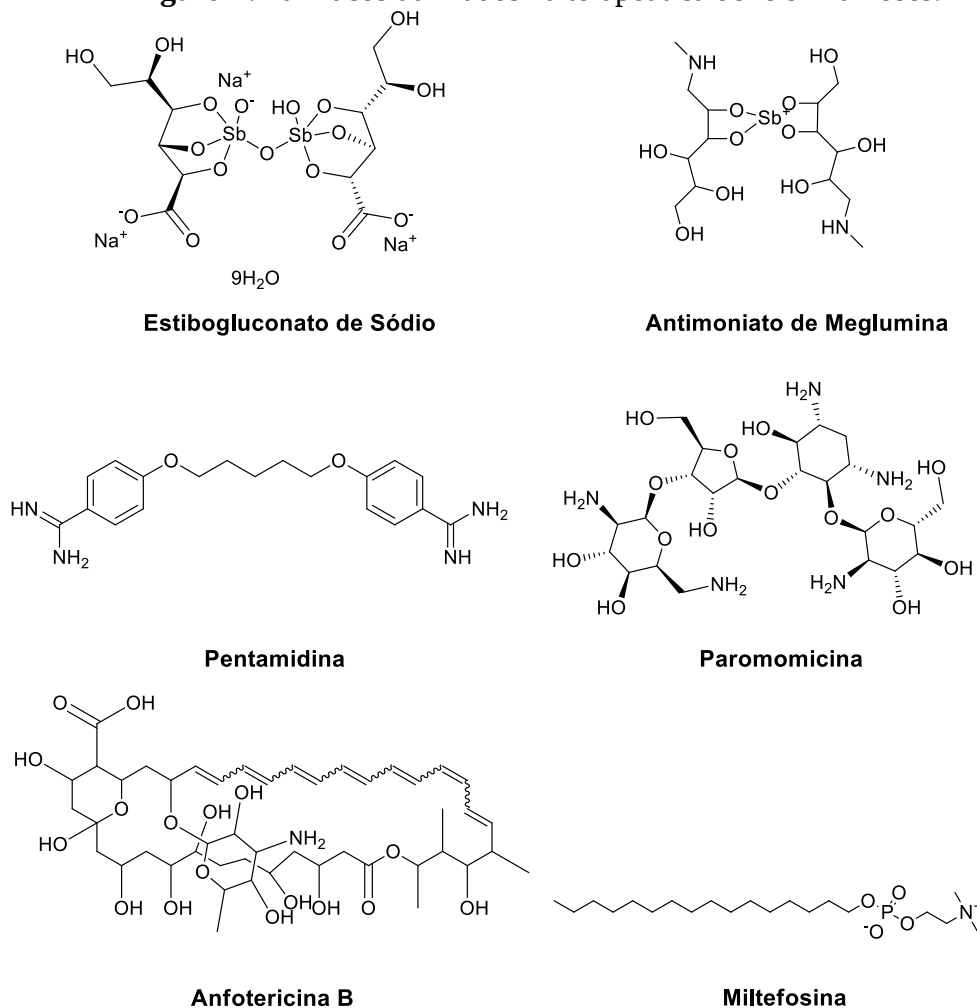
Dependendo da resposta imune do hospedeiro, a LV pode se manifestar de forma assintomática, ou seja, caracterizada pela ausência de sintomatologia, mas com sorologia positiva para *Leishmania*. Em contraste, a LV oligossintomática está relacionada com um quadro clínico discreto, de curta duração que frequentemente evolui para cura espontânea da doença; caracterizada por apresentar sintomas leves, como febre, e pequeno grau de hepatomegalia e/ou esplenomegalia. A forma clássica da doença é marcada por hepatoesplenomegalia volumosa, febre, entre outros, além do comprometimento do estado geral (BRASIL, 2014; CHAKRAVARTY *et al.*, 2019).

É importante notar que os programas de controle da leishmaniose no Brasil são baseados nas seguintes atividades: combate ao vetor flebotomíneo, diagnóstico laboratorial eficaz, eliminação do reservatório doméstico infectado e diagnóstico e tratamento precoces (BRASIL, 2020a). O tratamento medicamentoso recomendado é disponibilizado no âmbito do SUS e compõe a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename). Desse modo, compete ao Ministério da Saúde o financiamento, a aquisição e a distribuição dos medicamentos para essa finalidade (BRASIL, 2020b).

1.2 Terapia medicamentosa

O tratamento medicamentoso de uma doença infecciosa tão diversa como a leishmaniose é delicado. Tal parasitose é capaz de acometer populações geneticamente diversas, em diferentes regiões do planeta e está suscetível a diferentes perfis de resposta imune. Além disso, atinge também populações com diferente acesso à saúde e com questões intrínsecas particulares, como má nutrição e comorbidades, sem mencionar a influência da variabilidade de espécies existentes do parasito, o que ocasiona diferentes perfis de manifestações clínicas e, conseqüentemente, diferentes abordagens medicamentosas (SCHUBACH; SILVA, 2014).

Dessa forma, para o tratamento de leishmanioses no Brasil, a OMS e o Ministério da Saúde (MS) recomendam a aplicação do esquema medicamentoso composto pelos fármacos antimonial pentavalentes como fármacos de primeira escolha contra todas as manifestações clínicas da leishmaniose. Os fármacos considerados de segunda escolha no Brasil são a anfotericina B, pentamidinas e imunomoduladores (BRASIL, 2014b) (Figura 2). O tratamento medicamentoso apresenta duração de até 20 dias para a forma cutânea e, para a forma visceral, de até 40 dias. O critério de cura para todos os tratamentos é clínico, a partir da observação do desaparecimento dos sintomas. Inclusive, os protocolos preconizam o acompanhamento do paciente por 12 meses após o tratamento, a fim de garantir eliminação completa dos sintomas (WHO, 2010).

Figura 2. Fármacos utilizados na terapêutica de leishmanioses.

Fonte: elaborado pelo autor

1.2.1 Antimoniais pentavalentes e pentamidina

Recomendados pelo Ministério da Saúde (MS) como fármaco de primeira escolha para o tratamento tanto de LT e LV, os fármacos antimoniais pentavalentes (Sb^V), como o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®), são ainda considerados os mais eficientes para o tratamento de leishmanioses.

Esses fármacos são considerados leishmanicidas porque inibem a glicólise e a oxidação de ácidos graxos, os quais reduzem a produção de adenosina-trifosfato (ATP) das formas amastigotas de *Leishmania* (BRASIL, 2014, 2017a). Apesar do mecanismo de ação do antimônio não ser ainda completamente esclarecido, acredita-se que a eficácia esteja relacionada com a conversão da forma pentavalente em trivalente do fármaco, o que permite atravessar a membrana celular do hospedeiro, bem como do fagolisossoma, alcançando, dessa forma, os amastigotas intracelulares (SCHUBACH; SILVA, 2014).

Esses fármacos são contraindicados para pacientes com cardiopatia, nefropatia e hepatopatia devido aos seus efeitos adversos. Apesar disso, os antimoniais são eficazes em até 90% dos tratamentos, com exceção para casos de leishmaniose cutânea difusa (ANVERSA *et al.*, 2018; BARRETT; CROFT, 2012).

Casos insurgentes de resistência à terapia com antimoniais são comuns em vários países. Na Índia, por exemplo, foi relatado que mais de 60% dos pacientes não respondem mais à terapia contra leishmaniose visceral causada por *L. (L.) donovani*. Seu uso, consequentemente, não é mais recomendado na região (IMAMURA *et al.*, 2016; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). Apesar de sua eficácia continuar alta nas demais regiões do mundo, na América Latina a insurgência de novos casos de resistência à terapia começa a ser relatada. Rugani e colaboradores isolaram cepas de *L. (V.) brazilienses*, agente etiológico mais comum causadores de LT e LM no Brasil, que apresentavam resistência *in vitro* aos antimoniais (RUGANI *et al.*, 2018). Acredita-se que os casos crescentes de resistência estão relacionados às regiões de prevalência antroponótica, o alto nível de infecção, portanto, facilita a seleção de cepas resistentes e as dificuldades relacionadas ao tratamento (toxicidade, longa duração e alto custo) (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2017).

As pentamidinas são fármacos pertencentes às diamidinas aromáticas, utilizadas como segunda escolha para pacientes que não respondem à terapia com a utilização de antimoniais ou anfotericina B, notadamente em regiões endêmicas, especialmente Índia, Suriname e Guiana Francesa (BRASIL, 2017a). Dessa maneira, as limitações do tratamento estão relacionadas aos efeitos adversos apresentados, sendo contraindicados no caso de gestação, aleitamento, crianças menores de 1 ano, pacientes com diabetes *mellitus*, pacientes com insuficiência renal, hepática e doenças cardíacas (BRASIL, 2017a). Estudos indicam que em regiões endêmicas da Índia, em que as pentamidinas foram utilizadas como fármacos de segunda escolha, os casos de eficácia ao tratamento diminuíram de 95% para 70% após o período de uma década, o que indica o surgimento de cepas resistentes nesta região-(CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

1.2.2 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico macrocíclico considerado como fármaco de segunda escolha para o tratamento de LV e LT e primeira escolha para aqueles que não respondem ao tratamento com antimoniais, ou ainda, não toleraram seu uso prolongado pela via parenteral (BRASIL, 2014, 2017a). Esse antibiótico é formulado na forma de

desoxicolato (Fungizone®) e normalmente é utilizado para combater infecções fúngicas, mas apresenta alta eficácia contra casos de LV e LT (ROMERO *et al.*, 2017).

O mecanismo de ação da anfotericina B envolve a formação de poros na membrana plasmática do parasita, alterando o balanço iônico e causando a morte celular. O fármaco apresenta efeito seletivo sobre as formas promastigotas e amastigota, devido à presença do esterol predominante nas membranas do parasita, o ergosterol. Em contrapartida, nos mamíferos, o colesterol é o lipídio predominante nas membranas celulares (SANGSHETTI *et al.*, 2015).

No Brasil, o Ministério da Saúde dispensa para tratamento de leishmaniose tegumentar e visceral o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal (Ambisome ®) (BRASIL, 2017a). Ambas as apresentações se mostraram eficazes inclusive em cepas resistentes aos antimoniais. A apresentação lipossomal melhora a biodisponibilidade e as propriedades farmacocinética do medicamento, diminuindo a toxicidade e as reações adversas e apresentando o melhor índice terapêutico entre os fármacos da terapia atual (BALASEGARAM *et al.*, 2012). Nesse sentido, a anfotericina B lipossomal é indicada para pacientes que desenvolveram complicações devido ao tratamento prolongado com antimoniais ou outras patologias graves.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza uma única dose de anfotericina B lipossomal para pacientes com LV. Tal esquema tenta contornar as limitações do tratamento convencional, que requer internação hospitalar ou regime de hospital-dia, os efeitos adversos consideráveis do desoxicolato e o alto custo da terapia com as formulações lipídicas (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; SUNDAR *et al.*, 2015). Porém o esquema de dose única pode aumentar a emergência de casos de resistência à terapia. Apesar de baixo risco, casos de falha na terapia já são relatados em casos de coinfeção com HIV e em pacientes imunossuprimidos (EICHENBERGER *et al.*, 2017; MORIZOT *et al.*, 2016), bem como em regiões endêmicas da Índia (PURKAIT *et al.*, 2012; SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

1.2.3 Miltefosina

A miltefosina, apesar de ainda não disponibilizada no Brasil, é o primeiro fármaco reconhecido para o tratamento de leishmaniose para administração por via oral (BRASIL, 2016). Desde 2002, o fármaco foi registrado para o tratamento de LV na Índia como sendo o medicamento de primeira escolha e apresentou, inicialmente, resultados promissores (SUNDAR *et al.*, 2002). Ensaios clínicos no Brasil indicam que a miltefosina apresenta

eficácia comparável com os antimoniatos pentavalentes, atualmente considerados como fármacos de primeira escolha para infecções contra *L. (V.) brasilienses* e *L. (L.) guyanensis* (BRASIL, 2016). A importância do uso de um fármaco disponível em formulação oral se destaca, principalmente, para regiões de difícil acesso à saúde, o que contribui para adesão e consequente sucesso do tratamento.

Apesar dos efeitos adversos apresentados (efeitos gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia, além das propriedades teratogênicas apresentados pelo fármaco (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006)), o uso da miltefosina representa um grande avanço na terapêutica das leishmanioses. Infelizmente, após uma década de uso na Índia, a miltefosina vem apresentando aumento na falha da terapia (SUNDAR *et al.*, 2012). Além disso, casos de resistência à miltefosina também vêm sendo reportados na Índia em relação à LV (SRIVASTAVA *et al.*, 2017).

Desenvolvido como fármaco antineoplásico, a miltefosina é um análogo de alquilfosfocolinas que interfere na composição da membrana celular do parasita, inibindo o metabolismo de fosfolídeos por afetar a síntese de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (MOLLINEDO, 2014; RAKOTOMANGA *et al.*, 2007). Apesar da eficácia apresentada, a principal preocupação relacionada ao uso disseminado da miltefosina, além do potencial teratogênico, é o elevado tempo de meia vida do fármaco em humanos que varia de 150 a 200 horas (KIP *et al.*, 2018). Dessa forma, a presença de níveis subterapêuticos do fármaco durante semanas após o tempo padrão do tratamento, pode levar à emergência de cepas resistentes em regiões em que a miltefosina é amplamente utilizada (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017).

Tal risco é evidenciado pela fácil geração *in vitro* de cepas de *L. (L.) amazonensis* (COELHO *et al.*, 2014) e *L. (L.) donovani* (SHAW *et al.*, 2016) resistentes à miltefosina, por meio da utilização de simples método de aumento gradual da concentração do fármaco e, assim, da seleção dos parasitas resistentes. Além disso, esse fenômeno é reforçado pelos achados clínicos referentes ao isolamento de cepas de *Leishmania* naturalmente resistentes à miltefosina, encontrados em áreas endêmicas, como Índia e Brasil (CARNIELLI *et al.*, 2019; SRIVASTAVA *et al.*, 2017).

A resistência do parasita ao tratamento com miltefosina está associada à diminuição do acúmulo do fármaco nas células, relacionado com a diminuição da captação interna do fármaco para as células (*uptake*) ou aumento do efluxo. Entre as causas comprovadas, podem ser destacadas o aumento de efluxo mediado pela super expressão das proteínas transportadoras ABC (CASTANYS-MUÑOZ *et al.*, 2008), a inativação do transportador

putativo de miltefosina (*Leishmania miltefosine transporter* - LMT) (PÉREZ-VICTORIA; CASTANYS; GAMARRO, 2003) e/ou sua subunidade beta LRos3 (MONDELAERS *et al.*, 2016; PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2006).

O complexo LMT/Ros3 se encontra na membrana plasmática dos parasitas e é responsável pela translocação de fosfolípidos do meio exoplasmático para o citoplasma da *Leishmania*. Mutações nesse complexo de proteínas resultam na diminuição da captação, no aumento do efluxo e no metabolismo acelerado do fármaco, o que resulta na diminuição da suscetibilidade dos parasitas à miltefosina (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). Inclusive, a detecção de mutação ou deleção desses genes são utilizadas como marcadores de resistência em isolados clínicos de pacientes que apresentam falha terapêutica relacionados ao tratamento com miltefosina (SRIVASTAVA *et al.*, 2017).

1.2.4 Terapias alternativas

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo utilizado no tratamento da LV, na Índia, desde 2006, como alternativa em regiões endêmicas, para pacientes com contraindicação para os antimoniais ou, ainda, quando há dificuldade de acesso ao medicamento. Os efeitos adversos mais comuns são dor no local da injeção, ototoxicidade e aumento reversível das transaminases hepáticas. Comparável com a miltefosina, a resistência à paromomicina pode ser induzida *in vitro*, como já reportado para cepas de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* (HENDRICKX *et al.*, 2015; JHINGRAN *et al.*, 2009).

Sabe-se que os esquemas medicamentosos disponíveis são complexos, de alto custo e, além da toxicidade, são frequentemente prescritos de maneira incorreta. Tais fatores limitantes ao cenário terapêutico da leishmaniose contribuem para o abandono do tratamento e o aumento dos casos de resistência (PELISSARI *et al.*, 2011; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2017).

Ademais, também são tidos como limitantes à adesão ao tratamento: as vias de administração disponíveis, o tempo de tratamento prolongado, os efeitos teratogênicos dos fármacos, a contra-indicação para pacientes portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas, a severidade dos efeitos adversos, principalmente aqueles relacionados ao uso da anfotericina B (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Atualmente, não existe um único tratamento eficaz para todas as espécies e síndromes da leishmaniose e, ainda assim, o tratamento pode não resultar em cura parasitológica (COPELAND; ARONSON; CDC, 2015). Buscando-se superar essas

dificuldades, novas combinações de esquemas terapêuticos, estratégias de reposicionamento de fármacos e vacinas vêm sendo estudadas como alternativas (SUNDAR; SINGH, 2016; WHO, 2012).

Em relação às vacinas, infelizmente, até o presente momento, não há a existência delas contra leishmanioses para humanos, apesar de ser uma opção viável e foco ativo de pesquisas. Dificuldades relacionadas ao custo, complexidade dos antígenos, natureza do parasita e diferentes perfis de resposta imune apresentadas pelo hospedeiro se constituem como empecilho para o sucesso dessa alternativa terapêutica. A maioria das vacinas existentes se baseia na resposta imunológica adquirida humoral (baseada na produção de anticorpos neutralizantes em face da presença de antígenos), o que não se mostra como a melhor opção contra patógenos intracelulares que necessitam de resposta mediada por células, resposta imune celular, para seu controle (MENDONÇA, 2016). Além disso, os mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro apresentados pelo parasita dependem de alta variabilidade de antígenos, o que representa um desafio para o desenvolvimento de vacinas.

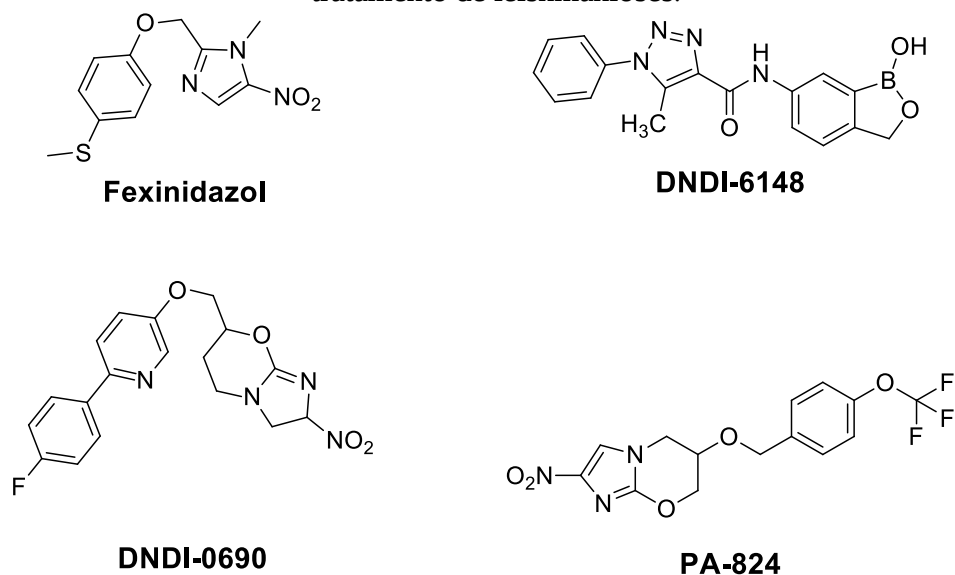
Apesar de estudos comprovarem que, em humanos, após a cura da lesão cutânea primária, as infecções subsequentes desencadeiam resposta imune mais robusta, também conhecida como “leishmanização”, ainda se mostram necessárias mais pesquisas para a produção de uma vacina segura, eficaz, estável e de baixo custo (CECÍLIO; OLIVEIRA; SILVA, 2018). Existem três formulações comerciais disponíveis para cães que demonstram proteção parcial contra a parasitose: a vacina recombinante Leish-Tec®, que utiliza o antígeno A2, específico para os amastigotas; Leishmune®, que se utiliza de uma fração purificada da glicoproteína FML, ligante de fucose-manose da *L. (L.) donovani*, e CaniLeish®, baseada em proteínas secretadas durante o crescimento de *L. (L.) infantum* (CAMPOS *et al.*, 2017; RODRIGUEZ *et al.*, 2018).

É notável a iniciativa do DNDi em realizar estudos com novas entidades químicas (NEQ) e reposicionamento de fármacos para o tratamento de leishmanioses. Entre eles, vem sendo estudado o fexinidazol, um nitroimidazol usado para o tratamento de tripanossomíase africana (HAT) (TORREELE *et al.*, 2010). O fármaco age como pró-fármaco, isto é, sua estrutura pode ser biotransformada por ação química ou enzimática antes de exibir seus efeitos farmacológicos, contendo em sua estrutura grupamentos protetores utilizados de forma a eliminar ou alterar propriedades indesejadas (ABET *et al.*, 2017). Dessa forma, o fexinidazol causa danos no DNA, nos lipídios e nas proteínas

devido à liberação de metabólitos citotóxicos, mediados pela ação de nitrorredutases (WYLLIE *et al.*, 2012).

Estudos *in vitro* e *in vivo* apontam que o fexinidazol apresenta ação contra *L. (L.) donovani* e está atualmente em estudos clínicos de fase II na Índia (SUNDAR; SINGH, 2016). Alternativamente, outras NEQ também estão sendo estudadas e se encontram em diferentes etapas de estudos clínicos, como os candidatos DNDI-6148 (oxaborol), DNDI-0690 (nitroimidazol) e PA-824 (nitroimidazol) (DNDI, 2017; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2017). As estruturas químicas do fexinidazol e dos compostos candidatos à fármacos desenvolvidos pelo DNDI (DNI-6148, DNDI-0690 e PA824) estão ilustradas na Figura 3.

Figura 3. Estruturas químicas dos candidatos à fármacos em estudo para o tratamento de leishmanioses.



Fonte: elaborado pelo autor

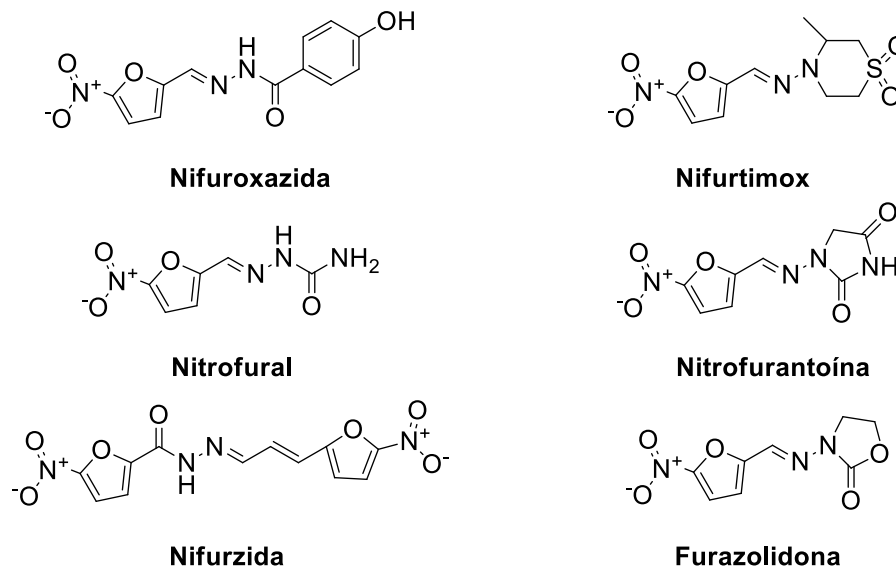
Diante desse cenário, soma-se à emergência de casos de resistência a vários fármacos da terapia (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2017), a necessidade da busca incessante por novos candidatos a fármacos, com ênfase em menor toxicidade aliada à melhor eficácia (HOTEZ *et al.*, 2016). Baseado nesse cenário de necessidade urgente, foram iniciados, em nosso grupo de pesquisa, a verificação do potencial leishmanicida dos compostos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos.

1.3 Derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos

Os derivados nitrofurânicos são uma classe promissora de fármacos, primariamente conhecidos pela sua atividade antimicrobiana, sendo eficazes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988; TAVARES; PENNA; AMARAL, 1997; MASUNARI; TAVARES, 2007; ISHII et al., 2011; ANDRADE et al., 2020; SQUADRITO; PORTAL, 2020). Além disso, também apresentam ação antifúngica, antiparasitária e antineoplásica (BOT et al., 2013; HRISTOVA-AVAKUMOVA et al., 2017; KAISER et al., 2015; WYLLIE et al., 2016a).

A descoberta do potencial antibacteriano dos derivados nitrofurânicos pode ser rastreada desde a década de 40 do século XX (DODD et al., 1944). Em seguida, uma série de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos com ação antibacteriana foram utilizados na terapêutica humana e veterinária. Seguindo-se a linha estrutural, contando com a presença do 5-nitro furano como principal grupamento farmacofórico, os seguintes fármacos foram, então, sintetizados: nifuroxazida (Passifuril®), nifurtimox (Lampit®), nitrofurantoína (Macrofantina®), furazolidona (Giarlam®) e nitrofurais (Furacin®) (Figura 4) (BAILLY, 2019).

Figura 4. Estrutura química da nifuroxazida (NF) e fármacos 5-nitro furano relacionados.



Fonte: elaborado pelo autor

Desde a década de 50 do séc. XX, foi estabelecido que compostos contendo o grupamento nitrofurano apresentavam atividade experimental contra a *T. cruzi*. Nesse período, foi estabelecido que o fármaco nitrofurais (nitrofurazona) (5-nitro-2-furaldeído

semicarbazona), antibacteriano de uso tópico, apresentava efeito *in vivo* em camundongos infectados com *T. cruzi* e *T. rhodesiense* (BAKER, 1959; DODD, 1946).

Estudos subsequentes utilizando a nitrofurazona como composto protótipo identificaram o potencial dos fármacos nifurtimox e benznidazol para o tratamento da doença de Chagas. Vale salientar que, até o presente momento, esses são os únicos disponíveis como terapia medicamentosa para a doença (PATTERSON; FAIRLAMB, 2018).

Sabe-se que o nifurtimox (Lampit®) (4-(5-nitrofurfurilideno)-amino-1,1-dióxido-3-etiltiomorfolina) é um fármaco nitrofurânico utilizado como primeira linha para o tratamento de doença de Chagas e tripanossomíase africana desde a década de 70 do séc. XX, e que o benznidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) é um fármaco que apresenta eficácia somente em estágios agudos da doença de Chagas (MEYMANDI *et al.*, 2018). Ambos os fármacos nitro-heterocíclicos são considerados pró-fármacos e requerem ativação por nitrorredutases para exercer o efeito antiparasitário (HALL; BOT; WILKINSON, 2011; PATTERSON; WYLLIE, 2014).

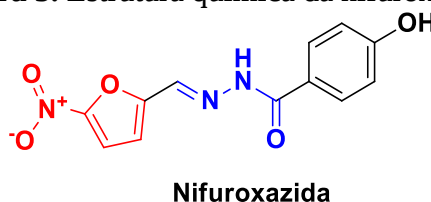
Seguindo-se à descoberta do nifurtimox e do benznidazol para o tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos, outros derivados nitrofurânicos foram sintetizados e estudados desde então. Entre os fármacos nitrofurânicos destacados, a nifuroxazida (5-nitro-2-furfurilideno-4-hidroxibenzidrazida) é utilizada para combater infecções bacterianas intestinais desde 1966 e foi amplamente utilizada na década de 70 do séc. XX. O fármaco apresenta absorção por via oral e é metabolizado pelo fígado, mas seu uso como antimicrobiano foi diminuído, devido ao surgimento de fármacos mais potentes e com menor toxicidade (BEGOVIC *et al.*, 2016; BAILLY, 2019; ZUMA; AUCAMP; N'DA, 2019). Os efeitos tóxicos mais comumente relacionados a esse derivado nitrofurânico são anorexia, diarreia, náuseas, estomatites e dermatites (KATZUNG, 2007; THOTA *et al.*, 2018; “Towards better patient care: Drugs to avoid in 2018”, 2018).

A nifuroxazida também teve seu efeito antiparasitário explorado, Blumenstiel (1999) e colaboradores identificaram que o fármaco, juntamente com a nifuroxime e a nifurprazina, apresentavam atividade considerável em ensaios *in vitro* contra *T. cruzi* e *T. brucei*. Inclusive, em relação à concentração que induziu metade do efeito máximo (ED₅₀) contra *T. cruzi*, a nifuroxazida (ED₅₀ < 1 µM) demonstrou maior potencial inibitório do que o nifurtimox (ED₅₀ = 3 µM) (BLUMENSTIEL *et al.*, 1999). Mais recentemente, Kaiser (2015) e colaboradores identificaram a nifuroxazida em meio a outros derivados

nitrofurânicos como eficaz contra os parasitas *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. (L.) donovani*, apesar de apresentar maior citotoxicidade que os fármacos de referência, como o nifurtimox (KAISER *et al.*, 2015).

A estrutura química da nifuroxazida, assim como os demais derivados nitrofurânicos, apresenta estruturas farmacofóricas compostas pelo grupo N-acilhidrazona (HC=N-N-C=O) ligado ao carbono 2 do anel 5-nitrofurânico (LEMKE; WILLIAMS, 2008), de forma a conferir ao arcabouço químico da nifuroxazida (Figura 5) potencial como composto protótipo a ser utilizado para modificação molecular e planejamento de novos análogos estruturais.

Figura 5. Estrutura química da nifuroxazida.



Em destaque os grupamentos farmacofóricos 5-nitro furano (vermelho) e N-acilhiidrazona (azul).
Fonte: elaborado pelo autor

Nas últimas duas décadas, o grupo funcional N-acilhidrazona foi reportado, em literatura, em diversos compostos envolvidos na busca de novos *hits*, com ação em vários tipos de alvos moleculares, a fim de garantir amplo espectro de aplicações biológicas, tais como atividade antibacteriana, antiparasitária, anti-inflamatória, anticonvulsivante, analgésica, antineoplásica, entre outras (RANDO *et al.*, 2010; DA COSTA *et al.*, 2012; HERNÁNDEZ *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2020; CORDEIRO *et al.*, 2020;; GUO *et al.*, 2020;; ROZADA *et al.*, 2020). Sua versatilidade se dá pela facilidade do processo de síntese, obtido pela reação de condensação entre hidrazinas e aldeídos ou cetonas (PATRICK, 2013).

As hidrazonas são formadas pelo grupamento NNH₂ no lugar do grupamento carbonila de cetonas ou aldeídos e apresentam a ligação azometínica (-HC=N-R) conjugada com um par de elétrons livres no nitrogênio. O carbono azometínico apresenta tanto natureza eletrofílica quanto nucleofílica (os nitrogênios são por natureza nucleofílicos) (SAINI; GUPTA, 2018). Os derivados N-acilhidrazona parecem apresentar resultados de ensaios de estabilidade e farmacocinética promissores para as pesquisas de planejamento e desenvolvimento de fármacos, especialmente em relação a ensaios *in vitro* de estabilidade metabólica e perfis metabólicos *in vivo* (THOTA *et al.*, 2018).

Apesar de ser pouco provável que a própria nifuroxazida seja reposicionada como agente antiparasitário (BAILLY, 2019), os resultados prévios reportados em literatura demonstram a potencialidade dos derivados nitrofurânicos em geral como classe química com ação antiparasitária. Tornando-se, assim, viável a exploração do arcabouço químico da nifuroxazida para estudos de planejamento e desenvolvimentos de novos fármacos, menos tóxicos e mais potentes (TAVARES; PENNA; AMARAL, 1997; MASUNARI; TAVARES, 2006; MASUNARI *et al.*, 2009; ISHII *et al.*, 2011; JORGE *et al.*, 2012; PALACE-BERL *et al.*, 2018; PETERSON, 2018; THOTA *et al.*, 2018; ZUMA; AUCAMP; N'DA, 2019).

Na literatura, são encontrados vários estudos acerca de estruturas químicas derivadas de nitro-heterocíclicos. Isso indica que o grupamento farmacofórico relacionado ao efeito anti-*kinetoplastídeo* não está limitado aos nitrofuranos e nitroimidazóis, mas engloba vários sistemas de anéis, como nitrothiazóis, nitrotiofenos e nitrobenzenos (PATTERSON; FAIRLAMB, 2018). Por exemplo, Santos Filho e colaboradores (2009) sintetizaram uma série de N-acilhidrazona oxadiazóis que apresentaram ação *in vitro* contra a forma tripomastigota e epimastigota de *T. cruzi*. Um estudo realizado por Hernandez e colaboradores (2010) identificou uma série de derivados tiazolilhidrazonas como inibidores da proteína cruzaina do *T. cruzi* (revisado em GUIMARÃES *et al.*, 2017). Já os derivados de 5-nitro-2-aminotiazol apresentam atividade contra a *T. brucei* e *T. cruzi*. O mecanismo de ação de tais compostos foi investigado quanto à sua capacidade de inibição das enzimas nitrorredutases, mas não obtiveram sucesso (PAPADOPOULOU *et al.*, 2016).

Além disso, Cerecetto e colaboradores investigam o potencial do esqueleto químico 5-nitro-2-furaldeído e outros compostos nitro-heterocíclicos há vários anos, identificando estruturas com potencial antiparasitário promissor, especialmente para doença de Chagas (CATALDO *et al.*, 2018; CERECETTO *et al.*, 1998; COUTO *et al.*, 2019; GONZÁLEZ *et al.*, 2020). Coimbra e colaboradores (2018) determinaram que a porção 5-nitrofurano de uma série de derivados hidrazônicos era crucial para atividade biológica contra promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonenses* e *L. (V.) braziliensis*.

No grupo de pesquisa de Tavares e colaboradores, várias séries de análogos estruturais da nifuroxazida foram estudados quanto a sua capacidade de inibir diversas cepas de *T. cruzi*, devido à similaridade deles com a estrutura do fármaco de referência, o nifurtimox. Paula e colaboradores (2009) identificaram que a porção azometínica

combinada com o grupamento 5-nitro-2-furano apresentava maior potência em relação ao grupamento 5-nitro-2-tiofeno (PAULA *et al.*, 2009).

Nessa mesma direção, Ishii (2011) e Jorge (2012) identificaram em estudos de relação estrutura-atividade (SAR) que os grupamentos químicos benzofuroxânicos e oxadiazolínicos também conferem atividade biológica contra *T. cruzi*. Inclusive, foram identificados compostos com eficácia superior ao fármaco de referência, o benznidazol (JORGE *et al.*, 2013). Compostos derivados do 5-nitro-2-furaldeído, os quais são formados pelos grupamentos 5-nitrofurano ligado à N-acilhidrazina, apresentam maior atividade anti-*T. cruzi*, principalmente contra a cepas clinicamente resistentes ao benznidazol (PALACE-BERL *et al.*, 2013, 2015, 2018).

Alguns compostos foram identificados como promissores por apresentarem atividade biológica contra a forma epimastigota de várias cepas de *T. cruzi* e alcançaram potencial até 40 vezes superior ao fármaco de referência (PALACE-BERL *et al.*, 2018), como os compostos 4- bifenil-N'-((5-nitrofuran-2-il) metileno) benzidrazida, 4-heptil-N'-((5-nitrofuran-2-il) metileno) e 4-heptoxi-N'-((5-nitrofuran-2-il) metileno). Os estudos de relação estrutura-atividade, por meio de análises quimiométricas, identificaram a influência das propriedades hidrofóbicas, levando-se em consideração o coeficiente de partição octanol/água calculado – ClogP, as propriedades eletrônicas (momento dipolo) e as propriedades estereoquímicas (superfície acessível ao solvente dos átomos hidrofóbicos – ASAH) (PALACE-BERL *et al.*, 2013, 2015, 2018).

Os compostos derivados do 5-nitro-2-furaldeído foram avaliados também quanto a sua atividade leishmanicida. Rando e colaboradores (2008) sintetizaram derivados 5-nitro-2-furaldeídos e 5-nitro-2-tiofênicos com ação contra as forma promastigotas de cepas de *L. (L.) donovani* (RANDO *et al.*, 2008), identificando a porção 5-nitro-tiofênica como a mais potente.

Alguns compostos derivados 5-nitro-2-furaldeído apresentaram atividade também contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum* (SILVA *et al.*, 2016) e promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MENDONÇA *et al.*, 2019), inclusive sinalizando a possibilidade de estarem envolvidos nos mecanismos de estresse oxidativo e apoptose dos parasitas.

1.3.1 Nitrorredutases

Apesar de a descoberta do potencial dos compostos nitrofurânicos como agentes terapêuticos poder ser rastreada desde a década de 40 do séc. XX (DODD *et al.*, 1944), o

seu mecanismo de ação não está completamente elucidado. A princípio, entendia-se que o mecanismo de ação dos derivados nitrofurânicos era decorrente principalmente da biorredução enzimática do grupamento nitro em condições anaeróbicas, o que ocasionava a formação de radical nitroânion. Os radicais livres provenientes da reação em meio intracelular provocariam a desestabilização da membrana celular, aumentando a permeabilidade ao composto e, consequentemente, elevando os danos causados pelo estresse oxidativo (PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009; VIODÉ *et al.*, 1999).

Pelos dados disponíveis, supõe-se que esses compostos são bioativados, levando à formação de radicais livres tóxicos que garantem a atividade desejada. Estudos com compostos nitrofurânicos sugerem que a ativação do anel 5-nitrofurânico é essencial para atividade biológica (BOT *et al.*, 2013; ZUMA; AUCAMP; N'DA, 2019). Acredita-se, assim, que a redução é promovida por enzimas nitrorredutases específicas dos patógenos (NTRs), o que resulta na formação de espécies eletrofílicas que desencadeiam lesões ao DNA, induzem o estresse oxidativo e inibem a biossíntese de RNA e, consequentemente, de proteínas (LE *et al.*, 2019).

Para tripanossomatídeos, o modo de ação dos derivados nitrofurânicos monocíclicos, nitroimidazóis e nitroimidazóis bicíclicos ainda não foi completamente elucidado. Mas se acredita que os compostos nitro-heterocíclicos agem como pró-fármacos e sofrem redução por meio da ação de nitrorredutases (NTR). Estudos já demonstraram, inclusive, que os fármacos nifurtimox, benznidazol e fexinidazol utilizados no tratamento da doença de Chagas, LV e HAT são metabolizados por essas enzimas (WILKINSON *et al.*, 2008; WYLLIE *et al.*, 2012).

As enzimas nitrorredutases são encontradas principalmente em bactérias, fungos (PETERSON *et al.*, 1979; ROLDÁN *et al.*, 2008) e em parasitas tripanossomatídeos; as NTR do tipo 1 (NTR 1) estão presentes em *Leishmania sp.*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* (HALL; BOT; WILKINSON, 2011; MONTENEGRO *et al.*, 2017; VOAK *et al.*, 2013) e em contraste, as nitrorredutases do tipo 2 (NTR 2) são encontradas nos parasitas *Leishmania sp.* e *T. cruzi*, mas não estão presentes em *T. brucei* (MEJÍA-JARAMILLO *et al.*, 2011; WILKINSON *et al.*, 2000; WYLLIE *et al.*, 2016a).

Em organismos tripanossomatídeos as nitrorredutases são classificadas em duas categorias, de acordo com a sensibilidade ao oxigênio demonstrada. As NTR do tipo 1 são insensíveis ao oxigênio e as NTR do tipo 2, por sua vez, são sensíveis ao oxigênio. Ademais, NADH, dinucleótido de nicotinamida e adenina, ou NADPH, fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, são utilizados nas reações catalisadas por NTRs

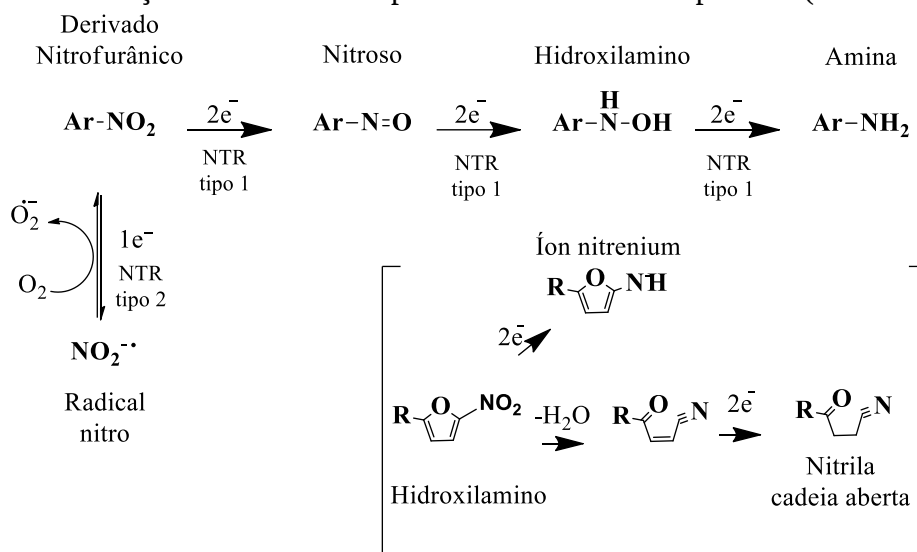
como cofatores de redução, além de FMN (mononucleotídeo de flavina) ou FAD (dinucleotídeo de flavina e adenina) como cofator (HALL; BOT; WILKINSON, 2011; WYLLIE *et al.*, 2016a).

As NTR 1 agem por meio de reações de redução dos dois elétrons do grupamento nitro presente nos derivados nitrofurânicos [ArNO₂], produzindo intermediários nitrosos [ArNO] (Reação 1), hidroxilamina [ArNHOH] (Reação 2), até por fim, a formação de amina [ArNH₂] (Reação 3) (HALL *et al.*, 2010; HALL; BOT; WILKINSON, 2011; VOAK *et al.*, 2013). Devido à sua instabilidade, a hidroxilamina além de ser reduzida em amina, pode ser metabolizada e formar íons nitreniums [ArN⁺H], que são capazes de causar dano ao DNA (SLAVOV *et al.*, 2018; ZUMA; AUCAMP; N'DA, 2019). Alternativamente, no caso de derivados nitrofurânicos, o intermediário hidroxilamino pode levar à clivagem do anel furânico, formando derivados nitrila [R-C≡N] saturados ou insaturados de cadeia aberta (Figura 6) (BOT *et al.*, 2010; PATTERSON; WYLLIE, 2014).



Por sua vez, as NTR do tipo 2 medeiam a redução de compostos nitroheterocíclicos [ArNO₂] por mecanismo que envolvem um elétron, levando à formação de radical nitro [ArNO₂•-]. Em condições aeróbicas, esse radical, de caráter instável, é eventualmente reoxidado e o grupo nitro é restaurado [ArNO₂]. O oxigênio molecular que participou da reação de reoxidação do pró-fármaco, por outro lado, gera o radical superóxido [O₂•-] (LE *et al.*, 2019; WYLLIE *et al.*, 2016a; WYLLIE; PATTERSON; FAIRLAMB, 2013).

Tal processo de regeneração dos pró-fármacos nitrofurânicos é também denominado “ciclo fútil” e a geração de espécies reativa de oxigênio promovem o estresse oxidativo e são responsáveis pelos efeitos tóxicos dos compostos nitro nos organismos (BODDU; PERUMAL; K, 2020; PITSAWONG; HOBEN; MILLER, 2014).

Figura 6. Redução de nitrofuranos por nitrorredutases do tipo 1 e 2 (NTR 1 e NTR 2).

Fonte: Adaptado de Patterson; Wyllie, 2014 e Hall; Bot; Wilkinson, 2011.

As enzimas nitrorredutases do tipo 1 são responsáveis pela ativação dos fármacos nitrofurânicos benznidazol, e nifurtimox (HALL; BOT; WILKINSON, 2011; PATTERSON; FAIRLAMB, 2018; PATTERSON; WYLLIE, 2014; WILKINSON *et al.*, 2008). A estrutura do benznidazol, após sofrer redução pela ação da NTR 1 de *T. cruzi* e *T. brucei*, forma o intermediário hidroxilamino que é posteriormente convertido em glioal, um dialdeído altamente tóxico (HALL; WILKINSON, 2012; TROCHINE *et al.*, 2014). A redução do grupamento nitro do nifurtimox, por outro lado, leva à quebra do anel furano, formando um intermediário nitrila insaturado de cadeia aberta (HALL; BOT; WILKINSON, 2011).

Os metabólitos resultantes da redução dos fármacos nitrofurânicos pela ação das nitrorredutases são responsáveis pelos efeitos antiparasitários. Para o nifurtimox, contra as formas tripomastigota de *T. brucei*, o metabólito nitrila apresentou efeitos tóxicos contra a forma tripomastigota do parasita (IC₅₀ = 5,3 µM), demonstrando, inclusive, atividade equipotente em relação ao pró-fármaco (IC₅₀ = 2,9 µM). Em contrapartida, o metabólito demonstrou efeitos citotóxicos superiores ao nifurtimox contra as células macrófagicas THP-1, o que indica que a seletividade do fármaco ao parasita é devida à bioativação seletiva dos parasitas tripanossomatídeos (HALL; BOT; WILKINSON, 2011).

Acredita-se que alguns mecanismos de resistências aos fármacos também estão associados a mutações dos parasitas relacionadas às nitrorredutases. Evidenciado por

estudos que demonstram que cepas de *T. brucei* resistentes ao nifurtimox apresentam resistência cruzada com fexinidazol (WILKINSON *et al.*, 2008; WYLLIE *et al.*, 2016b).

Dessa forma, as nitrorredutases presentes nos tripanossomatídeos se constituem como alvos terapêuticos ideais em pesquisas de planejamentos de novos candidatos à fármaco, pela sua capacidade de metabolizar nitrocompostos (PATTERSON; FAIRLAMB, 2018). Inclusive, as NTRs foram demonstradas como essenciais para o crescimento dos parasitas e para o estabelecimento e a manutenção das infecções em *T. cruzi*, *Leishmania* e *T. brucei* (MEJIA *et al.*, 2012; WILKINSON *et al.*, 2008; WYLLIE; PATTERSON; FAIRLAMB, 2013). Vale ressaltar que as enzimas nitrorredutases envolvidas na bioativação dos compostos nitro-heterocíclicos diferem de parasita para parasita e a extrapolação dos resultados deve ser interpretada com cautela (PATTERSON; FAIRLAMB, 2018).

Estimulados pelos fármacos nitrofurânicos aprovados para o tratamento dos parasitas tripanossomatídeos, o potencial quimioterápico de compostos nitro-heterocíclicos vem sendo estudado, apesar dos efeitos adversos atribuídos ao grupamento nitro. É de grande importância determinar se os compostos nitro-heterocíclicos em desenvolvimento são bioativados pelas enzimas nitrorredutases presentes nos tripanossomatídeos. Principalmente se considerarmos o potencial da terapia combinada para o tratamento de doenças parasitárias, como a combinação NECT (terapia combinada de nifurtimox-eflornitina) utilizada para o tratamento de HAT. Uma vez que é ideal que os fármacos não apresentem o mesmo mecanismo de ação, para que uma simples mutação no parasita não tornem a terapia ineficaz (FIELD *et al.*, 2017; PATTERSON; FAIRLAMB, 2018; PATTERSON; WYLLIE, 2014).

1.4 Planejamento e desenvolvimento de fármacos auxiliados por metodologias computacionais

O processo de descoberta e o desenvolvimento de fármacos pode ser dividido em três fases. Primeiramente, a fase de descoberta, na qual ocorre a identificação e validação do alvo, o desenvolvimento de ensaios, a identificação e otimização de compostos protótipos e a seleção de candidatos a fármacos. Em seguida, a fase de estudos pré-clínicos, em que são executados extensos estudos em animais e, por último, a fase de desenvolvimento clínico, na qual o composto selecionado é testado quanto à sua eficácia, efeitos colaterais e riscos potenciais em estudos com humanos (CAPPEL *et al.*, 2015; DAN; BHAKAT, 2015).

A parte que compete às pesquisas da área química-farmacêutica para o planejamento de novos candidatos à fármacos consiste, principalmente, nas etapas de descoberta (pesquisa e avaliação das moléculas candidatas) e desenvolvimento (ensaios pré-clínicos) (BARREIRO, 2009; ELEBRING; GILL; PLOWRIGHT, 2012; GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011; WALKER, 2011).

Sabe-se que o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é um processo longo e complexo que demanda alto investimento. Estima-se que, para o lançamento de um único fármaco no mercado, são gastos, em média, 12 a 15 de anos no processo de pesquisa e desenvolvimento, com elevados custos (PAUL *et al.*, 2010; PHRMA, 2016). Na última década, o custo para lançar uma única nova entidade química no mercado, após passar por todas as etapas de desenvolvimento de um fármaco novo, chega a mais de 1 bilhão de dólares (MULLARD, 2014; WOUTERS; MCKEE; LUYTEN, 2020).

Dentre as estratégias envolvidas no processo de planejamento de fármacos, destacam-se as metodologias auxiliadas por computador (*Computer-Aided Drug Design* - CADD). O planejamento racional de fármacos busca, sistematicamente, novas moléculas farmacologicamente ativas ou compostos precursores (*lead compounds*), podendo utilizar como ponto de partida o conhecimento das estruturas tridimensionais da macromolécula alvo ou de fármacos bioativos conhecidos. A partir da utilização das informações disponíveis e dos recursos computacionais, moléculas com a atividade biológica desejada podem ser obtidas (AMINPOUR; MONTEMAGNO; TUSZYNSKI, 2019). Tais estratégias aplicadas ao planejamento racional de fármacos buscam alternativas viáveis, mais rápidas e econômicas, ao processo de descoberta de um novo medicamento (GORE; JAGTAP, 2018).

Quando a estrutura do alvo molecular não é conhecida, as estratégias de planejamento de fármacos se voltam para o LBDD – *Ligand Based Drug Design*. Táticas baseadas na estrutura do ligante exploram as propriedades e características do substrato natural ou de séries de ligantes bioativos, correlacionando as diferenças estruturais presentes nas moléculas com suas atividades biológicas respectivas (KANAKAVETI *et al.*, 2020; LIN; LI; LIN, 2020). *Structure Based Drug Design* (SBDD), por outro lado, são abordagens de descobrimento e otimização utilizadas quando a estrutura dos alvos moleculares está disponível. As estratégias de síntese levam em conta como os ligantes reconhecem e interagem com as macromoléculas. O propósito dessa estratégia é a obtenção de ligantes com características eletrostáticas e estereoquímicas específicas,

obtendo-se, assim, alta afinidade com o receptor estudado (FERREIRA *et al.*, 2015; YU; MACKERELL, 2017).

Quanto mais informações sobre o sistema estudado estão disponíveis, tanto mais a chance de obter sucesso em projetos de pesquisa e obtenção de novos fármacos. A situação ideal é quando se conhece a estrutura do alvo complexando com ligantes, o que propicia o entendimento dos mecanismos envolvidos na ação do fármaco em nível molecular e submolecular (MONTANARI; GAUDIO, 2011). As estratégias baseadas no potencial das estruturas, sem o conhecimento completo dos mecanismos moleculares envolvidos, vêm ressurgindo na indústria farmacêutica. Essas estratégias são utilizadas principalmente em estudos de reposicionamento de fármacos e classes químicas que apresentam mecanismos não específicos, e se baseiam na busca por moléculas promissoras por meio do efeito fenotípico (efeito biológico) apresentado por elas (*Phenotypic drug screening*) (MOFFAT *et al.*, 2017).

Considerando-se as estratégias de desenvolvimento de fármacos baseados na estrutura dos ligantes (LBDD), em um estudo de planejamento e desenvolvimento de fármacos, é essencial conhecer as relações estrutura-atividade (*structure-activity relationships* - SAR) do conjunto de interesse. Tais relações podem ser determinadas qualitativamente ou quantitativamente, por intermédio de várias técnicas computacionais.

Para um conjunto de moléculas, determinados modelos matemáticos podem relacionar quantitativamente os descritores moleculares, isto é, o resultado final de um procedimento matemático, que transforma a informação química das moléculas em um número útil (TODESCHINI; CONSONNI, 2000) que pode ser correlacionado com a atividade biológica estudada (ALVES *et al.*, 2017; DUTTA *et al.*, 2015; KANAKAVETI *et al.*, 2020).

As propriedades calculadas utilizadas para a construção desses modelos, denominadas descritores moleculares, são resultantes de cálculos matemáticos que transformam informações químicas codificadas nas moléculas em valores numéricos (HIMMAT *et al.*, 2016). Essas propriedades podem ser classificadas quanto a sua dimensionalidade, refletindo diferentes tipos de representação estrutural. Em relação a uma estrutura química, descritores unidimensionais (1D) são baseados em propriedades físico-químicas inerentes à fórmula molecular, como massa molecular, refratividade molar e coeficiente de partição, entre outros; de caráter bidimensional (2D), que descrevem propriedades calculadas a partir da estrutura química 2D de uma molécula, como número de ligações e índices de conectividade; e de caráter tridimensional (3D),

baseados na conformação que a molécula se apresenta, tal como área acessível ao solvente e volume de van der Waals (MAMY *et al.*, 2015; TODESCHINI; CONSONNI, 2000).

Tendo como objetivo prever a potência de novos compostos *a priori* da síntese, os modelos de QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) clássicos tiveram início na década de 60 do séc. XX, com os trabalhos de Hansch & Fujita (1964) e Free-Wilson (1964). Tais modelos relacionavam os resultados de uma propriedade experimental (atividade biológica) com parâmetros (descritores) físico-químicos correspondentes às propriedades estruturais, eletrônicas, hidrofóbicas, estereoquímicas e termodinâmicas de moléculas análogas, de forma a identificar a intensidade que cada propriedade contribui para o estabelecimento da resposta biológica.

Avanços nos modelos de QSAR trouxeram a consideração quantitativa das relações estrutura-atividade em três dimensões (QSAR-3D), desenvolvido por Cramer na década de 80 do séc. XX (CRAMER; PATTERSON; BUNCE, 1988). Esse tipo de modelo é largamente utilizado em estudos de planejamento e desenvolvimento de fármacos e considera propriedades relacionadas com a conformação alinhada do conjunto de moléculas, de acordo com farmacóforo comum, proveniente das interações com a molécula alvo (receptor) (DUTTA *et al.*, 2015). Avanços adicionais aos modelos de QSAR trouxeram a consideração da liberdade de alinhamento e a flexibilidade conformacional do conjunto de moléculas e a observação do “tempo” como quarta dimensão (QSAR 4D), utilizando descritores de frequência de ocupação (HOPFINGER *et al.*, 1997).

Além dos modelos de QSAR, outras metodologias matemáticas permitem a avaliação das relações entre a estrutura química e a atividade biológica de um conjunto de moléculas. Tais técnicas, chamadas de quimiométricas, também permitem a conversão de grandes conjuntos de informações para o máximo de informação útil sob o ponto de vista químico, por meio de ferramentas matemáticas e estatísticas (FERREIRA, 2015).

A quimiometria engloba métodos de reconhecimento de padrões (classificação de variáveis) e métodos de regressão. Estes últimos envolvem a metodologia de regressão pelo método dos quadrados mínimos parciais (PLS – *partial least square*), método das componentes principais (PCR) e regressão linear múltipla (MLR) (BIANCOLILLO; MARINI, 2018).

Os métodos de reconhecimento de padrões, por sua vez, podem ser divididos em métodos supervisionados e não supervisionados. A análise exploratória de dados utiliza esses métodos aplicados a estudos de SAR, a fim de mais facilmente identificar os

parâmetros estruturais e as modificações estruturais que influenciam a atividade biológica de um conjunto de compostos (FERREIRA, 2015, 2002; SAINANI, 2014).

Em uma análise quimiométrica, o conjunto de dados geralmente é organizado em uma matriz X (I x J), com tantas linhas quanto o número de amostras e tantas colunas quanto o número de variáveis (descritores) medidos, além de um vetor y (variável dependente) que contém os dados experimentais de atividade biológica correspondente ao número I de compostos do conjunto de dados (Equação 1) (AMARAL *et al.*, 2016).

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1j} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2j} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ x_{i1} & x_{i2} & \dots & x_{ij} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ x_{I1} & x_{I2} & \dots & x_{IJ} \end{bmatrix} \quad Y = \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ \vdots \\ Y_{i1} \\ \vdots \\ Y_I \end{bmatrix} \quad \dots\dots[\text{Equação 1}]$$

Após a coleta de dados, a análise exploratória permite resumir as características dos dados em um formato de fácil entendimento, utilizando-se do auxílio de gráficos visuais, sem a preocupação de construir uma regra preditiva (BIANCOLILLO; MARINI, 2018).

Os algoritmos matemáticos utilizados em ambos os métodos supervisionados e não supervisionados são baseados nas abordagens lineares e não lineares. Métodos lineares utilizam a combinação linear das variáveis calculadas para criar modelos de classificação, enquanto os não lineares se utilizam de algoritmos mais complexos, conferindo maior sofisticação ao modelo (MONCAYO *et al.*, 2015).

Métodos supervisionados e não supervisionados se baseiam nos princípios de que as amostras estudadas devem ser semelhantes, que devem existir diferenças significativas do efeito estudado entre as amostras e que o conjunto de propriedades calculadas seja capaz de identificar essas diferenças (FERREIRA, 2015). Para os métodos supervisionados as amostras pertencem a uma classe preestabelecida, a qual é parte da construção dos modelos de classificação. São considerados métodos de classificação, entre outros, o reconhecimento de padrões; a análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA); a análise discriminante linear (LDA); o k-ésimos vizinhos mais próximos (*k-nearest neighbors* - KNN); o *soft independent modeling of*

class analogy (SIMCA); a árvore de regressão e classificação; e as redes neurais artificiais (BIANCOLILLO; MARINI, 2018; FERREIRA, 2015).

Métodos não supervisionados, por outro lado, não se utilizam da informação de classificação, pois identificam padrões baseados nos descritores do conjunto de dados. Neles as amostras não requerem conhecimento prévio e serão agrupadas com base nas informações calculadas disponíveis. Esses agrupamentos são realizados por meio de métodos de agrupamento ou por projeção dos dados em espaços de menor dimensão (AMARAL *et al.*, 2016). São exemplos de métodos multivariados não supervisionados, a análise de agrupamentos hierárquicos (*hierarchical cluster analysis* - HCA) e as análises de componentes principais (*principal component analysis* - PCA) (FERREIRA, 2015; JOLLIFFE; CADIMA, 2016).

O método não supervisionado de análise de componentes principais (PCA) foi introduzido por Karl Pearson (1901) e Hotelling (1933), em que variáveis possivelmente correlacionadas são ortogonalmente transformadas em um conjunto de variáveis linearmente não correlacionadas, também denominadas componentes principais ou fatores. A ferramenta estatística baseia-se na projeção dos dados originais, de forma que a representação dos dados seja realizada por meio de um menor número de fatores, sem resultar em perda significativa da informação estudada (JOLLIFFE; CADIMA, 2016).

No contexto de pesquisa em planejamento e desenvolvimento de fármacos, esse método é utilizado, geralmente, quando o conjunto de dados é largo e complicado de interpretar diretamente, de forma que as interrelações entre os descritores moleculares do conjunto são de difícil visualização (YOO; SHAHLAEI, 2018). O PCA pode ser utilizado para verificar a diversidade estrutural das moléculas que compõe o conjunto de dados de interesse, avaliar a coerência dos valores experimentais de atividade biológica, identificar possíveis amostras atípicas (*outliers*) e explorar o peso de cada propriedade e sua influência para as regras de SAR do conjunto de dados (ALVES *et al.*, 2017).

A análise de agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA) busca reconhecer padrões por meio de parâmetros de agrupamento por similaridade das amostras. (FERNANDES *et al.*, 2015). O método de HCA também permite a análise de grandes conjuntos de dados, identificando subgrupos com estruturas similares, por meio de gráficos bidimensionais na forma de árvore hierárquica, os dendrogramas (FERREIRA, 2015). De maneira complementar ao PCA, a análise de agrupamentos hierárquicos é utilizada como ferramenta de agrupamento para avaliar a similaridade e as diferenças

intra e intergrupo do conjunto de amostras de interesse de maneira quantitativa (CAESAR; KVALHEIM; CECH, 2018) .

Metodologias complementares ao estudo de SAR de um conjunto de moléculas de interesse são baseadas na análise da similaridade ou de dedução do farmacóforos. Essas estratégias de planejamento de fármacos dependem somente da informação da estrutura química dos ligantes, pois levam em consideração que esses ligantes, para apresentar o mesmo efeito biológico e se ligar ao mesmo alvo, devem ter em comum um conjunto de propriedades físico-químicas. Desse modo, a análise de tal similaridade entre os compostos é realizada de maneira quantitativa, por meio do cálculo de índices que podem variar entre zero e um, em que zero representa nenhuma similaridade e um, similaridade total (HIMMAT *et al.*, 2016). A abordagem de similaridade possui menor custo computacional e permite a comparação da topologia das superfícies eletrônicas entre pares de moléculas (KUMAR; ZHANG, 2018). No entanto, os métodos de similaridade bidimensional (2D) são limitados por não promoverem informações das conformações das estruturas das moléculas (MEDINA-FRANCO *et al.*, 2009).

A similaridade 2D é o método mais eficaz, rápido e popular e se baseia inteiramente na estrutura bidimensional das moléculas, incluindo métodos pautados na busca de subestruturas, similaridade de assinaturas digitais (*fingerprints*) e propriedades moleculares 2D (SRINIVAS REDDY *et al.*, 2007). As *fingerprints* são vetores, que codificam as informações e permitem a reprodução de resultados mais rapidamente. A maneira mais simplificada de codificar essas informações é por meio de vetores binários, em que cada posição está associada unicamente à presença de subestrutura, fragmento ou farmacóforo (BAJUSZ; RÁCZ; HÉBERGER, 2015).

O coeficiente para o cálculo de similaridade 2D mais popular é o coeficiente de Tanimoto (KRISTENSEN; NIELSEN; PEDERSEN, 2013), no qual são contabilizadas, para cada par de moléculas, a razão entre o número de características e o total de características presentes em ambas, gerando, assim, uma lista de moléculas organizadas de acordo com o valor do coeficiente. Ademais, outros coeficientes para contabilizar a similaridade entre duas moléculas são, por exemplo, a distância Euclideana, a distância de Manhattam, o coeficiente de Pearson, o coeficiente de Cosine, o coeficiente de Forbes, o coeficiente de Russel-Rao e a distância de Hamming, entre outros (Tabela 2) (KUMAR; ZHANG, 2018).

Tabela 2. Coeficientes de similaridade 2D.

Coeficiente	Fórmula
Tanimoto	$c/a + b - c$
Cosine	$c/\sqrt{ab}$
Forbes	cm/ab
Russel-Rao	$c/(a + b + c + d)$
Hamming	$a + b - 2c$

Fonte: P; WILLETT, 2006.

Considerando que duas moléculas, A e B, são representadas por *fingerprints* binários contendo um total de m unidades e partes das subestruturas de cada molécula, A ou B, estão representados respectivamente por a e b e que c são subestruturas presentes em ambas as moléculas. Estudos de análise da qualidade dos coeficientes identificaram os coeficientes de Tanimoto, Cosine e Dice e Sorgel como os melhores coeficientes para determinar similaridade de *fingerprints* entre moléculas (BAJUSZ; RÁCZ; HÉBERGER, 2015).

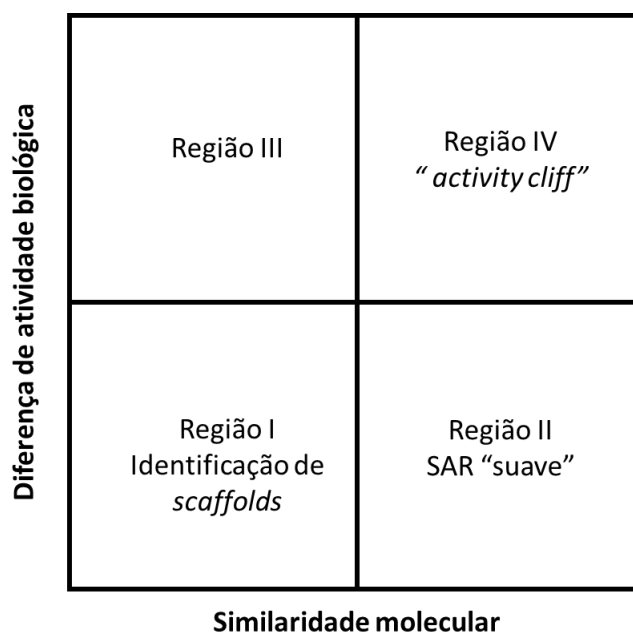
Entender o *landscape*, ou seja, o espaço amostral das atividades biológicas para o conjunto de moléculas estudados, da atividade de um conjunto de compostos, é crucial para estudos de SAR, assim como também para o sucesso da aplicação e interpretação dos métodos computacionais. Definir os tipos de relação estrutura-atividade dentro do *landscape* das atividades, é decisivo quando se tem em vista a identificação do impacto das modificações estruturais na atividade biológica, os quais se traduzem em situações em que pares de moléculas podem apresentar semelhança estrutural, bem como se relacionarem com descritores semelhantes e, conseqüentemente, apresentarem potência biológicas parecidas. De outra forma, um conjunto de moléculas estruturalmente semelhantes pode apresentar diferenças pronunciadas no efeito biológico (DIMOVA; BAJORATH, 2016).

Esse último fenômeno, em estudos de SAR, é conceituado como *Activity Cliffs* (AC), no qual pares de moléculas similares apresentam alta diferença nas atividades biológicas respectivas e, comumente, são interpretados erroneamente em modelos de QSAR (BAJORATH, 2017; DIMOVA; BAJORATH, 2016). A identificação desse comportamento é de grande interesse para químicos medicinais e pode ser utilizado tanto para a otimização de fármacos como para identificação de quais modificações estruturais estariam associadas a mudanças significantes na atividade biológica (WASSERMANN; WAWER; BAJORATH, 2010).

Em um conjunto de compostos, o espaço de SAR pode ser organizado em quatro situações, ou mapas de atividade biológica baseadas na similaridade (mapa SAS – *structure-activity similarity*), como ilustrado na Figura 7. Inicialmente publicados em 2001 por Maggiora e Shanmugasundaram (2001), esses mapas permitem a rápida detecção de *activity cliffs*, uma vez que relacionam os valores de potencia biológica e similaridade estrutural de um conjunto de compostos.

De acordo com a Figura 7, cada região do mapa SAS corresponde a situações encontradas em estudos de SAR. Primeiramente, a região I se refere a moléculas com baixa similaridade que apresentam pequena diferença de atividade, situação essa ideal para identificação de novos esqueletos moleculares (*scaffolds*). Em seguida, as situações opostas (regiões II e III) de moléculas muito similares e com pequena diferença de atividade, que corresponde ao SAR “suave”, ou de moléculas bastante diferentes com alta diferença de atividade. Ambos os casos são os mais comuns em estudos de SAR e seguem o princípio da similaridade (estruturas similares apresentam atividades similares). A última região (IV), representa os AC, em que um conjunto de moléculas com grande similaridade estrutural, demonstra elevada diferença de atividade biológica (MEDINA-FRANCO *et al.*, 2009; PÉREZ-VILLANUEVA *et al.*, 2015). A identificação dos AC em um conjunto de dados estruturalmente diverso possibilita, portanto, encontrar porções da molécula indicadas para modificação e otimização estrutural (STUMPFE; BAJORATH, 2012).

Figura 7. Representação geral de mapas de similaridade estrutura-atividade demonstrando as quatro regiões principais.



Região I associada com a identificação de *scaffolds*; II associada com SAR suave; e a região IV associada ao SAR descontínuo e corresponde aos "activity cliffs".

Fonte: adaptado de PÉREZ-VILLANUEVA et. al., 2015

De forma sucinta, o conjunto de estratégias auxiliadas por computador, com foco na descoberta e no desenvolvimento de novos fármacos, tem como objetivo direcionar o processo de maneira a economizar tempo e custo. Por meio do entendimento de como funciona o SAR de uma série de compostos, o planejamento e a síntese de novas moléculas podem ser realizados de forma a diminuir a quantidade de experimentos.

2 JUSTIFICATIVA

O cenário de procura por novos agentes terapêuticos para o tratamento da leishmaniose é urgente e de grande importância para a pesquisa na área da Química Medicinal. Essa necessidade é realçada quando se observa que a atual terapia medicamentosa apresenta limitações que dificultam o controle da doença, como o alto custo, vias de administração desvantajosas para uso prolongado e o surgimento dos casos de resistência (KATSUNO *et al.*, 2015), além disso, para o tratamento de infecções causadas pelos parasitas tripanosomatídeos, nenhum dos fármacos disponíveis é satisfatório e novas entidades químicas e candidatos a fármacos são necessários (FIELD *et al.*, 2017).

Estratégias de planejamento de fármacos auxiliadas por computador (CADD - *Computed-Aided Drug Design*) se destacam nas pesquisas da Química Medicinal como ferramentas de auxílio no planejamento de novos fármacos, agilizando e diminuindo o custo do processo de descoberta de novos fármacos. Além de possibilitar a exploração de grande quantidade de dados para um número maior de alvos biológicos ou de moléculas promissoras (COHEN, 1996). A aplicação dessas técnicas permite a exploração de extensos bancos de dados de maneira rápida, com elevado desempenho, versatilidade, baixo custo e facilidade de uso (FERREIRA; OLIVA; ADRICOPULO, 2011).

Nos ensaios biológicos *in vitro* contra a *Leishmania*, os testes de triagem costumam focar a forma promastigota do protozoário, devido à facilidade de manipulação laboratorial, mas, como essa forma não está presente no hospedeiro humano, estudos para identificação de candidatos a fármacos devem levar em consideração, também, a ação dos compostos contra a forma amastigota da *Leishmania*. Levando-se em consideração que essa forma morfológica se comporta como parasita intracelular obrigatória, os testes biológicos necessitam de maior atenção, devido ao maior grau de dificuldade requisitado para a manipulação de culturas de células. Por fim, desenvolver uma metodologia que garanta a avaliação de um candidato a fármaco nos diferentes estágios morfológicos da *Leishmania* de maneira reprodutível, rápida e de baixo custo é um dos desafios enfrentados para a pesquisa de novas moléculas com efeito anti-*Leishmania* (MUYLDER *et al.*, 2011).

O descobrimento de fármacos, em especial com enfoque para compostos com ação contra os tripanosomatídeos, emprega três estratégias: abordagens baseadas na estrutura do alvo, em que compostos são triados com base na estrutura do receptor; triagem fenotípica, quando só os compostos são triados baseados na observação da inibição das

formas morfológicas e a reposição de fármacos já aprovados para outros fins (FIELD *et al.*, 2017).

A triagem fenotípica é a estratégia de maior sucesso no descobrimento de fármacos anti-tripanosomatídeos, já que leva em conta parâmetros *in vitro* mais aproximados dos efeitos no organismo e agem na forma morfológica relevante. Além disso, o conhecimento adicional do modo de ação permite a geração de fármacos com perfil otimizado (REGUERA *et al.*, 2014).

Estudos realizados com análogos da nifuroxazida demonstram atividade promissora desses derivados contra diversos alvos terapêuticos como bactérias, melanomas e fungos, o que evidencia a potencialidade desses compostos nitro-heterocíclicos para a pesquisa de novos candidatos a fármacos (ISHII *et al.*, 2011; MASUNARI; TAVARES, 2007).

Mais recentemente, os estudos da ação de derivados furfurilidênicos contra *T. cruzi* (PALACE-BERL *et al.*, 2013, 2015, 2018; PAULA *et al.*, 2009) indicam a possibilidade de esses também se apresentarem como candidatos promissores contra *Leishmania*, já que tanto *T. cruzi* quanto *Leishmania* spp. são parasitas tripanossomatídeos e compartilham de algumas características em sua organização genômica e estrutura celular (STUART *et al.*, 2008). Preliminarmente, alguns compostos da quimioteca de derivados 5-nitro-2-furfurilidênico já foram avaliados quanto à capacidade inibitória da forma promastigota das espécies de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* e *L. (L.) amazonensis*, o que indica o seu potencial anti-*Leishmania* (MENDONÇA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2016).

Dessa forma, o presente projeto se propõe a testar todo o espaço químico de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos sintetizados pelo Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos – LPDF em ensaios *in vitro* contra a forma promastigota e amastigota da *Leishmania* spp. Pretende, ainda, aliar técnicas e metodologias quimiométricas focadas em relação estrutura-atividade para a identificação de propriedades físico-químicas que estão diretamente relacionadas ao estabelecimento da atividade biológica dessa classe de compostos, sendo, assim, possível, propor novos compostos potencialmente aproveitáveis como novos candidatos a fármacos no combate à leishmaniose.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Com o foco na identificação de novas substâncias químicas com capacidade inibitória contra as diversas formas da leishmaniose, este projeto visa a busca por compostos bioativos com potencial leishmanicida, a partir de uma série de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos, planejados a partir de modificações da estrutura química da nifuroxazida (PALACE-BERL *et al.*, 2013, 2015, 2018).

3.2 Objetivos Específicos

- Implantar e validar metodologia para teste de atividade biológica de compostos nitro-heterocíclicos contra *Leishmania (Leishmania) infantum*;
- Determinar atividade anti-*Leishmania* dos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos contra as formas promastigota e amastigota de *L. (L.) infantum*.
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos em células de macrófagos THP-1 diferenciados.
- Construção das estruturas tridimensionais do conjunto de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos e calcular os descritores moleculares.
- Construir e interpretar os modelos de análise multivariada exploratória de dados: PCA e HCA.
- Interpretar os dados obtidos por *activity cliff*
- Identificar características importantes para a atividade biológica, para a proposição de novos compostos
- Selecionar, dentre a biblioteca de compostos nitro-heterocíclicos, aqueles com melhor perfil de atividade por meio da avaliação da sua capacidade inibitória diante da *L. (L.) major* e *Trypanosoma brucei* e.
- Avaliar a capacidade inibitória de compostos selecionados contra a forma amastigota de *L. (L.) major*.
- Avaliar a capacidade inibitória de compostos selecionados contra cepas mutantes de *T. brucei* induzidas a super expressar NTR 1.

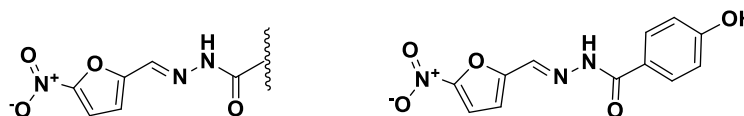
4 METODOLOGIA

4.1 Quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos

40 compostos com estrutura análoga à nifuroxazida (Quadro 1) foram obtidos seguindo os protocolos de publicações anteriores (PALACE-BERL *et al.*, 2013, 2015, 2018; TAVARES; PENNA; AMARAL, 1997). Todas as modificações estruturais seguiram estratégias de *design* e planejamento racional de fármacos baseado na estrutura farmacofórica da nifuroxazida (NF) e foram testados previamente contra cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Vale salientar que todos os compostos já estavam disponíveis, obtidos previamente pelo grupo (PALACE-BERL *et al.*, 2015, 2018). O processo de síntese dos compostos que compõem a quimioteca foi realizado de maneira a repor o estoque, quando necessário. As rotas de síntese para a obtenção dos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos (Figura 8) seguem metodologias provenientes de trabalhos anteriores do grupo (JORGE *et al.*, 2013; PALACE-BERL *et al.*, 2018).

Figura 8. Derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos azometínicos (esquerda) e composto protótipo nifuroxazida (direita).



Fonte: elaborado pelo autor

Quadro 1. Estrutura química dos 40 compostos que compõem a biblioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.

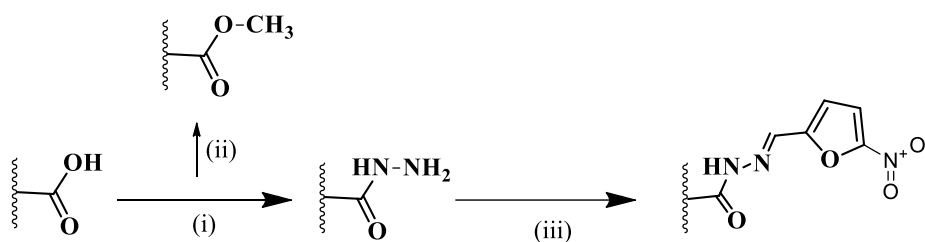
	R	R	R	R	
1		2		3	
5		6		7	
9		10		11	
13		14		15	
17		18		19	
21		22		23	
25		26		27	
29		30		31	
33		34		32	
37		35		36	
38		39		40	

A rota sintética ocorre em três etapas: reação de esterificação (i), amonólise (ii) e reação de condensação para obtenção de bases de Schiff (iii) (Figura 9). A reação de esterificação se dá através da reação de 0,01 mol de ácido carboxílico substituído (98% de pureza) dissolvidos em metanol anidro PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório) em excesso (20 mL). Ácido sulfúrico PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório) foi adicionado como catalisador (0,5 mL). O sistema foi mantido em refluxo durante quatro horas. A segunda etapa da reação foi realizada sem o isolamento do éster

intermediário gerado, com a adição ao meio reacional de 10 mL de hidrato de hidrazina 80% (v/v) (Merck Chemicals). O sistema foi então mantido em refluxo por mais uma hora (ou até formação e precipitação da hidrazida). Ao fim da reação, o sistema foi resfriado (-6 a -10 °C) até a formação de cristais. Após a precipitação da hidrazida, o produto gerado foi filtrado sob pressão reduzida e seco em presença de pentóxido de fósforo PA. Foram obtidas comercialmente as hidrazidas correspondentes aos compostos **1**, **2**, **4**, **5**, **7**, **9**, **15** e **20** (Sigma-Aldrich).

A última etapa da reação ocorreu através de 0,01 mol de 5-nitro-2-furaldeído solubilizado em meio reacional composto por água, ácido sulfúrico, ácido acético e metanol (8:7:8:20 v/v). Em temperatura de refluxo adicionaram-se 0,01 mol da hidrazida sob agitação durante 1 hora. Água destilada foi adicionada com a observação imediata da formação de sólido amorfo. Este sólido foi filtrado, lavado com água destilada gelada e recristalizado de dimetilformamida (DMF)/água.

Figura 9. Rota sintética dos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos.



Condições reacionais: (i) metanol, ácido sulfúrico/refluxo 4 horas; (ii) hidrazina 80%/ 1h de refluxo; (iii) água, ácido sulfúrico, ácido acético, metanol/refluxo por 1 hora. (adaptado Palace-Berl, 2012).

Os compostos da quimioteca foram submetidos a revisões dos valores de faixa de fusão, a fim de verificar a preservação da integridade estrutural das moléculas ou se continham impurezas interferentes. Os resultados obtidos foram comparados aos encontrados na literatura e aos valores experimentais previamente reportados (PALACE-BERL, 2016). Os compostos que apresentaram impurezas foram recristalizados com DMF/água. O sólido obtido foi novamente filtrado e seco sob pressão reduzida em presença de pentóxido de fósforo.

Para confirmação da estrutura, quando necessário, os compostos foram submetidos à espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) em espectrômetro Bruker modelo *Advance* DPX-300 Mhz. DMSO- d_6 foi utilizado como

solvente e TMS (tetrametilsilano) 0,05% como padrão de referência interno. Tais análises foram realizadas no Laboratório de Análise Instrumental da FCF/USP.

4.2 Determinação da atividade anti-*Leishmania* contra a forma promastigota da *L. (L.) infantum*

4.2.1 Cultivo das formas promastigotas de *L. (L.) infantum*

As formas promastigotas da *L. (L.) infantum* foram mantidas em meio M199 (Vitrocell, Invitrogen) suplementado com 10% soro fetal Bovino inativado (SFB) (Vitrocell, Invitrogen), 2% de urina masculina humana filtrada (0,2 μ M) e demais componentes: penicilina (50 mg/L), estreptomicina (50 mg/L); HEPES (40 mH/L) e Hemina 25%. As culturas foram mantidas sob 25 °C em estufas de demanda bioquímica de oxigênio (BOD – *Biochemchal Oxygen Demand* – Tecnal) e repicadas semanalmente para manutenção de culturas em fase exponencial de crescimento para realização dos ensaios.

Para realização dos ensaios as culturas de *L. (L.) infantum* foram transferidas para meio RPMI 1640 (Gibco, USA) contendo L-glutamina ausente de vermelho de fenol, ambos suplementadas com soro fetal bovino e urina masculina humana (2%). A passagem de meio foi realizada por meio da centrifugação das culturas em fase exponencial de crescimento (3 a 4 dias), em meio M199 a 1800 x g durante 5 minutos, por duas vezes, e ressuspensas em meio RPMI 1640.

4.2.2 Determinação da curva de crescimento

As culturas de promastigotas em meio RPMI 1640 (10% SFB e 2% urina) foram diluídas em diferentes suspensões parasitárias, com concentração inicial de 5×10^6 parasitas/mL e 10×10^6 parasitas/mL, previamente determinadas por contagem em câmara de Neubauer (NewOptik). Em microplaca de 96 poços de fundo chato, 200 μ L de cada suspensão foram transferidos em triplicata. O crescimento das culturas foi acompanhado durante os tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

O crescimento das culturas foi determinado simultaneamente por contagem em câmara de Neubauer e leitura da absorbância no comprimento de onda 590 nm em espectrofotômetro (EZ Read 400 Research – Vis, Biochrom, Cambridge, UK).

O tempo médio correspondente para a cultura de parasitas duplicar sua população (tempo de dobramento) foi determinado pela Equação 2 (ROTH, 2006).

$$td = \frac{\text{tempo (horas)} * \log 2}{\log \text{Conc Final} - \log \text{Conc Inicial}} \quad [\text{Equação 2}]$$

4.2.3 Padronização método colorimétrico MTT para ensaios em promastigota

Para a determinação da inibição do crescimento das culturas de promastigotas de *L.(L.) infantum* em presença dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos, foi realizada a padronização dos ensaios de atividade biológica a partir do método colorimétrico de viabilidade celular, utilizando MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (DUTTA *et al.*, 2005; GEBRE-HIWOT *et al.*, 1992; MOSMANN, 1983). A análise colorimétrica foi realizada a partir da redução do MTT (coloração amarela em solução) e a formação do composto corado formazan (coloração roxa), com leitura em $\lambda = 590\text{nm}$ (MOSMANN, 1983).

Solução estoque de MTT (5 mg/mL) foi mantida em solução salina PBS x1 (pH = 7,4) e armazenada sob refrigeração (2 a 6 °C). 10 μL da solução de MTT foi adicionado por poço nas microplacas e incubado por 2 horas a 25 °C em ausência de luz. Após o período de incubação, as microplacas foram centrifugadas a 1800x g durante 15 minutos; 150 μL do sobrenadante foram descartados e foram adicionados 100 μL de dimetilsulfoxido PA, (DMSO) pré-aquecido a 60 °C, a fim de auxiliar na solubilização do formazan resultante. As microplacas foram homogeneizadas durante 30 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro leitor de microplaca (EZ Read 400 Research – Vis, Biochrom, Cambridge, UK) no comprimento de onda 590 nm.

4.2.4 Determinação da curva de calibração

Anterior à determinação da atividade anti-*Leishmania* dos compostos, foi construída uma curva de calibração em microplaca de 96 poços em meio RPMI 1640 (SFB 10% e 2% urina), com oito pontos, em que cada ponto corresponde a determinada concentração parasitária (parasitas/mL). A partir da cultura de promastigotas em fase exponencial de crescimento (3-4 dias), a densidade da suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e, a partir de diluição seriada 1:2, foram determinados os demais pontos da curva de calibração. O ensaio foi realizado em triplicata, seguindo o

método com MTT descrito anteriormente. As microplacas foram homogeneizadas e analisadas em leitora de microplacas a 590 nm (GINOUVES *et al.*, 2014; MOSMANN, 1983). As curvas foram construídas por regressão linear e teste estatístico ANOVA, utilizando o programa Minitab 17 (licença acadêmica).

4.2.5 Determinação da atividade inibitória dos compostos 5-nitro-2-furfulidênicos contra a forma promastigota da *L. (L.) infantum*

A quimioteca de compostos previamente sintetizada em outros trabalhos do nosso grupo (PALACE-BERL *et al.*, 2013, 2015, 2018) foi avaliada quanto à capacidade inibitória em relação à forma promastigota (extracelular) da *L. (L.) infantum.*, seguindo adaptação de metodologia validada por Jorge e colaboradores (2011) para as diluições dos compostos. Já a observação da capacidade de inibição do crescimento das culturas parasitárias foi realizada, por meio da adaptação de metodologia de viabilidade celular, utilizando MTT, previamente descrita (DUTTA *et al.*, 2005). Foram considerados como fármacos de referências para os ensaios a Anfotericina B desoxicolato (cedida pela professora Silvia Reni Bortolin Uliana, Instituto de Ciências Biológicas – USP), miltefosina (cedida pela professora Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP). Como composto protótipo foi utilizada a nifuroxazida.

A determinação da atividade anti-*Leishmania* foi realizada a partir da concentração 10^7 parasitas/mL da cultura de promastigotas de *L. (L.) infantum* em meio RPMI 1640 (10% SFB e 2% urina masculina humana filtrada). Foram preparadas soluções estoque dos compostos e da nifuroxazida, partindo-se de uma massa equivalente a 40.000 μmol de cada composto, diluídas em 1 mL de DMSO, com concentração final de 40 mM. Para os fármacos de referência, anfotericina B e miltefosina, foram preparadas soluções a 20 mM, dissolvidas em DMSO e PBS, respectivamente. Todas as soluções estoques utilizadas nos ensaios foram mantidas refrigeradas (2 a 6 °C) por até 3 dias.

A partir da solução estoque foram preparadas as diluições 1:2 em placa de poço profundo, a fim da obtenção de soluções com o dobro das concentrações (200 μM – 0,0195 μM), necessária nos ensaios para, após a adição da suspensão parasitária, obter-se as concentrações desejadas (100 μM – 0,0097 μM) dos compostos, fármacos de referência e nifuroxazida. Os ensaios foram realizados com concentração final de 1% de DMSO.

Uma suspensão parasitária em fase exponencial de crescimento, com concentração de 2×10^7 parasitas/mL em meio RPMI 10% SFB e 2% urina, foi preparada por meio de contagem em câmara de Neubauer. O volume de 100 μ L da suspensão foi transferido para microplaca de 96 poços, de modo a totalizar 200 μ L de volume final em cada poço e concentração final de 10^7 parasitas/mL (2×10^6 parasitas/poço).

Foram considerados para este ensaio, como controle positivo (CP), solução controle de crescimento do parasita e controle do meio (CM), solução de meio RPMI 1640. A fim de garantir que a presença de 1% DMSO não interferisse no ensaio, todos os ensaios foram realizados com soluções controle do meio RPMI 1640, com 1% de DMSO (CS) e o respectivo controle de crescimento da suspensão parasitária (CSP) em meio RPMI 1640 1% DMSO. Também foi considerado, para cada concentração testada dos compostos, uma solução de “branco analítico” composta pelo meio RPMI 1640 (1% de DMSO) e cada diluição correspondente dos compostos e fármacos de referência. A figura 10 representa o *layout* da microplaca de 96 poços utilizada para realização dos ensaios de determinação da bioatividade considerada.

Figura 10. *Layout* do ensaio de inibição da atividade de *L. (L.) infantum* na forma promastigota contra a quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	CS	CSP	CM	CP
B	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	CS	CSP	CM	CP
C	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	CS	CSP	CM	CP
D	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	CS	CSP	CM	CP
E	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	CS	CSP	CM	CP
F	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	CS	CSP	CM	CP
G	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	CS	CSP	CM	CP
H	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	CS	CSP	CM	CP

Coloração cinza claro corresponde a diluição dos compostos; cinza escuro ao branco dos compostos; azul escuro ao controle do solvente (CS); azul claro ao controle positivo do solvente (CSP); verde escuro ao controle de meio (CM) e verde claro ao controle positivo (CP).

O ensaio foi realizado com incubação por 72 horas a 25 °C em atmosfera úmida. O método para determinação da capacidade inibitória dos compostos e fármacos de referência foi realizado por MTT, como descrito anteriormente, e as microplacas foram analisadas em espectrofotômetro de microplacas ($\lambda = 590$ nm). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas com, pelo menos, uma repetição de ensaio independente.

4.2.6 Tratamento dos dados obtidos para a determinação da atividade anti-*Leishmania* (IC₅₀)

Os dados de absorbância ($\lambda = 590$ nm) resultantes dos ensaios de inibição foram tratados a fim de obter a porcentagem de inibição do crescimento das culturas para cada concentração do ensaio, segundo a Equação 3.

$$\%IC = \left\{ 1 - \left[\frac{(DOc - DObc)}{(DOp - DObp)} \right] \right\} \times 100 \quad [\text{Equação 3}]$$

Em que:

%IC: porcentagem de inibição do crescimento;

DOc: densidade óptica (absorbância) da cultura contendo composto;

DObc: absorbância do branco analítico;

DOp: densidade óptica do controle positivo;

DObp: densidade óptica do controle do meio;

Os valores resultantes de %IC para cada concentração avaliada foram tratados com o auxílio do programa Origin (versão 8.0 - licença acadêmica), empregando-se o modelo sigmoidal não linear de curva dose-resposta. As curvas obtidas foram utilizadas para calcular o valor correspondente a 50% inibição de crescimento para cada composto – IC₅₀.

4.3 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos em células THP-1 diferenciadas

Os ensaios de determinação de citotoxicidade, infecção e determinação de atividade anti-*Leishmania* em relação à forma amastigota de *L. (L.) infantum* foram conduzidos no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP; sob a coordenação do Prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso. Todos os ensaios foram realizados com o auxílio da Técnica e Doutoranda Christiane Yumi Ozaki.

Os ensaios de determinação da citotoxicidade pelo método de rezarusina foram realizados sob orientação do Prof. Dr. Shane Wilkinson, nas dependências do School of Biological & Chemical Sciences na Queen Mary University of London, durante período de doutorado sanduíche CAPES-PRINT.

4.3.1 Cultivo e diferenciação celular das células THP-1

Células THP-1 de linhagem humana leucêmicas monocíticas foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco), com vermelho de fenol enriquecido com 10% SFB (Gibco) inativado. As células foram cultivadas em estufa a 37 °C e atmosfera úmida de 5% de CO₂. Manutenções periódicas a cada 3 dias, para renovação do meio de cultura, foram realizadas até as células atingirem densidade celular de, pelo menos, 10⁷ células/mL para os ensaios.

Para obtenção da suspensão celular, as culturas foram centrifugadas a 200 g por 5 minutos e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI. A determinação da concentração celular foi realizada por meio de contagem em câmara de Neubauer espelhada, visualizadas em microscópio com aumento de 200 vezes, e com o auxílio do marcador Tripán Blue 0,4%.

O processo de diferenciação das células monocíticas THP-1 em macrófagos foi realizado a partir da adição de 20 ng/mL de PMA (forbol 12-miristato 13-acetato / *phorbol 12-myristate 13-acetate*) à cultura. Após o plaqueamento das células em microplacas de 96 poços para os ensaios de citotoxicidade e microplacas de 24 poços para os ensaios de infecção, elas foram mantidas sob incubação, em estufa, por 24 horas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂. Após tal período de incubação, as células foram, então, lavadas duas vezes com solução salina (PBS 1x) e incubadas em meio RPMI 1640 (10% SFB) durante período de 48 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após esse período, as células de linhagem de monócitos THP-1 se mostraram completamente diferenciadas em macrófagos e aderidas à microplaca.

4.3.2 Determinação da citotoxicidade dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos em células THP-1 diferenciadas em macrófagos pelo método de redução do MTT

Os ensaios de citotoxicidade realizado pelo método de viabilidade utilizando o MTT foi realizado para os compostos **1**, **2**, **8**, **13**, **15**, **27**, **39** e **40**, sendo acompanhado o efeito tóxico da exposição dos compostos para o crescimento das células THP-1 diferenciadas durante o período de 24, 48 e 72 horas.

Os ensaios foram realizados com as células THP-1 diferenciadas em placas de 96 poços de fundo chato própria para cultura celular (COSTAR®, EUA) em meio RPMI 1640, sem vermelho de fenol, suplementado com 5% de SFB. O índice de toxicidade mínima (CC₅₀) correspondente à concentração testada responsável por inibir 50% das células THP-1 foi determinado para os fármacos de referências e os compostos

selecionados da quimioteca. Para tal, 10^5 células/poço foram incubadas juntamente com os compostos escolhidos pelo período de 24, 48 e 72 horas em estufa a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂.

Soluções estoques de 40 mM em DMSO foram utilizadas para realização dos ensaios. As diluições foram realizadas em microplaca de 96 poços, a fim de obter faixa de concentração final de 100 µM – 0,1 µM. O ensaio foi realizado em meio RPMI 1640, sem vermelho de fenol, suplementado com 5% SFB e 0,5% de DMSO. Para o ensaio foram considerados como controles, poços com meio RPMI 1640 (5% SFB e 0,5% de DMSO) como controle de meio/branco e poços com células 100% viáveis como controle positivo.

Após a incubação das microplacas, a viabilidade celular foi determinada por meio do método colorimétrico de viabilidade utilizando MTT (SILVA *et al.*, 2016). As microplacas foram lavadas com 100 µL de meio RPMI 1640, a fim de garantir a retirada de qualquer vestígio de cor dos compostos. Foi adicionado 20 µL por poço de solução de MTT (5mg/mL em PBS, filtrado com 0,22 µm) e, após incubação de 3 horas em estufa (37 °C em atmosfera com 5% de CO₂), a fim de parar a reação de formação de formazan, foram acrescentados 80 µL de SDS 20% (docecil sulfato sódico – *sodium dodecyl sulfate*). As microplacas foram homogeneizadas por 15 minutos ao abrigo da luz, até completa lise celular e solubilização do formazan, seguida de incubação adicionais de 18 horas em estufa (37 °C em atmosfera com 5% de CO₂), para garantir a solubilização completa dos cristais. Após esse procedimento executou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro leitor de placa Multiskan® MCC/340 (Brasil) no comprimento de onda 590 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata com repetição de um ensaio independente.

1. Tratamento de dados para a determinação da citotoxicidade em células THP-1 pelo método de redução de MTT

Os dados de absorbância resultantes dos ensaios de citotoxicidade foram tratados, a fim de se calcular a porcentagem da concentração citotóxica para as culturas de células de macrófagos correspondente a cada concentração de compostos testados, segundo a Equação 4. Todos os cálculos foram realizados após a subtração da densidade óptica do branco.

$$\%CC = \left\{ 1 - \left[\frac{DOc}{DOp} \right] \right\} \times 100 \quad [\text{Equação 4}]$$

Em que:

CC%: porcentagem de inibição do crescimento das culturas celulares para concentração avaliada;

DOc: densidade óptica (absorbância) da cultura de células em presença dos compostos;

DOp: densidade óptica do controle positivo, células viáveis não tratadas.

Os dados obtidos de porcentagem de inibição para cada concentração avaliada pelo ensaio foram tratados com o programa Origin (versão 8.0 - licença acadêmica), empregando-se o modelo sigmoidal não linear de curva dose-resposta. As curvas obtidas foram utilizadas para calcular o valor correspondente a 50% de citotoxicidade de cada composto (CC₅₀).

4.3.3 Determinação da citotoxicidade in vitro da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos em células THP-1 diferenciadas em macrófagos pelo método de redução da resazurina

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados para as células THP-1 diferenciadas em placas de 96 poços de fundo chato, própria para cultura celular (COSTAR®, EUA) em meio RPMI 1640, com vermelho de fenol (10% de SFB). O índice de toxicidade mínima (CC₅₀) correspondente à concentração testada responsável por inibir 50% das células THP-1 foi determinada para os fármacos de referências e os compostos da quimioteca. Para tal, $2,5 \times 10^4$ células/poço foram incubadas juntamente com diferentes concentrações dos compostos, durante 72 horas, em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após o período de incubação, o meio de cultura foi lavado duas vezes com meio novo e a viabilidade celular foi determinada.

A viabilidade das células THP-1 foi quantificada pela adição de resazurina com concentração final de 12,5 mg/mL (ou 2,5 mg por poço). As placas foram incubadas durante 24 horas em 37 °C com 5% de CO₂ e a fluorescência foi medida em equipamento leitor de microplaca (*Gemini Fluorescent Plate reader* - Molecular Devices) no comprimento de onda de 530 e 585 nm (filtro de 550 nm). Células não tratadas foram consideradas como controle positivo (100% células viáveis) e o branco, ou controle negativo, foi considerado como meio RPMI sem células não tratadas. A mudança de

fluorescência resultante corresponde à redução da rezasurina e é proporcional à quantidade de células viáveis restantes. Os valores de CC_{50} correspondentes à toxicidade dos compostos foram estabelecidos em relação à viabilidade do controle positivo.

2. Tratamento de dados e determinação da citotoxicidade em células THP-1 pelo método de redução de Resazurina

Os dados de fluorescência resultantes dos ensaios de suscetibilidade e citotoxicidade foram tratados a fim de obter a porcentagem de inibição do crescimento das culturas parasitárias e celulares referentes a cada concentração testada pelos ensaios. A quantificação da produção de fluorescência correspondente a cada concentração de composto testada (fl_c) foi realizada seguindo a Equação 5.

$$Fl_c = fl_r - fl_b \quad \text{[Equação 5]}$$

Em que:

fl_r : valor de fluorescência bruta obtida em cada poço;

fl_b : valor da fluorescência do branco.

Em seguida, os valores correspondentes à média da fluorescência de cada concentração testada (μM) foram então convertidos para porcentagem de crescimento, relativo à média das fluorescências correspondente ao controle positivo (fl_p) (Equação 6).

$$\% \text{ crescimento} = fl_c/fl_p \times 100 \quad \text{[Equação 6]}$$

Os valores resultantes de porcentagem de crescimento correspondentes a cada concentração avaliada foram plotados com o auxílio do programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc.), empregando-se o modelo de regressão sigmoidal não linear para obtenção das curvas dose-resposta. As curvas obtidas foram, então, utilizadas para calcular o valor correspondente à concentração responsável por 50% de inibição de crescimento das culturas celulares (CC_{50}) para cada composto testado.

4.4 Padronização da infecção de macrófagos THP-1 diferenciados com promastigotas de *L. (L.) infantum*

Para o processo de infecção dos macrófagos diferenciados provenientes de células THP-1, foram utilizados promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. (L.)*

infantum (cepa MHOM/BR/1972/LD46), gentilmente disponibilizada pelo prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP. A padronização da infecção foi realizada considerando-se as condições de proporção promastigotas/macrófagos (10:1 e 5:1) e a quantidade de horas de infecção (4 e 6 horas).

Os ensaios foram realizados em microplaca (COSTAR®) de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm de diâmetro. Células THP-1 diferenciadas foram distribuídas em meio RPMI 1640 (Gibco), com vermelho de fenol suplementado com 5% SFB na concentração de 5×10^5 células/poço. Foram adicionadas às microplacas soluções de cultura parasitária nas proporções de 10:1 e 5:1 (promastigota: macrófagos) e estas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ em estufa, sob as duas variações de horas de infecção, 4 e 6 horas. Após o período de infecção, os parasitas extracelulares foram removidos por lavagem com PBS aquecido. O meio de cultura foi renovado e as microplacas foram incubadas durante os tempos de 24 a 72 horas em estufa (37 °C em atmosfera com 5% de CO₂). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Ao final do período de incubação, as lamínulas foram coradas utilizando-se corante panótico rápido (NewProv, Brasil), segundo instruções do fabricante, e fixadas em lâminas com Permount (Fisher Scientific, EUA). Por fim, foram lidas 900 células por condição avaliada, em microscopia ótica de imersão, com aumento de 1.000x. A porcentagem de infecção foi determinada pela razão entre células infectadas tratadas pelo número total de células contadas, multiplicadas por 100. Além disso, o parasitismo, ou seja, o número de amastigotas/100 células, foi determinado para cada concentração dos compostos analisada, utilizando-se da Equação 7.

$$\text{Parasitismo/100 células} = \left[\frac{n^{\circ} \text{ de amastigotas}}{n^{\circ} \text{ total de células}} \times \frac{n^{\circ} \text{ de células infectadas}}{n^{\circ} \text{ total de células}} \right] \times 100 \quad [\text{Equação 7}]$$

4.5 Capacidade anti-*Leishmania* de compostos nitro-heterocíclicos contra a forma amastigota da *L. (L.) infantum*

Culturas de promastigotas de *L. (L.) infantum* foram mantidas em meio M199 (10% SFB e 2% urina masculina humana), periodicamente repicada a cada 4 dias. Todos os ensaios foram realizados de maneira a que a cultura não fosse repicada mais que 4 vezes.

A avaliação do parasitismo foi determinada com 5×10^5 células/poço de macrófagos THP-1 diferenciados em lamínulas circulares de 13 mm, em placas de 24 poços cultivados

em meio RPMI 1640 com vermelho de fenol suplementado com 5% SFB. Após processo de diferenciação, as placas foram infectadas com cultura de promastigota de *L. (L.) infantum* em fase estacionária (4 dias) na proporção 10:1 (promastigotas:células) durante 6 horas de incubação (37 °C, 5% de CO₂). A seguir, as placas foram lavadas três vezes com PBS a 37 °C, a fim de se retirar todos os parasitas não internalizados.

Os compostos foram incubados após esse período nas concentrações de 50 µM, 25 µM, 12,5 µM e 6,12 µM. Células infectadas não tratadas foram utilizadas como controle positivo. Todos os ensaios foram realizados com 0,5% de DMSO. Os ensaios foram realizados em triplicata com repetição de, pelo menos, 1 ensaio independente.

Foram avaliados os impactos dos compostos no parasitismo durante 24 e 48 horas de incubação. As lamínulas foram coradas utilizando corante panóptico e fixadas em lâminas com Permount. Foi realizada, no total, a contagem de 300 células por poço, correspondente a cada concentração avaliada, em triplicata, dos compostos com repetição de um ensaio independente (total de 9.000 células contadas por composto).

O impacto das diferentes concentrações testadas em relação à proliferação dos amastigotas intracelulares em células THP-1 diferenciadas foi analisado através da determinação do parasitismo (Equação 7) e porcentagem de infecção.

4.6 Dosagem de óxido nítrico (NO) em macrófagos THP-1 diferenciados infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum* expostos aos compostos nitro-heterocíclicos

A produção de óxido nítrico foi avaliada a partir da concentração de NO₂ formada nas células THP-1 após infecção e exposição ao tratamento com os compostos. A quantificação foi realizada a partir da retirada do sobrenadante dos macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum* após o ensaio de determinação da inibição da carga parasitária das células após os períodos de incubação de 24 e 48 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, onde 50 µL dos sobrenadantes foram distribuídos em triplicatas e adicionadas 50 µL do reagente de Griess (sulfanilamida 1% diluída em H₃PO₄ 2,5% e diamino naftaleno diidrocloreto, também diluído em ácido fosfórico 2,5%), incubados sob temperatura ambiente (10 minutos) e protegidos da luz. A quantificação de NO foi realizada com a construção, em todos os ensaios, de curvas de calibração, a partir do reagente padrão nitrito de sódio (NaNO₂), com concentração inicial de 100 µM, em diluições seriadas (1:2) em RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB.

As leituras foram feitas em espectrofotômetro leitor de placa Multiskan® MCC/340 (Brasil), em comprimento de onda regulado para 540 nm. Os dados de absorbância obtidos foram computados em média e desvio-padrão em triplicata de, pelo menos, dois ensaios independentes e comparados com a curva de calibração, utilizando-se o programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, São Diego, CA, EUA).

4.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de macrófagos THP-1 infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum* e tratados com compostos nitro-heterocíclicos

Para a realização da análise de alterações das ultraestruturas de amastigotas intracelulares através da MET, 5×10^6 células THP-1 diferenciadas, cultivadas em 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB, foram infectadas com promastigotas de *L. (L.) infantum* na proporção de 10:1 em placas de Petri. Para a análise, foram considerados, como controle negativo e positivo, amostras de macrófagos não infectados e macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum*, respectivamente. Quanto aos compostos e aos fármacos de referências analisados, foram analisadas amostras de macrófagos infectados expostos a 50 μ M dos compostos **40**, **15** e **2**; assim como macrófagos infectados tratados com 12,5 μ M de miltefosina e 25 μ M de anfotericina B, após 48 horas de incubação em 37 ° C em atmosfera com 5% de CO₂.

Em seguida, as células foram, então, descoladas da placa com auxílio de *cell scraper* e solução de PBS gelado. A viabilidade dos macrófagos após descolamento foi monitorada por contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se *Trypan Blue*. Cerca de 5×10^6 células foram centrifugadas a 200 g por 5 minutos para a formação de um *pellet* visível e, em seguida, fixadas com glutaraldeído 1%.

As etapas de processamento e preparo de amostras foram realizadas com o auxílio da técnica de laboratório Cleusa Fumica Hirata Takakura, do departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina da USP. A leitura do material foi realizada na sessão de multiusuários de Microscopia eletrônica da Faculdade de Medicina da USP, com microscópio eletrônico JEOL JEM 1400.

4.8 Determinação da atividade anti-*Leishmania* contra a forma promastigota e amastigota de *L. (L.) major*

Os ensaios de determinação da atividade anti-*Leishmania* contra as formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania (Leishmania) major* foram realizados sob

orientação do Prof. Dr. Shane Wilkinson, nas dependências do School of Biological & Chemical Sciences at Queen Mary University of London.

4.8.1 Cultivo das formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) major*

Culturas da forma promastigotas de *L. (L.) major* MHOM/80/Friedlin foram mantidos em meio 199 (M199) suplementado com bicarbonato de sódio (4 mM); penicilina (50 mg/L), estreptomicina (50 mg/L); HEPES (40 mM); Hemina 25%; pH: 7.4; adenina (0,1 mM); hemina (0,0005% w/v) (todos Sigma Aldrich). As culturas foram, então, adicionalmente suplementadas com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado por temperatura e mantidas em estufa (27 °C).

As formas de promastigotas metacíclicos foram selecionados por meio da reação de aglutinação com PNA (*Peanut agglutinin*) e utilizados para realizar a infecção em células THP-1. Garrafas de 50 mL de cultura do parasita em fase estacionária (7 a 10 dias) foram incubadas em temperatura ambiente durante 15 minutos em presença de 50 mg/L de PNA (Sigma Aldrich). Em seguida, as culturas foram centrifugadas (100g durante 5 minutos) duas vezes e lavadas com solução salina PBS (x1). Os promastigotas metacíclicos foram, então, colhidos a partir do sobrenadante resultante e a quantidade de parasitas necessária para obtenção da concentração desejada (parasitas/mL) para realização da infecção em células THP-1 foi determinada mediante contagem manual em câmara de Neubauer.

As formas amastigotas de *L. (L.) major* utilizadas para realização dos ensaios de suscetibilidade dos compostos nitro-heterocíclicos foram obtidas subsequentes à infecção das culturas de promastigotas metacíclicos em células THP-1 diferenciadas. Os promastigotas na proporção 20:1 foram transferidos para placas de 96 poços de fundo chato (Costar®), contendo $2,5 \times 10^4$ de células/mL de células THP-1 diferenciadas. As placas foram, então, incubadas *overnight* em estufa a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂. Em seguida, os parasitas extracelulares foram removidos por lavagem cuidadosa com meio RPMI e, em seguida, as placas foram incubadas nas mesmas condições (37 °C com 5% de CO₂), durante o período de 72 horas, correspondente aos ensaios de inibição de crescimento em presença dos compostos.

4.8.2 Ensaio de inibição de crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) major*

Os ensaios de inibição da forma promastigotas de *L. (L.) major* foram realizados seguindo o mesmo protocolo de preparo para os ensaios realizados com *L. (L.) infantum*. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (Costar®), utilizando culturas em fase log tardia de crescimento (3 a 4 dias). Foram transferidos volume de 200 µL por poço das culturas em concentração de 5×10^5 parasitas/mL e as placas foram incubadas juntamente com diferentes concentrações dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos e nifurtimox (NFX) como fármaco de referência. Para realização dos ensaios de inibição do crescimento dos parasitas, as placas foram incubadas durante 6 dias, em temperatura de 27 °C e atmosfera úmida com 5% de CO₂.

A viabilidade das culturas de parasita foi quantificada por meio da adição de rezasurina, com concentração final de 12,5 mg/mL (ou 2,5 mg por poço). As placas foram, então, incubadas durante 24 horas em 27 °C com 5% de CO₂ e a fluorescência resultante foi medida em equipamento leitor de microplaca (*Gemini Fluorescent Plate reader* - Molecular Devices) nos comprimentos de onda de 530 e 585 nm (filtro de 550 nm). A mudança de fluorescência obtida correspondente à redução da rezasurina é proporcional ao número de parasitas viáveis. As culturas não tratadas correspondentes aos parasitas 100% viáveis foram consideradas como controle positivo e poços contendo meio de cultura, com ausência de parasitas e células (0% crescimento de parasitas), considerados como branco ou controle negativo.

4.8.3 Ensaio de inibição de crescimento das culturas de amastigotas de *L. (L.) major*

Os ensaios de suscetibilidade das formas amastigotas de *L. (L.) major*, determinados pela quantificação da atividade da enzima luciferase, foram realizados com os compostos **1, 2, 8, 13, 15, 39 e 40**.

De acordo com protocolo estabelecido por Voak (2013), foram utilizadas cepas de amastigotas de *L. (L.) major* capazes de expressar luciferase. Células THP-1 diferenciadas foram distribuídas em concentração de $2,5 \times 10^4$ células/mL para volume de 200 µL em microplacas de 96 poços de fundo chato (Costar®). Promastigotas metacíclicos de *L. (L.) major* na condição de 20:1 (promastigota: macrófagos) foram transferidos para as placas e incubados *overnight* a 37 °C (5% de CO₂). Parasitas extracelulares foram removidos por lavagem, utilizando-se PBS aquecido, e as placas

foram incubadas juntamente com diferentes concentrações dos compostos e fármacos de referência, durante 72 horas, em estufa (37 °C com 5% de CO₂).

Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com meio RPMI, a fim de se remover os parasitas extracelulares. A atividade da enzima luciferase foi determinada por meio do kit Promega - *Luciferase assay system*. A solução de substrato da luciferina foi preparada adicionando 10 mL do tampão de reação oferecido pelo kit com o pó do substrato liofilizado. Para avaliação da atividade da luciferase, as culturas de células foram lisadas a partir da adição de 100 µL da solução Promega de lise celular (*lysis buffer*). Alíquotas de 10 µL das amostras foram transferidas para placas de 96 poços de fundo branco e a emissão de luminescência foi quantificada em aparelho luminômetro leitor de microplacas (BMG *microplate reader*-LabTech). A solução de substrato da enzima (Promega) foi adicionada manualmente aos poços analisados ou fornecida ao luminômetro, o qual injetou, automaticamente, volume de 50 µL do reagente e, após 0,1 segundos, foi realizada a leitura da luminescência a cada 10 segundos em um ciclo total de 70 segundos.

4.8.4 Tratamento de dados obtidos para determinação da atividade anti-*Leishmania* (IC₅₀)

Os dados de fluorescência resultantes dos ensaios de suscetibilidade contra as formas promastigotoas da *L. (L.) major* foram tratados a fim de se obter a porcentagem de inibição do crescimento das culturas parasitárias e celulares referentes a cada concentração testada pelos ensaios. A quantificação da produção de fluorescência correspondente a cada concentração de composto testada (fl_c) foi realizada seguindo a Equação 8.

$$fl_c = fl_r - fl_b \quad \text{[Equação 8]}$$

Em que:

fl_r: valor de fluorescência bruta obtida em cada poço;

fl_b: valor da fluorescência do branco.

Em seguida, os valores correspondentes à média da fluorescência de cada concentração testada (µM) foram, então, convertidos para porcentagem de crescimento, relativo à média das fluorescências correspondente ao controle positivo (fl_p) (Equação 9).

$$\% \text{ crescimento} = fl_v/fl_p \times 100 \quad [\text{Equação 9}]$$

Os valores resultantes de porcentagem de crescimento correspondentes a cada concentração avaliada foram plotados com o auxílio do programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc.), empregando-se o modelo de regressão sigmoidal não linear para obtenção das curvas dose-resposta. As curvas obtidas foram, então, utilizadas para calcular o valor correspondente à concentração responsável por 50% de inibição de crescimento das formas promastigotas (IC₅₀) para cada composto testado.

Quanto aos valores de atividade dos compostos testados contra as formas amastigotas da *L. (L.) major*, os dados de luminescência foram coletados pelo aparelho (BMG microplate reader- LabTech), por meio da quantificação do fóton liberado durante a reação entre a luciferase, presente nas formas intracelulares, e o substrato. A luminescência produzida é, dessa forma, correspondente à quantidade de parasitas viáveis e o valor de IC₅₀ para cada composto foi estabelecido a partir da comparação com o controle positivo. Para o ensaio, foram considerados como controles poços com macrófagos viáveis infectados não tratados (controle positivo) e macrófagos viáveis não infectados e não tratados (controle negativo ou branco).

A quantificação da produção de luminescência correspondente a cada concentração de composto testada foi utilizada para calcular a porcentagem de crescimento correspondente. Os dados foram obtidos de maneira similar ao descrito acima com as equações (8 e 9). Com o auxílio do programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc.), a partir de regreções sigmoidais não lineares, os respectivos valores de concentração responsável por inibir 50% do crescimento das formas amastigotas (IC₅₀) da *L. (L.) major* dos compostos analisados foram calculados.

4.9 Investigação do mecanismo de ação da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos envolvendo a enzima nitroredutase

A fim de avaliar se os compostos nitro-heterocíclicos são metabolizados pela enzima nitroredutase (NTR) presente nos parasitas tripanossomatídeos, foi avaliado a suscetibilidade de linhagens mutantes de *Trypanosoma brucei* capazes de serem induzidas a expressar a enzima nitroredutase do tipo 1 em excesso (TbNTR). A linhagem mutante de parasitas foi disponibilizada pelo Prof. Dr. Shane Wilkinson, obtido previamente pelo seu grupo de pesquisa (WILKINSON *et al.*, 2008).

Para tal, as formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea (*blood stream form* - BSF) do hospedeiro vertebrado de *T. brucei* foram cultivadas em meio HMI-9 (Invitrogen) suplementado com bicarbonato de sódio (3 g/L), β -mercaptoetanol (0,0014% v/v) (denominado de meio HMI-11). O meio HMI-11 foi suplementado ainda com 10% de SFB inativado. As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida, com 5% de CO₂. As culturas correspondentes as cepas de TBNTR (mutantes que expressam NTR do tipo 1 em excesso) foram cultivadas nas mesmas condições das culturas de *T. brucei wild-type*.

Todos os ensaios de inibição do crescimento foram realizados em placas de 96 poços (Costar®). As culturas de BSF *T. brucei* em fase log de crescimento (1 dia de incubação) foram transferidas na concentração de 1×10^4 parasitas/mL em volume de 200 μ L/poço em meio HMI-11, incubadas juntamente com as concentrações desejadas dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos e nifurtimox (fármaco de referência). Após período de incubação das placas em 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ v/v durante as 72 horas, a resazurina foi utilizada a fim de avaliar a viabilidade das culturas.

Os ensaios realizados com a cepa de *T. brucei* que expressam NTR em excesso foram realizados seguindo os mesmos parâmetros da forma *wild-type* comentados acima, mas foram adicionalmente incubados com 1 μ g/mL de tetraciclina, que funciona como agente indutor de expressão gênica. Os ensaios foram organizados de forma que a suscetibilidade das culturas aos compostos analisados foi realizada nas condições de presença e ausência de tetraciclina na mesma placa.

Após incubação de 72 horas, resazurina com concentração final de 12,5 mg/mL (ou 2,5 mg por poço) foi adicionada às placas, as quais foram incubadas adicionalmente entre 8 e 16 horas, em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. A fluorescência foi medida em equipamento leitor de microplaca (*Gemini Fluorescent Plate reader* - Molecular Devices) nos comprimentos de onda de 530 e 585 nm (filtro de 550 nm). A mudança de fluorescência obtida corresponde à redução da resazurina e é proporcional ao número de células viáveis restantes. Culturas não tratadas (parasitas 100% viáveis) foram consideradas como controle positivo e meio de cultura com ausência de parasitas e células (0% crescimento de parasitas), como branco ou controle negativo. Os dados obtidos foram tratados conforme tópico 4.8.4 “Tratamento de dados obtidos para determinação da atividade anti-*Leishmania* (IC₅₀)”.

4.10 Métodos de modelagem molecular e quimiometria utilizados para a investigação das relações entre estrutura química-propriedades moleculares-atividade biológica

As relações estrutura-atividade do conjunto de compostos que apresentaram atividade biológica contra a forma promastigota da *L. (L.) infantum* foram estabelecidas através de método quimiométrico de reconhecimento de padrões não supervisionado, como análise exploratória de dados, que compreende à análise de agrupamentos hierárquicos HCA (*hierarchical cluster analysis*) e análises de componentes principais, PCA (*principal componentes analysis*), complementando à identificação de *activity cliffs* (AC-“picos” de atividade biológica). Para isso foi utilizado um computador para as análises com sistema operacional *Linux Mint* (máquina virtual *VMware Workstation 14 Player*) e *Windows 7*; Dell ®; Intel Core i7™, 240 GHz, RAM 8.0 GB, NVIDIA® GeForce GT 30100.

4.10.1 Conjunto de dados e construção dos modelos tridimensionais (3D) da quimioteca de compostos

A construção das estruturas 2D e 3D dos 40 compostos e da nifuroxazida foi realizada com o auxílio do programa *HyperChem Professional 8.0* (HYPERCUBE, 2008). A estrutura cristalográfica da nifuroxazida, depositada no banco de dados *Cambridge Structural Database* (CSD) (GROOM *et al.*, 2016), sob o código LEQTAC (PNIEWSKA; JANUCHOWSKI, 1998), foi utilizada como referência de arcabouço químico para o desenho da estrutura química dos demais compostos. O estado de protonação de cada estrutura foi verificada para faixa de pH 7,4, a fim de determinar qual forma (molecular ou ionizada) os compostos se apresentam na faixa de pH utilizada nos ensaios biológicos e, a partir dessa informação, os compostos foram desenhados na forma molecular.

A estrutura de cada composto foi, então, parametrizada com o campo de força empírico MM+ (mecânica molecular) (ALLINGER, 1977) e as geometrias foram otimizadas com o método de gradientes conjugados de Polak-Ribière. As cargas atômicas parciais de ponto único (*single-point*) foram calculadas pelo método de mecânica quântica semi-empírico PM3 (*Parameterized Model number 3*) (DE PAZ; CILLER, 1993), implementados no *HyperChem 8* (HYPERCUBE, 2008).

A análise conformacional da quimioteca foi realizada a partir do programa *open access Balloon* (disponível em: <http://users.abo.fi/mivainio/balloon/index.php>). Foram

gerados até 200 conformações, considerando-se o número de ligações rotáveis de cada composto (EBEJER; MORRIS; DEANE, 2012). As conformações de mínimos locais foram selecionadas e novamente minimizadas, como descrito anteriormente. As estruturas tridimensionais resultantes foram utilizadas como estruturas de entrada (*input*) para o cálculo das propriedades moleculares (descritores ou variáveis independentes).

4.10.2 Cálculo dos descritores/propriedades moleculares da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos

As propriedades eletrônicas foram calculadas com o programa *Gaussian G03W* (*Gaussian 03W for Windows*, versão 6; Gaussian Inc.: 1995-2003, Pittsburgh, PA, EUA), utilizando-se o método funcional híbrido B3LYP e o conjunto de base 6311G⁺⁺ (d,p). As cargas de potencial eletrostático (CHELPG) de cada átomo foram calculadas pelo método de Breneman e Wiberg (1990), para reproduzir potencial eletrostático molecular. Foram considerados os átomos que compõe o esqueleto químico do grupamento 5-nitro furano e porção N-acilhidrazona (azometínica). Outros descritores moleculares eletrônicos calculados, como momento dipolo nos eixos x, y e z e total; energia de orbitais moleculares de fronteira HOMO (orbital molecular de maior energia, *highest occupied molecular orbital*), LUMO (orbital molecular de menor energia, *lowest unoccupied molecular orbital*) e gap (diferença entre HOMO e LUMO).

Os descritores moleculares de natureza estrutural foram calculados com o programa *HyperChem 8.0* (HYPERCUBE, 2008). Foram considerados os ângulos (°) de torsões dos átomos que compõem as diedrais 1C-5N-4N=6C (A1); 3O-1C-4N-H (A2), 4N-5N=6C-H (A3) e 4N-5N=6C-8C (A4). As distâncias das ligações (Å) entre os átomos (D1, D2, D3 e D4) também foram consideradas.

Dados experimentais (PALACE-BERL *et al.*, 2015, 2018) de deslocamento químico determinados por RMN de hidrogênio e carbono (¹H e ¹³C) foram considerados para o conjunto de dados de descritores. Foram incluídos os dados espectrométricos para o carbono carbonílico (RMNC1), hidrogênio ligado ao hidrogênio imídico (RMNH4) e hidrogênio ligado ao carbono azometínico (RMNH8).

Os demais descritores de natureza topológica, hidrofóbica e constitucionais foram calculados com o programa *Marvin Sketch* (*Marvin Sketch*, versão 20.13; ChemAxon Ltd.: 1998-2010 Budapeste, Hungria). O coeficiente de partição octanol/água (ClogP) foi calculado utilizando-se o método de pesos do programa, uma adaptação do método de Viswanadhan *et al.* (1989). Os coeficientes de partição em faixas específicas de pH (Clog

D) foram calculados para faixas de pH ácido, neutro e básico, denominados logD2, logD7 e logD10, respectivamente.

4.10.3 Análise exploratória de dados

Os dados para a análise exploratória foram organizados em tabela, composta por trinta e nove linhas (número de amostras), correspondentes aos compostos da quimioteca, acrescida da nifuroxazida, que apresentaram valores de atividade biológica contra a forma promastigota da *L. (L.) infantum* (exceto compostos 14 e 31) e oitenta e quatro colunas (variáveis independentes) compostas pelas 84 propriedades moleculares calculadas mais os valores em potência da atividade biológica (pIC_{50}), considerada como variável dependente. Cabe ressaltar que a variável dependente não é levada em consideração na modelagem dos dados, visto que os métodos utilizados nessa abordagem são não supervisionados.

Previamente à análise exploratória, foram consideradas duas etapas prévias de seleção de variáveis, que consideram a variável dependente em sua seleção: (i) coeficiente de correlação de Pearson e (ii) gráficos de dispersão das propriedades moleculares *versus* AB (atividade biológica). A aplicação desses filtros tem com objetivo identificar e eliminar descritores redundantes, menos representativos ou ruídos para o conjunto de dados estudado.

Foram calculados o coeficiente de correlação de Pearson (r) entre cada descritor e os dados de atividade biológica. Em seguida, a tendência da distribuição dos dados calculados (propriedades moleculares diretamente relacionados à estrutura química) foi visualizada em gráficos de dispersão (*scatter plot*) entre cada variável independente *versus* a variável dependente (pIC_{50} *versus* cada descritor). Foram considerados como descritores relevantes para o estudo os que apresentaram dispersão ampla e tendência linear em relação à atividade biológica, já que o programa utilizado para a análise exploratória (Pirouette 3.11, Infometrix Inc., 1990-2003, Woodinville) não considera funções não lineares na modelagem de dados, portanto foram eliminados descritores com pouca ou nenhuma variabilidade (dispersão) de dados (FERREIRA, 2015, 2002; KIRALJ; FERREIRA, 2010). Após a seleção de variáveis, a tabela final obtida (linhas = amostras/ compostos; colunas = descritores ou variáveis independentes) foi utilizada para a análise exploratória de dados.

A análise exploratória de dados propriamente dita compreende a análise de componentes principais, PCA (*Principal Component Analysis*) e análise de agrupamento

hierárquico, HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*). Todos os procedimentos foram conduzidos utilizando o programa Pirouette 3.11 (Pirouette 3.11, Infometrix Inc., 1990-2003, Woodinville). A matriz resultante, após a aplicação dos filtros de seleção de variáveis, composta pelos descritores calculados e valores de atividade biológica em unidade logarítmica, teve seus valores autoescalados (cada descritor foi centrado na média e dividido pelo desvio-padrão de cada uma), como pré-processamento para os métodos HCA e PCA.

A análise de HCA foi realizada considerando-se o método de agrupamento completo e distâncias euclidianas. Foi utilizado o índice de similaridade (IS) para determinar a semelhança entre os agrupamentos (*clusters*), cujos elementos variam de 0 a 1, em que 1 é equivalente à similaridade máxima. O índice consiste nos elementos que formam a matriz de similaridade, composta pelas distâncias calculadas entre pares das amostras. Os resultados dos agrupamentos foram expressos em gráficos de árvore hierárquica (dendrogramas), para compostos/amostras e descritores/propriedades moleculares.

O modelo de PCA foi contruído de modo que a análise das componentes principais foi realizada a partir da decomposição do conjunto de dados, o que resultou na matriz de escores (relacionada às amostras) e pesos (relacionadas aos descritores). Pelo programa Pirouette 3.11 foram estabelecidos o número ideal de fatores (componentes principais) e o diagnóstico de amostras atípicas, ou *outliers*, a partir do gráfico da distância de Mahalanobis *versus* distância residual das amostras (FERREIRA, 2015, 2002), utilizando um intervalo de confiança de 95%. A distância de Mahalanobis é calculada pela Equação 10.

$$MD_i = (t_i - t) S_k^{-1} (t_i - t) \quad \text{[Equação 10]}$$

Em que:

S: escores da matriz de covariância;

T: vetor de escore médio.

Assumindo-se que as distâncias de Mahalanobis apresentam distribuição normal, as amostras são consideradas *outliers* quando excedem o valor crítico, a partir da distribuição qui-quadrada com k graus de liberdade. Cabe ressaltar que somente a análise exploratória não é suficiente para determinar se compostos podem ser considerados

amostras atípicas. A aplicação de outros métodos complementares deve ser considerada para este fim.

4.10.4 Identificação dos activity cliffs dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com atividade contra a *L. (L.) infantum*

A identificação dos “picos de atividade”, *activity cliffs* (AC), entre pares ou conjunto de moléculas foi determinada a fim de se identificar variações estruturais significantes para a atividade biológica. Inicialmente, foram calculados os coeficientes de similaridade bidimensionais de Tanimoto (1957) com o programa Babel (O’BOYLE *et al.*, 2011), entre cada par de amostras do conjunto de dados (Equação 11). Cada subestrutura representa um conjunto de caracteres que, combinados, descrevem, de maneira bidimensional, as moléculas (PICCIRILLO; DO AMARAL, 2018). Os valores do coeficiente de Tanimoto variam de 0 a 1, em que 1 representa uma completa sobreposição das subestruturas, ou seja, similaridade máxima.

$$Tanimoto(a, b) = \frac{N_c}{(N_a + N_b - N_c)} \quad \text{[Equação 11]}$$

Em que, para cada par de moléculas:

N_a : subestruturas presentes na molécula “a”;

N_b : subestruturas presentes na molécula “b”

N_c : subestruturas presentes em ambas as moléculas.

Os valores de similaridade do coeficiente de Tanimoto foram utilizados para calcular o índice de mapeamento da estrutura-atividade - SALI (*structure activity landscape*) (GUHA *et al.*, 2008), determinado pela Equação 12. A equação original foi modificada a fim de se evitar valores 1 de similaridade. Tal modificação foi realizada para evitar situações em que pares de moleculares altamente semelhantes entre si possam apresentar valores de similaridade de Tanimoto igual a 1 e resultem em valores não definidos, ao se aplicar a equação de SALI, isto é, apresentem denominador igual a zero. O índice SALI foi usado para quantificar e identificar os *activity cliffs* e complementar as interpretações de relações-estrutura atividade.

$$SALI = \frac{|A_i - A_j|}{1,05 - SIM_{i,j}}$$

Equação 12

Em que:

A_i/A_j : valores de atividade biológica (pIC_{50}) entre o par de moléculas i e j

$SIM_{i,j}$: coeficiente de similaridade de Tanimoto entre o par de moléculas i e j.

As redes de AC para o conjunto de compostos foram construídas e visualizadas com o programa GEPHI (BASTIAN; HEYMANN; JACOMY, 2009). Cada composto foi atribuído à rede como os nodos e os valores de SALI, como arestas. Um filtro foi aplicado aos valores de SALI, de maneira a melhorar a visualização dos AC mais significantes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quimioteca de compostos 5-nitro-furfurilidênicos

O planejamento da série de 40 compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com estrutura análoga à nifuroxazida foi realizada visando o seu potencial anti-*T. cruzi*. Baseados em trabalhos anteriores (JORGE *et al.*, 2013; PALACE-BERL *et al.*, 2013, 2015; PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009), os grupos substituintes foram escolhidos levando-se em consideração propriedades físicoquímicas que influenciam as características farmacodinâmicas e farmacocinéticas de uma molécula, tendo como norteadores os princípios estabelecidos por Lipinski (1997).

Proposta por Lipinski, a regra dos cinco (RO5 - *rule of five*) procura sugerir a “drugabilidade” de uma molécula e representou um grande avanço da Química Medicinal, tornando a busca por novos fármacos mais eficiente. Tais regras procuraram identificar parâmetros relacionadas à solubilidade e à permeabilidade de compostos, para tornar compostos farmacologicamente ativos absorvíveis por via oral (LIPINSKI, 2004).

Apesar de não serem regras quantitativas ou incabíveis de exceções, candidatos a fármacos que obedecem a RO5 têm mais chance de serem bem sucedidos em ensaios clínicos (LIPINSKI, 2004). Para pesquisas envolvendo o planejamento de novos candidatos a fármaco com ação fungicida ou antiparasitária, é importante notar que a RO5 deve ser menos rigorosa, haja vista que muitos candidatos a fármacos que não cumprem duas ou mais regras são identificados pelo potencial farmacológico em triagens fenotípicas (DOAK; KIHLEBERG, 2017). Dado o fato de que o desenvolvimento de medicamentos antiparasitários é infelizmente subfinanciado, critérios menos rigorosos permitiriam que mais compostos percussores fossem desenvolvidos (MCKERROW; LIPINSKI, 2017).

A RO5 lista os critérios que os compostos devem apresentar para serem absorvidos por via oral, distribuídos pelo organismo com estabilidade, metabolizados e que se mantenham no organismo até exercerem o efeito farmacológico desejado.

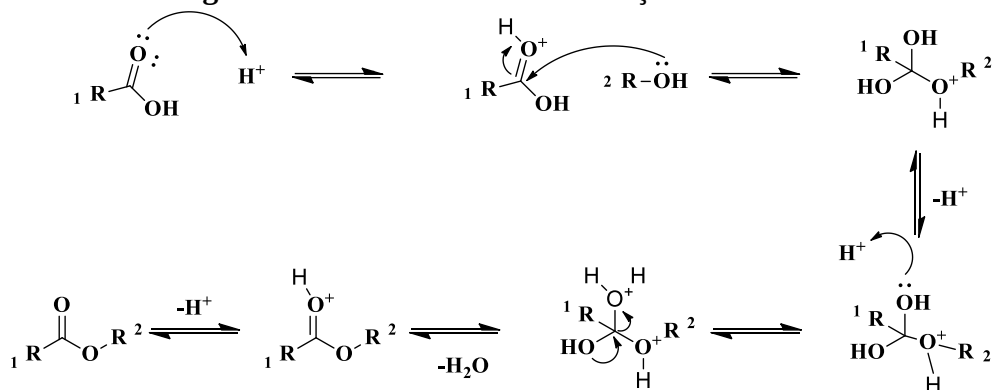
Para se enquadrar em tais condições, de acordo com a RO5, a molécula deve apresentar: (i) peso molecular inferior a 500 u.m.a.; (ii) log P inferior a 5; (iii) número de aceptores de ligações de hidrogênio, igual ou menor que 10 e (iv) número de doadores de ligações de hidrogênio, igual ou menor que 5 (LIPINSKI, 2004; PATRICK, 2013).

Buscando-se expandir o espaço amostral de moléculas disponíveis, extensões da RO5 englobando outras propriedades também foram levadas em consideração, como as regras estabelecidas por Veber, que determinou a influência da flexibilidade (número de

ligações rotáveis) para a biodisponibilidade oral de uma molécula. Sugeriu-se que uma molécula deve apresentar um número de ligações rotáveis menor que 10 e área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 Å² (VEBER *et al.*, 2002). Tais extensões da RO5 não levam em consideração o peso molecular, porque foi demonstrado que o alto peso molecular em uma molécula, por si só, não resulta em baixa biodisponibilidade oral. De fato, tal propriedade foi considerada importante porque moléculas grandes tendem a apresentar maior quantidade de grupos funcionais e, conseqüentemente, serão capazes de formar mais ligações de hidrogênio (PATRICK, 2013).

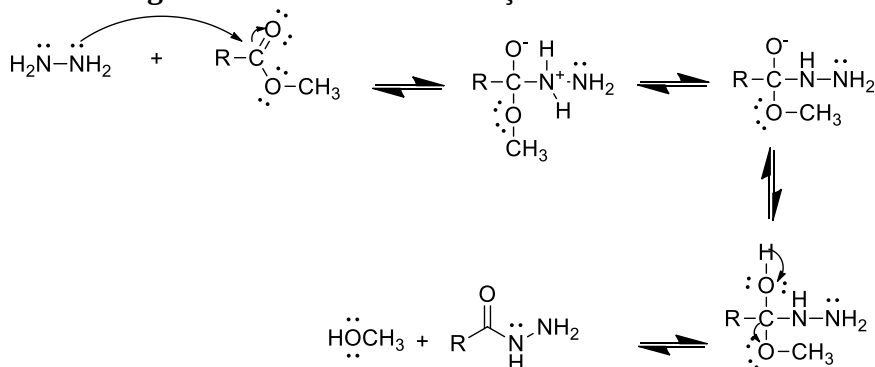
Seguindo as propriedades assinaladas pela RO5 e flexibilização, a série de derivados do 5-nitro-2-fururilideno foi sintetizada. A partir da estrutura da NF, os compostos apresentaram substituições no grupamento benzênico da molécula, a partir da retirada da parte fenila e a inclusão dos substituintes heterocíclicos, alifáticos, cicloaquila, alquila e 4-benzeno substituídos. O processo sintético realizado para obtenção dos compostos nitrofurânicos ocorreu em duas etapas, sendo estas a obtenção dos intermediários hidrazídicos e, posteriormente, a obtenção das bases de Schiff (TAVARES; PENNA; AMARAL, 1997). A pequena quantidade de etapas sintéticas para obtenção dos compostos viabiliza o escalonamento da reação, denotando o potencial deste método para aplicação no âmbito da indústria farmacêutica.

Brevemente, o mecanismo reacional envolvido na obtenção dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos se dá, inicialmente, pela reação de esterificação de Fisher seguida de hidrazinólise, a fim de se obter o intermediário hidrazídico. A esterificação ocorre por meio do refluxo de ácidos carboxílicos e álcool (em excesso). Dessa maneira, a reação sucede-se de maneira reversível e a presença de catalisador ácido e excesso de álcool deslocam o equilíbrio da reação para a formação de produtos. O mecanismo se dá a partir da protonação do oxigênio carbonílico do ácido carboxílico, próton proveniente do álcool que se encontra em estado protonado devido ao meio reacional ácido. Em seguida, o ataque nucleofílico do álcool no carbono carbonílico gera a formação de um intermediário reacional tetraédrico. Uma das hidroxilas do intermediário sofre protonação por transferência de prótons com o álcool, liberando uma molécula de água e formando o éster. As moléculas de álcool protonados no meio reacional podem reagir com ácidos carboxílicos ainda não reagidos, até atingir o equilíbrio (MARCH, 1992; MORAES CALVALCANTE *et al.*, 2015; SOLOMONS, G., 2000). O mecanismo reacional da formação do éster está ilustrado na Figura 11.

Figura 11. Mecanismo de esterificação de Fischer.

Fonte: Cavalcante *et al.*, 2015 (adaptado).

Ademais, a reação de hidrazinólise ocorreu sem a purificação do éster intermediário formado, por meio da substituição nucleofílica. Graças ao meio reacional ácido e álcool em excesso, o éster substituído sofre ataque nucleofílico da hidrazina, formando um intermediário íon oxônio instável, que, por sua vez, sofre ataque nucleofílico dos elétrons livres do nitrogênio da hidrazina, o que resulta em intermediário tetraédrico dipolar, o qual é dissociado por meio da eliminação da alcoxila e a formação de hidrazidas (Figura 12) (MARCH, 2001; SOLOMONS, G., 2000).

Figura 12. Mecanismo da reação de hidrazinólise.

Fonte: March, 2001 (adaptado).

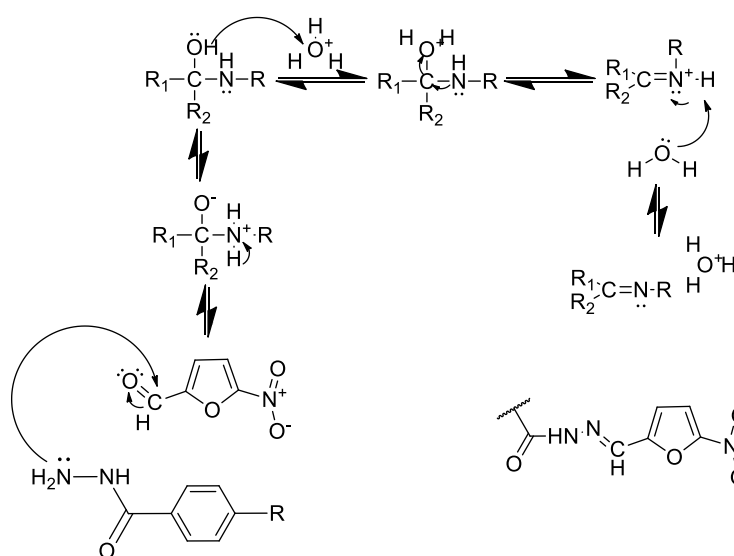
Por fim, a última reação se dá por meio do mecanismo ilustrado na Figura 13. A reação de obtenção da base de Schiff ocorre entre a hidrazida substituída obtida e 5-nitro-2-furaldeído em meio reacional ácido, sob aquecimento.

Primeiramente, ocorre o ataque nucleofílico da amina primária (proveniente da benzidrazida) ao carbono da carbonila (proveniente do aldeído). O meio reacional de caráter ácido é necessário para garantir a protonação da carbonila que fica suscetível ao ataque nucleofílico dos elétrons livres (SOLOMONS, 2004), ocorrendo, então, a liberação de uma molécula de água dos intermediários da reação e a consequente

desprotonação do intermediário imina, formando-se, assim, a base de Schiff desejada (MARCH, 2001).

Alternativamente, a obtenção da base de Schiff também pode ser obtida por meio dessa reação ocorrendo em temperatura ambiente e utilizando-se etanol como meio reacional. O ataque nucleofílico do nitrogênio da hidrazina sobre carbono carbonílico do aldeído ocorre sem a ação catalítica dos ácidos (DA COSTA *et al.*, 2012). Tal metodologia foi adotada para casos em que os substituintes dos compostos de caráter hidrofílicos apresentarem dificuldades sintéticas, devido à presença de água no meio reacional ácido. Palace-Berl (2018) observou que os derivados obtidos apresentavam maior pureza e faixas de fusão mais estreita. Foi observado que o mecanismo de reação por catálise ácida pode levar à perda do caráter nucleofílico da amida das hidrazidas substituídas quando os substituintes são doadores de elétrons, tornando-os mais favoráveis à protonação do que substituintes de caráter aceptor de elétrons.

Figura 13. Mecanismo de reação para obtenção da base de Schiff.



Fonte: March, 2001 (adaptado).

Toda a biblioteca de compostos disponível teve sua faixa de fusão verificada, a fim de se observar se havia degradação, presença de impureza ou água. Compostos com faixas de fusão ampla foram submetidos ao processo de recristalização de DMF. Os compostos apresentaram, em sua maioria, valores de faixas de fusão compatíveis com os descritos na literatura e apresentaram estreito intervalo, o que indica grau de pureza satisfatório. Os compostos **9**, **11**, **14**, **16**, **17**, **24**, **27**, **28** e **29** apresentaram inicialmente intervalo amplo, mas, após o processo de recristalização, demonstraram valores condizentes com a

literatura. Os valores obtidos de faixa de fusão após o processo de recristalização estão disponíveis no Anexo (Anexo 1 – Faixas de fusão experimentais e da literatura da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos).

Foram considerados como critério de aceitação os valores de faixa de fusão de até 2 graus, de maneira que os resultados encontrados se mostrassem próximos à faixa reportada pela literatura (*Reaxys*TM - *Beilstein, Gmelin and Chemistry Patent*; Palace-Berl, 2016). Adicionalmente, foram realizadas preparações dos compostos da quimioteca de maneira a repor o estoque, quando necessário. Os espectros de ressonância magnética dos compostos que foram ressintetizados estão disponíveis no Anexo (Anexo 2 – Espectros de RMN ¹H e ¹³C dos compostos sintetizados da quimioteca de derivados 5-nitro-furfurilidênicos).

5.2 Determinação da atividade anti-*Leishmania* contra a forma promastigota de *L. (L.) infantum*

A triagem preliminar para determinação do potencial inibitório da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos contra a forma promastigota da *L. (L.) infantum* foi realizada de maneira a se obter dados necessários para os estudos posteriores de relações estrutura-atividade.

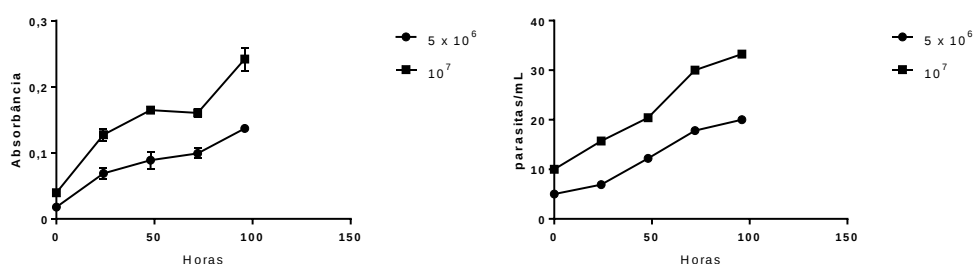
Apesar de a forma extracelular do parasita não ser infectante em mamíferos e humanos e somente estar presente no vetor, estudos iniciais de triagem geralmente são realizados devido a maior facilidade de manuseio e cultivo. Por isso, antes dos estudos em amastigotas (forma intracelular), optou-se por identificar os compostos mais ativos contra promastigotas do parasita e, assim, de maneira preliminar, identificar quais estruturas apresentam maior potencial de inibição do crescimento das culturas parasitárias. Vale ressaltar que deve ser levado em conta que compostos que apresentaram alta atividade em triagem preliminares podem ser inativos contra amastigotas e vice-versa (MUYLDER *et al.*, 2011), de forma que, ao se realizar os ensaios dos compostos contra as formas amastigotas intracelulares, não devem ser descartadas as estruturas que apresentaram também perfil de atividade moderada e baixa.

Determinou-se inicialmente o padrão de crescimento da cepa de *Leishmania (Leishmania) infantum*, a fim de se identificar o momento em que a cultura está em fase log de crescimento para ser utilizada nos ensaios posteriores. Foi realizada a construção da curva de crescimento em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% SFB e 2% urina masculina filtrada. Apesar de ser observado em ensaios preliminares que, em

meio M199, as formas promastigotas crescem com maior rapidez (dados não divulgados), a presença do indicador vermelho de fenol no meio M199 interfere com a leitura das densidades ópticas (RISS *et al.*, 2013; TADA *et al.*, 1986), impossibilitando o seu uso para os ensaios de suscetibilidade das formas promastigotas contra os compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos. Portanto, o meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol foi escolhido para conduzir os ensaios de determinação da atividade inibitória.

A Figura 14 mostra a curva de crescimento entre os períodos de 0 a 96 horas para duas suspensões parasitárias com concentração de 5×10^6 e 10×10^6 parasitas/mL cultivadas em meio RPMI 1640. As curvas de crescimento foram quantificadas a cada 24 horas pela medida da densidade óptica (absorbância) em comprimento de onda ajustado para 590 nm e contagem em câmara de Neubauer. Os ensaios relativos às curvas de crescimento foram realizados em triplicata, com repetição de um ensaio independente.

Figura 14. Curva de crescimento relativo às culturas da forma promastigota de *L. (L) infantum* durante 96 horas de incubação.



Cada curva representa o crescimento (média e desvio-padrão) das suspensões parasitárias iniciais de 5×10^6 (círculo) e 10^7 parasitas/mL (quadrado). Leituras da densidade óptica (absorbância, direita) e contagem (parasitas/mL, esquerda) foram realizadas entre 0 a 96 horas. $\lambda = 405$ nm.

O *dt*, isto é, o tempo necessário para as culturas de promastigotas dobrar de população, foi de 34 horas para ambas as concentrações entre os tempos de 24 e 48 horas. Pode-se observar a existência de linearidade entre a absorbância e a turbidez do meio, isto é, quanto mais concentrado, maior a absorbância. Os resultados obtidos por contagem corroboram com aqueles obtidos por medida de absorbância.

Esse ensaio foi realizado a fim de observar a dinâmica de crescimento das culturas de promastigotas em meio RPMI 1640 (10% FSB e 2% urina). Por fim, foi possível visualizar o crescimento exponencial relativo a ambas as concentrações entre 24 e 96 horas, garantindo que, para os demais ensaios, as culturas entre os períodos de 3 a 4 dias de incubação certamente estão em fase log de crescimento.

Anexo (Anexo 3 - Curva de calibração para culturas de promastigotas de *L. (L.) infantum*). A curva foi utilizada durante os ensaios, a fim de avaliar a concentração de parasitas presente no preparo do inóculo inicial e na leitura final, em microplacas, do ensaio de inibição da atividade biológica dos compostos e fármacos de referência.

DMSO foi utilizado no ensaio para auxiliar a solubilização dos compostos. Preliminarmente, foram avaliadas duas concentrações finais de DMSO, 1% e 0,5%, a fim de determinar se as concentrações testadas apresentavam toxicidade significativa contra as formas promastigotas do parasita. Foi verificado que não houve alteração do crescimento quando comparado com controles positivos de solvente nas condições testadas. A Tabela 3 mostra os valores de densidade ótica obtidos a partir de triplicatas e dois ensaios independentes, em comprimento de onda de 590 nm do controle positivo e controle positivo do solvente após 72 horas de incubação a 25 °C. O teste não paramétrico de variação *Kruskal Wallis* foi utilizado para determinar se não houve alteração significativa do crescimento de ambas concentrações de DMSO quando comparados com o controle positivo ($p < 0,05$).

Tabela 3. Avaliação da variação de absorbância em diferentes concentrações de DMSO comparadas com controle positivo para cepa de *L. (L.) infantum*.

Absorbância			P
CP	CSP - 1 %	CSP - 0,5 %	
(média ± dp)	(média ± dp)	(média ± dp)	
0,458 ± 0,001	0,445 ± 0,01	0,407±0,006	0,368

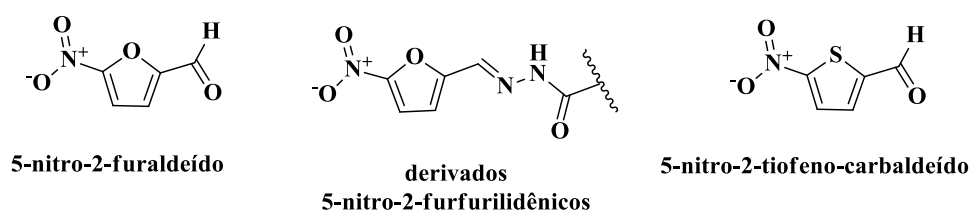
CP: controle positivo; CSP- 0,5% controle positivo DMSO 0,5%; CSP-1%: controle positivo DMSO 1%. Teste estatístico de Kruskal-Wallis; intervalo de confiança de 95 %. Dados apresentados como média e desvio-padrão (dp) das triplicatas.

A obtenção dos valores de IC_{50} (μM) dos compostos testados, nifuroxazida e fármacos de referência, foi realizada a partir da função da curva sigmoidal não linear de dose-resposta com o programa Origin 8.0 (licença acadêmica) ou GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc.). Para construção das curvas foram utilizados até 10 concentrações, obtidas através de diluição seriada 1:2 com variações de 100 μM a 0,0097 μM . Através da Equação 3 (vide tópico 4.2.6 - Tratamento de dados obtidos para determinação da atividade anti-*Leishmania* (IC_{50})), os valores de inibição expressos em %IC referente a cada concentração testada dos compostos foram calculados. Todos

os ensaios foram realizados em triplicata com, pelo menos, uma repetição de ensaio independente.

A fim de constatar a contribuição do efeito anti-*Leishmania* relativo ao arcabouço químico 5-nitro-2-furaldeído (5-nitro-2-furaldehyde, 99% - 170968 - Sigma-Aldrich®) (Figura 16) que compõe a quimioteca de compostos estudados, foi também determinado o valor de IC₅₀ (μM) para o reagente, a partir da determinação das curvas dose-resposta correspondentes à inibição de crescimento de culturas de promastigotas de *L. (L.) infantum*. Uma vez que a estrutura é utilizada como reagente precursor para a síntese dos compostos analisados, adicionalmente, o composto 5-nitro-2-tiofeno-carbaldeído (5-nitro-2-thiophenecarboxaldehyde, 98% - 302295 - Sigma-Aldrich®) (Figura 16) também foi incorporado ao ensaio, a fim de avaliar comparativamente a contribuição individual tanto do grupamento 5-nitro-2-tiofeno quanto do 5-nitro-2-furano para a atividade biológica estudada.

Figura 16. Estrutura química dos reagentes 5-nitro-2-furaldeído, 5-nitro-2-tiofeno-carbaldeído e estrutura do arcabouço químico que compõe a quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.



Fonte: elaborado pela autora.

Os resultados obtidos para as curvas dose-resposta e valores calculados de IC₅₀ e IC₉₀ denotam a contribuição do grupamento 5-nitro-2-furaldeído para a atividade biológica anti-*Leishmania* (IC₅₀: 11,49 ± 0,91 μM) (Figura 17 e Tabela 4). O grupamento 5-nitro-2-tiofeno (IC₅₀: 8,16 ± 0,54 μM) (Figura 18 e Tabela 5) apresentou valores referentes à inibição do crescimento das culturas de promastigotas ligeiramente mais ativo que o grupamento 5-nitro-2-furaldeído. Notavelmente, em relação aos valores de IC₉₀ (μM), o reagente 5-nitro-2-tiofeno apresentou 4 vezes maior atividade em relação ao reagente 5-nitro-2-furaldeído, isto é, utilizando-se o índice de IC₉₀ como um indicador de inibição total, menores concentrações do reagente 5-nitro-2-tiofeno são necessárias para eliminar até 90% das culturas de promastigotas.

Tabela 4. Inibição do crescimento parasitário de *L. (L.) infantum* para diferentes concentrações do 5-nitro-2-furaldeído.

Concentração		IC
μM	log (M)	(média $\pm$ dp)
100	-4	100 $\pm$ 2,2
50	-4,3	79 $\pm$ 0,8
25	-4,6	66 $\pm$ 4
12,5	-4,9	50 $\pm$ 1,5
6,25	-5,3	39 $\pm$ 3,9
3,12	-5,6	21 $\pm$ 2,04
1,6	-5,9	14 $\pm$ 5,6
0,8	-6,2	13 $\pm$ 5,4
0,4	-6,5	8 $\pm$ 5,3

Dados apresentados em média e desvio-padrão (dp) de ensaios realizados em triplicata.

IC: porcentagem (%) de inibição de crescimento.

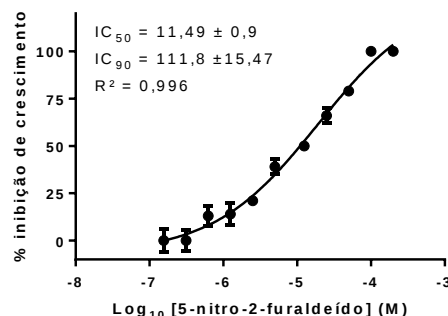
Tabela 5. Inibição do crescimento parasitário de *L. (L.) infantum* para diferentes concentrações do 5-nitro-2-tiofeno carbaldeído.

Concentração		IC
μM	log (M)	(média $\pm$ dp)
100	-4	100 $\pm$ 1,5
50	-4,3	100 $\pm$ 1,1
25	-4,6	94 $\pm$ 1,5
12,5	-4,9	69 $\pm$ 3,3
6,25	-5,3	40 $\pm$ 1,9
3,12	-5,6	23 $\pm$ 3,1
1,6	-5,9	12 $\pm$ 3,8
0,8	-6,2	9 $\pm$ 5
0,4	-6,5	0 $\pm$ 4,2
0,2	-6,8	0 $\pm$ 3,7

Dados apresentados em média e desvio-padrão (dp) de ensaios realizados em triplicata.

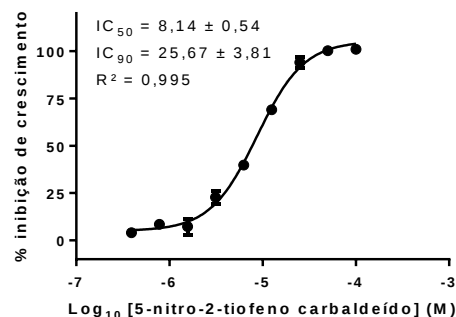
IC: porcentagem (%) de inibição de crescimento.

Figura 17. Curva dose-resposta correspondente à inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do 5-nitro-2-furaldeído.



Valores de atividade biológica: IC_{50} , IC_{90} e coeficiente de determinação ajustado (R^2).

Figura 18. Curva dose-resposta correspondente à inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do 5-nitro-2-tiofeno carbaldeído.



Valores de atividade biológica: IC_{50} , IC_{90} e coeficiente de determinação ajustado (R^2).

Visto que a quimioteca de compostos analisada foi sintetizada com o objetivo de ação para o *T. cruzi*, tais achados demonstram que, apesar dos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp pertencerem a mesma família de protozoários tripanossomatídeos, projeções em relação aos efeitos dos compostos 5-nitro-2-furfurilicênicos não podem ser realizadas sem cautela, já que, no contexto dos compostos estudados, foi identificado, em nosso grupo de estudo (PAULA *et al.*, 2009), que, em relação aos parasitas da espécie *T. cruzi*, os derivados com o grupamento 5-nitro-2-furano apresentaram maior potência em relação ao grupamento 5-nitro-2-tiofeno.

Em contrapartida, na literatura, já foi reportado, em relação a diferentes espécies de *Leishmania*, que derivados com o grupamento 5-nitro-2-tiofeno se mostraram mais eficazes em relação ao grupamento 5-nitro-2-furano nas mesmas condições de estudo, quanto à situação contrária (COIMBRA *et al.*, 2018; POORRAJAB *et al.*, 2009; RANDO *et al.*, 2010). Isso implica que ambos os reagentes precursores apresentam potencial de interesse para a atividade biológica e que o diferencial quanto à eficácia depende da natureza dos substituintes químicos presentes nos compostos estudados, além da espécie de *Leishmania* estudada.

Para os ensaios de inibição de crescimento, a miltefosina e a anfotericina B desoxicolato foram consideradas como fármacos de referência. O composto-protótipo, a nifuroxazida, foi considerada, uma vez que sua estrutura química foi utilizada como arcabouço químico para o planejamento da quimioteca de compostos estudados.

A nifuroxazida apresentou valor de IC_{50} de $5,93 \pm 0,5 \mu M$ e os fármacos de referência miltefosina e anfotericina B apresentaram valores de $8,58 \pm 1,6 \mu M$ e $0,02 \pm 0,002 \mu M$. Os valores porcentagem de inibição do crescimento para as diferentes concentrações testadas da nifuroxazida e dos fármacos de referência estão disponíveis da Tabela 6 a 8, assim como as respectivas curvas dose-resposta e os valores de IC_{50} (μM) estão ilustrados nas Figuras 19 a 21.

Tabela 6. Inibição do crescimento parasitário de culturas de promastigotas de *L. (L.) infantum* para diferentes concentrações de nifuroxazida.

Concentração		IC
μM	log (M)	(média $\pm$ dp)
100	-4	85 $\pm$ 8,4
50	-4,3	78 $\pm$ 5,1
25	-4,6	77 $\pm$ 2,1
12.5	-4,9	66 $\pm$ 6,5
6.25	-5,2	57 $\pm$ 6,7
3.12	-5,5	43 $\pm$ 1,7
1.6	-5,8	34 $\pm$ 0,1
0.8	-6,1	33 $\pm$ 3,9

Dados apresentados em média e desvio-padrão (dp) de ensaios em triplicata e repetição de, pelo menos, um ensaio independente.

IC: porcentagem (%) de inibição de crescimento.

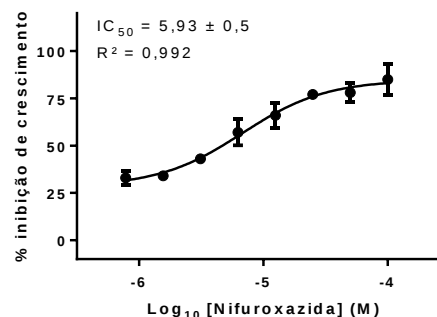
Tabela 7. Inibição do crescimento parasitário de culturas de promastigotas de *L. (L.) infantum* para diferentes concentrações de miltefosina.

Concentração		IC
μM	Log (M)	(média $\pm$ dp)
100	-4	96 $\pm$ 1,5
50	-4,3	96 $\pm$ 1,5
25	-4,6	89 $\pm$ 5,3
12.5	-4,9	81 $\pm$ 5
6.25	-5,2	40 $\pm$ 2,5
3.12	-5,5	31 $\pm$ 4,1
1.6	-5,8	21 $\pm$ 5
0.8	-6,1	19 $\pm$ 7,3

Dados apresentados em média e desvio-padrão (dp) de ensaios em triplicata e repetição de, pelo menos, um ensaio independente.

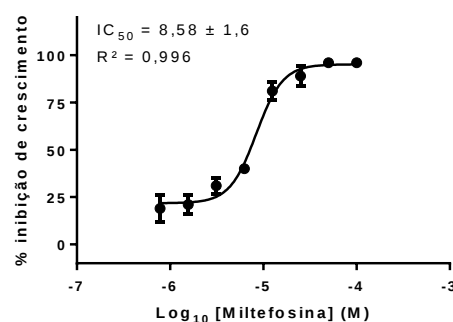
IC: porcentagem (%) de inibição de crescimento.

Figura 19. Curva dose-resposta correspondente à inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações de nifuroxazida.



Valores de atividade biológica: IC₅₀ e coeficiente de determinação ajustado (R²).

Figura 20. Curva dose-resposta correspondente à inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações de miltefosina.



Valores de atividade biológica: IC₅₀ e coeficiente de determinação ajustado (R²).

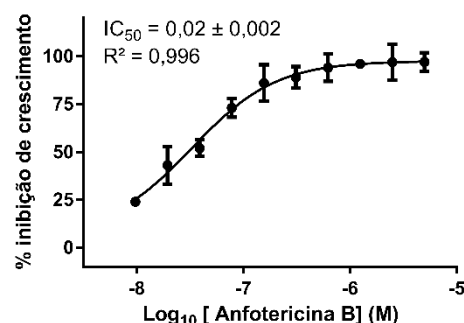
Tabela 8. Inibição do crescimento parasitário de *L. (L.) infantum* para diferentes concentrações de anfotericina B.

Concentração		IC
μM	Log (M)	(média $\pm$ dp)
5	-5,3	97 $\pm$ 4,9
2,5	-5,6	97 $\pm$ 9,5
1,25	-5,9	96 $\pm$ 2
0,63	-6,2	94 $\pm$ 7,2
0,31	-6,5	89 $\pm$ 5,7
0,16	-6,8	86 $\pm$ 9,6
0,08	-7,1	73 $\pm$ 4,9
0,04	-7,4	52 $\pm$ 4,4
0,02	-7,7	43 $\pm$ 9,8
0,01	-8,0	24 $\pm$ 0,1

Dados apresentados em média e desvio-padrão (dp) de ensaios em triplicata e repetição de, pelo menos, um ensaio independente.

IC: porcentagem (%) de inibição de crescimento.

Figura 21. Curva dose-resposta correspondente à inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações de anfotericina B.



Valores de atividade biológica: IC_{50} e coeficiente de determinação ajustado (R^2).

O conjunto de compostos pertencentes à quimioteca de derivados 5-nitro-2-furfurilidênico foi avaliada quanto ao potencial de inibição do crescimento de culturas da forma promastigota de *L. (L.) infantum*. As curvas de dose-resposta bem como os valores de porcentagem de inibição estão disponíveis no Anexo 4 (ANEXO 4 - Curva dose-resposta correspondentes à inibição de crescimento parasitário para as formas promastigotas de *L. (L.) infantum*). Os valores de inibição representados pelo IC_{50} (μM) referente a cada composto analisado, à nifuroxazida e aos fármacos de referência (miltefosina e anfotericina B) estão dispostos na Tabela 9 e na Figura 22. Para os compostos **14** [$\text{C}_6\text{H}_4\text{-4-NH}_2$] e **31** [$\text{C}_6\text{H}_4\text{-4-SO}_2\text{NH}_2$] não foram calculados valores de atividade biológica devido à sua precipitação durante o ensaio.

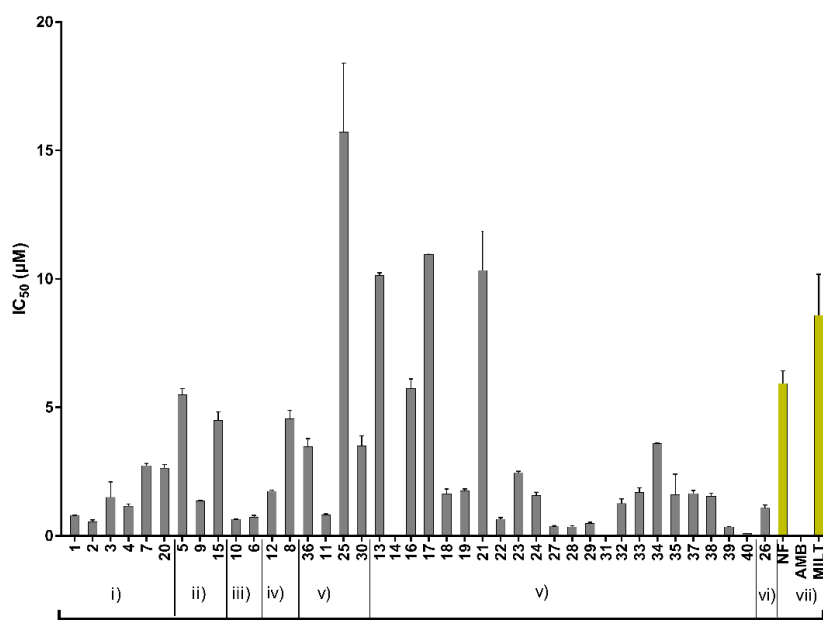
Os valores de atividade biológica (IC_{50}) também foram transformados em valores de potência (pIC_{50}), calculados como $-\log\text{IC}_{50}$ em molar (M). Tal representação da atividade biológica garante a interpretação mais intuitiva da eficiência dos compostos estudados, visto que altos valores de pIC_{50} representam alta eficiência de inibição do crescimento das culturas parasitárias. Foram atribuídos intervalos de classificação baseados na média e no desvio-padrão da quimioteca, com valores de atividade biológica

em potência como de alta (pIC_{50} entre 6,70 e 6,22), moderada (pIC_{50} entre 6,22 e 5,28) e baixa (pIC_{50} entre 5,22 e 4,79) atividade.

Em comparação com o composto protótipo, 87% dos compostos apresentaram maior capacidade inibitória que a nifuroxazida. Foram considerados como de baixa atividade os compostos **25** (IC_{50} : $15,72 \pm 2,67 \mu M$), **13** (IC_{50} : $10,48 \pm 1,48 \mu M$), **17** (IC_{50} : $10,97 \pm 1,06 \mu M$) e **21** (IC_{50} : $10,33 \pm 1,53 \mu M$). Vale ressaltar que os substituintes químicos dos compostos de baixa atividade são análogos 4-benzeno substituídos para os compostos **13** [C_6H_4 -4- CH_3], **17** [C_6H_4 -4- C_2H_5] e **21** [C_6H_4 -4- C_3H_7] com cadeias alquilas de até três carbonos e o composto **25** [C_6H_4 -3- NO_2], com substituinte 3-nitrobenzeno.

Os compostos considerados como de alta atividade foram: **40** (IC_{50} : $0,2 \pm 0,019 \mu M$), **39** (IC_{50} : $0,35 \pm 0,008 \mu M$), **28** (IC_{50} : $0,35 \pm 0,04 \mu M$) e **27** (IC_{50} : $0,38 \pm 0,012 \mu M$). Estes análogos também são 4-benzeno substituídos, mas de maior caráter lipofílico, com os substituintes 4-butil e 4 terc-butil para os compostos **27** [C_6H_4 -4- C_4H_9] e **28** [C_6H_4 -4- $tert-C_4H_9$], 4-heptil (**39** [$-C_6H_4$ -4- C_7H_{15}], 4-heptoxi (**40** [$-C_6H_4$ -4- OC_7H_{15}]) e 4-propoxi (**29** [$-C_6H_4$ -4- OC_3H_7]), sugerindo que o aumento do volume na cadeia lateral favorece a atividade biológica contra as formas promastigotas de *L. (L.) infantum*.

Figura 22. Atividade anti-*Leishmania* (IC_{50}) de derivados furfurilidênicos e fármacos de referência.

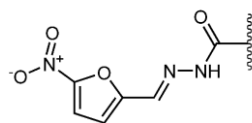


Substituintes; i): alquila; ii): heterocíclicos; iii): cicloalquila; iv): benzeno; v): 2/3 ou 3,4-benzeno substituídos; vi): 4-benzeno substituídos; vii): naftaleno; viii): fármacos de referência

NF: nifuroxazida; AMB: anfotericina B; MILT: miltefosina (em amarelo).

Dados apresentados relativos à média e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata com pelo menos um ensaio independente. Compostos 14 e 31 não apresentaram valores de inibição nas condições dos ensaios sem sua precipitação.

Tabela 9. Atividade anti-*Leishmania* dos compostos nitro-heterocíclicos. composto protótipo e fármacos de referência contra a forma promastigota da *L. (L) infantum*.



Composto	IC ₅₀ (μM) (média ± dp)	pIC ₅₀	Composto	IC ₅₀ (μM) (média ± dp)	pIC ₅₀
1	0,8 ± 0,008	6,09	21	10,33 ± 1,53	4,98
2	0,6 ± 0,07	6,22	22	0,65 ± 0,06	6,18
3	1,51 ± 0,02	5,81	23	2,46 ± 0,06	5,60
4	1,16 ± 0,11	5,9	24	1,57 ± 0,13	5,80
5	5,5 ± 0,65	5,03	25	15,72 ± 2,67	4,80
6	0,73 ± 0,07	6,13	26	1,08 ± 0,12	5,96
7	2,73 ± 0,09	5,56	27	0,38 ± 0,012	6,42
8	4,56 ± 0,32	5,34	28	0,35 ± 0,04	6,45
9	1,37 ± 0,02	5,86	29	0,48 ± 0,04	6,31
10	0,65 ± 0,005	6,18	30	3,5 ± 0,4	5,45
11	0,82 ± 0,04	6,08	31	-	-
12	1,74 ± 0,05	5,75	32	1,26 ± 0,18	5,90
13	10,14 ± 1,48	4,99	33	1,69 ± 0,18	5,77
14	-	-	34	3,6 ± 0,064	5,44
15	4,5 ± 0,32	5,34	35	1,6 ± 0,8	5,79
16	5,74 ± 0,37	5,24	36	3,48 ± 0,31	5,45
17	10,97 ± 1,06	4,95	37	1,65 ± 0,12	5,78
18	1,64 ± 0,19	5,78	38	1,55 ± 0,11	5,81
19	1,75 ± 0,08	5,75	39	0,35 ± 0,008	6,45
20	2,64 ± 0,14	5,57	40	0,2 ± 0,019	6,69
NF	5,93 ± 0,5	5,22	MILT	8,28 ± 0,33	5,08
AMB	0,02 ± 0,002	7,52			

Os valores de atividade biológica IC₅₀ (μM) estão apresentados pela média e desvio-padrão (dp) de, pelo menos, dois ensaios independentes e pIC₅₀ (-logIC₅₀). MILT: miltefosina; AMB: anfotericina B e NF: nifuroxazida.

Dentre os compostos e fármacos de referência avaliados, a anfotericina B se mostrou como o fármaco mais potente quanto à capacidade de inibição do crescimento das culturas de promastigotas de *L. (L.) infantum*, o que confirma, também comumente relatado pela literatura, que a anfotericina se constitui como um dos fármacos mais eficazes para o tratamento das diversas formas de leishmaniose. Além disso, em sua forma lipossomal, é sendo considerada como fármaco preferencial para o tratamento de leishmaniose visceral (LV) na Europa, Estados Unidos e sul da Ásia (MORIZOT *et al.*, 2016; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2017). Apesar de o fármaco apresentar grande eficácia, apresenta como principais desvantagens o alto grau de toxicidade, regime terapêutico de difícil adesão, tratamentos longos com pouca tolerância e alto custo, o que demonstra, portanto, a necessidade de busca por candidatos a fármacos menos tóxicos, administrados oralmente e capazes de desempenhar efeitos farmacológicos satisfatório (KATSUNO *et al.*, 2015; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2017).

A quimioteca de compostos testados mostrou-se, em geral, mais eficiente que a miltefosina, o único fármaco de referência de administração por via oral e que apresentou IC₅₀ de 8,58±1,6 µM. Tal fármaco, apesar de demonstrado ser menos eficaz que a anfotericina B, foi considerado para o tratamento da leishmaniose devido a ser o primeiro fármaco administrado por via oral. Infelizmente, os insurgentes casos de LV que apresentam resistência à terapia com miltefosina em regiões altamente endêmicas, como a Índia, vem tornando ainda mais urgente a necessidade de pesquisa por alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose (SRIVASTAVA *et al.*, 2017; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2017).

Nesse contexto, os compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos se mostram como promissores candidatos a fármacos anti-*Leishmania*, apresentando vantagens como a possibilidade da via de administração oral e eficácia comparável com a atual terapia medicamentosa em relação à forma promastigota da *L. (L.) infantum*. Visto que a toxicidade à terapia medicamentosa é um importante fator de dificuldade à adesão ao tratamento medicamentoso atual, determinar o perfil de citotoxicidade da quimioteca de compostos se mostra, portanto, como uma importante etapa na investigação do potencial destes compostos como potenciais candidatos a fármacos.

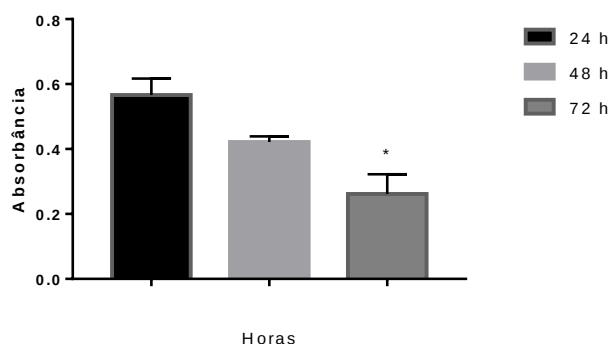
5.3 Determinação do valor de CC₅₀ dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos em macrófagos THP-1 diferenciados

A partir dos 40 compostos da quimioteca analisada, foram selecionados 25% dos compostos para avaliar a sua toxicidade, partindo-se da distribuição dos valores de atividade biológica, expressos em IC₅₀ (μM), contra a forma promastigota de *L. (L.) infantum*. A escolha dos compostos foi realizada de maneira a selecionar compostos de atividade biológica baixa (**13**), moderada (**1**, **2**, **8** e **15**) e alta (**27**, **39** e **40**) e diversidade estrutural dos substituintes. Os ensaios foram realizados com o objetivo de determinar se a classe de compostos derivada do 5-nitro-2-furfurilidênicos apresenta toxicidade contra as células THP-1 e verificar a viabilidade da realização dos ensaios de inibição em relação à forma intracelular amastigota da *L. (L.) infantum*.

A determinação do índice de citotoxicidade (CC₅₀) dos compostos foi realizada também, a fim de se obter o índice de seletividade (IS), determinado pela razão entre CC₅₀ e IC₅₀, ou seja, a quantificação de quanto os derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos são mais tóxicos e seletivos para os parasitas (promastigotas e amastigotas) do que para as células hospedeiras. A quimioteca em questão já foi avaliada quanto à toxicidade em relação as células de linhagem monocíticas murinas J774 e células da linhagem LLC-MK2 (PALACE-BERL, 2016; PALACE-BERL *et al.*, 2013).

A viabilidade das culturas de macrófagos não tratadas, ou seja, 100% viáveis, foi considerada como controle positivo e acompanhada durante 24, 48 e 72 horas pelo método colorimétrico MTT. As culturas com 72 horas de incubação apresentaram diferença de viabilidade celular significativa ($p > 0,05$) quando comparadas com a viabilidade celular das culturas de 24 horas (Figura 23), consideradas através do teste estatístico de Kruskal-Wallis; intervalo de confiança de 95%. Apesar disso, nos tempos 48 e 72 horas, não foi identificada diferença estatística para a viabilidade celulares. Como a determinação da concentração tóxica de cada composto foi determinada através da comparação das diferentes concentrações testadas com o controle positivo respectivo para cada tempo de incubação, tal diminuição da viabilidade celular apresentada não afetou o cálculo de CC₅₀.

Figura 23. Viabilidade celular de macrófagos THP-1 correspondentes a culturas não tratadas (100% viáveis) incubadas durante 24, 48 e 72 horas.



Teste de Kruskal-Wallis com intervalo de confiança de 95 %. $F = 36,87$; $p < 0,05$ (*). Resultados expressos em média e desvio-padrão de três experimentos independentes.

Os compostos avaliados tiveram seu grau de toxicidade (CC_{50}) avaliado ao longo do período de 72 horas de incubação em relação à viabilidade de culturas de macrófagos THP-1 diferenciados não tratados. As curvas dose-resposta de cada compostos e fármacos de referência testados bem como os valores de porcentagem de toxicidade estão disponíveis no Anexo 5 (Anexo 5 – Curvas dose-resposta relativas à toxicidade dos compostos contra a células THP-1 durante 24, 48 e 72 horas). Para os derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos avaliados e fármacos de referências (miltefosina e anfotericina B), na Tabela 10 estão dispostos os respectivos valores de citotoxicidade (CC_{50}), atividade biológica (IC_{50}) contra a forma promastigota da *L. (L.) infantum* e índice de seletividade (IS). Valores de CC_{50} indicados como maior que 100 μM ou 200 μM ($> 100 \mu M$ ou $> 200 \mu M$) indicam que os compostos avaliados não apresentaram toxicidade à viabilidade celular nas maiores concentrações analisadas pelo ensaio.

O índice de seletividade (IS) é uma ferramenta que permite a identificação da seletividade dos compostos em relação ao parasita ou às células, calculado pela razão entre os valores de CC_{50} apresentado em relação às células e os valores de IC_{50} contra a forma promastigota do parasita. Idealmente, um composto deve apresentar alta eficácia contra o parasita (baixo IC_{50}) e baixa toxicidade celular (alto CC_{50}), além de ser capaz de eliminar os parasitas em concentrações menores que a dose que causa toxicidade celular.

Tabela 10. Concentração citotóxica (CC₅₀) em células THP-1 durante os tempos 24, 48 e 72 horas e IC₅₀ atividade anti-*Leishmania* (IC₅₀) tratados com compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos e fármacos de referência.

Compostos	CC ₅₀ (µM)			IC ₅₀ (µM) (média ± dp)	IS
	24 horas	48 horas	72 horas		
1	>200	> 100	97,97 ± 17,94	0,8 ± 0,008	>122
2	>200	> 100	>100	0,6 ± 0,006	>166
8	43,43 ± 0,9	49,42 ± 6,6	53,188 ± 3,96	4,56 ± 0,32	21,92
13	30,28 ± 3,9	35,34 ± 5,39	30,23 ± 2,59	10,14 ± 0,1	2,98
15	50 ± 0,9	45 ± 0,9	27,33 ± 1,35	4,5 ± 0,32	6,07
39	>100	>100	>100	0,35 ± 0,008	> 285,71
40	>200	> 100	>100	0,2 ± 0,019	> 500
AMB	32,55 ± 2,8	35,55 ± 1	25,1 ± 0,8	0,02 ± 0,002	1255
MT	18,47 ± 0,3	14,49 ± 0,04	7,47 ± 0,08	8,58 ± 1,6	0,8
NF	> 200	> 100	38,75 ± 4,94	5,93 ± 0,5	6,5

Dados apresentados em médias ± desvio-padrão da triplicata de, pelo menos, dois ensaios independentes. IS: índice de seletividade (CC₅₀/IC₅₀) para 72 horas; MT: miltefosina; ANFB: anfotericina B; NF: nifuroxazida.

A miltefosina (CC₅₀: 7,47 ± 0,08 µM) se mostrou como mais tóxica para as células THP-1 ao final das 72 horas de incubação e, conseqüentemente, demonstrou o menor IS de 0,8. A nifuroxazida (CC₅₀: 38,75 ± 4,94 µM) demonstrou ser menos tóxica que ambos os fármacos de referência, demonstrando perfil de seletividade superior ao da miltefosina. Por fim, a anfotericina B (CC₅₀: 25,1 ± 0,8 µM), apresentou o maior índice de seletividade, o que indica que o fármaco demonstra ação mais seletiva ao parasita do que às células humanas. Vale ressaltar que todos os compostos apresentaram valores de CC₅₀ (µM) superiores aos da anfotericina B, isto é, foram menos tóxicos em relação às células.

Os derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos avaliados apresentaram valores de toxicidade às células THP-1 superiores aos respectivos valores de atividade biológica (IC₅₀) em relação à forma promastigota da *L. (L.) infantum*. De acordo com os dados demonstrados na Tabela 10, os compostos **13** e **15** apresentaram menor IS. Por outro lado, os compostos **1**, **2**, **39** e **40** apresentaram IS superior a 100, o que indica que eles apresentam atividade de inibição do crescimento mais seletiva ao parasita do que aos

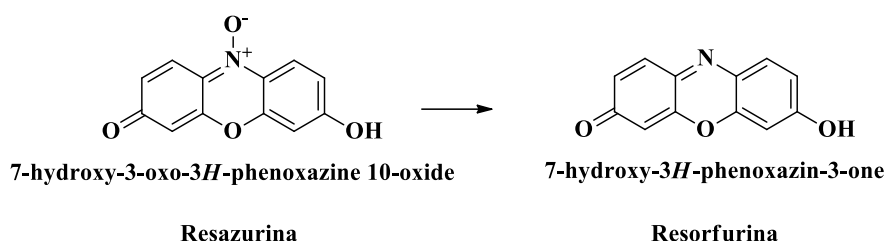
macrófagos. Tal comportamento é essencial para a avaliação da eficácia dos compostos quanto à inibição do crescimento da forma intracelular do parasita.

5.4 Determinação da citotoxicidade *in vitro* da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos em células THP-1 diferenciadas em macrófagos pelo método utilizando a resazurina

Os ensaios referentes à avaliação da citotoxicidade desses compostos para células THP-1 diferenciadas assim como para a avaliação do efeito de inibição do crescimento relativo à presença dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos em relação aos parasitas *T. brucei* e *L. (L.) major* foram avaliados utilizando o método colorimétrico por meio da presença de resazurina. Resazurina (7-Hidroxi-10 oxido-3H-fenoxazin-3-ona - *Alamar Blue*) é uma molécula azul que, quando reduzida pelas desidrogenases mitocondriais, transformam-se em resorfurina e passam a exibir coloração rosa (7-hydroxy-3H-fenoxazin-3-ona) (Figura 24). A alteração colorimétrica pode ser quantificada através da leitura da fluorescência emitida.

Assim como a metodologia que utiliza o reagente MTT, a redução da resazurina depende da atividade mitocondrial do parasita. Vale constar que parasitas como a *Leishmania* apresentam uma taxa de redução mais lenta quando comparada com outros parasitas, como *T. brucei* e *T. cruzi* e células mamárias, devido a sua menor taxa de replicação (MIKUS; STEVERDING; U, 2000). Tal diminuição da taxa de redução também ocorre porque as culturas de *Leishmania* precisam ser cultivadas em temperaturas entre 25 e 27 °C, enquanto as culturas de células mamárias e de *T. brucei*, por exemplo, podem ser cultivadas a 37 °C, temperatura que se mostra ideal para redução da resazurina.

Estudos reportados na literatura determinaram as condições necessárias para otimizar a obtenção da taxa de redução das culturas de *Leishmania*, sendo estas a incubação das culturas em atmosfera com 5% de CO₂ e por mais horas de exposição ao reagente (24 horas) (CORRAL *et al.*, 2013). Estudos na literatura sugerem, ainda, que os sais tetrazólicos (MTT) são os mais eficazes para ensaios de inibição, porém também são dependentes da espécie de parasita testada e necessitam de maior atenção à padronização referente às etapas de solubilização dos sais de formazan obtidos. Os ensaios com resazurina em comparação não apresentam a exigência de tantas etapas processuais, mas necessitam de maior tempo de incubação para a obtenção dos resultados de absorbância desejados (GINOUVES *et al.*, 2014).

Figura 24. Redução da resazurina com formação da resorfurina

Fonte: elaborado pela autora.

Dessa maneira, a citotoxicidade da quimioteca completa de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos foi determinada quanto às células monocíticas THP-1 diferenciadas em macrófagos, por meio do método de viabilidade utilizando Resazurina. Como foi determinado anteriormente, apesar de as culturas celulares com 72 horas de incubação apresentarem menor viabilidade quando comparadas às culturas com 24 e 48 horas, tal período foi escolhido porque a maioria dos ensaios na literatura que realizam estudos de triagem da suscetibilidade dos compostos quanto às formas promastigotas e ensaios de citotoxicidade são realizados após a exposição de 72 horas das culturas aos compostos estudados (COIMBRA *et al.*, 2018; DUTTA *et al.*, 2005).

Os valores de citotoxicidade (CC₅₀) para todos os compostos da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos estão disponíveis na Tabela 11. Os resultados encontrados foram similares aos obtidos previamente por metodologia colorimétrica utilizando MTT. Os compostos que apresentaram maior toxicidade (CC₅₀ menor que 25 µM) foram os compostos benzeno substituídos **17** [C₆H₄-4-C₂H₅], **19** [C₆H₄-4-Cl], **18** [C₆H₄-4-OCH₃], **30** [C₆H₄-3,4-OCH₃], **32** [C₆H₄-3-CF₃], **35** [C₆H₄-4-C₆H₄] e **36** [C₆H₄-2-OC₆H₄], representando 17% do total de compostos. Ainda assim, quando comparados com a toxicidade apresentadas pelos fármacos de referência, como miltefosina (CC₅₀ = 7,47 ± 0,08 µM) e anfotericina B (CC₅₀: 25,1 ± 0,8 µM), os compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos apresentam melhor perfil de citotoxicidade. O fármaco nifurtimox não demonstrou ser tóxico para as concentrações testadas pelo ensaio (CC₅₀ > 100 µM).

Tabela 11. Concentração citotóxica (CC₅₀) para as células THP-1 diferenciadas tratadas com compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos determinados pelo método de viabilidade com resazurina.

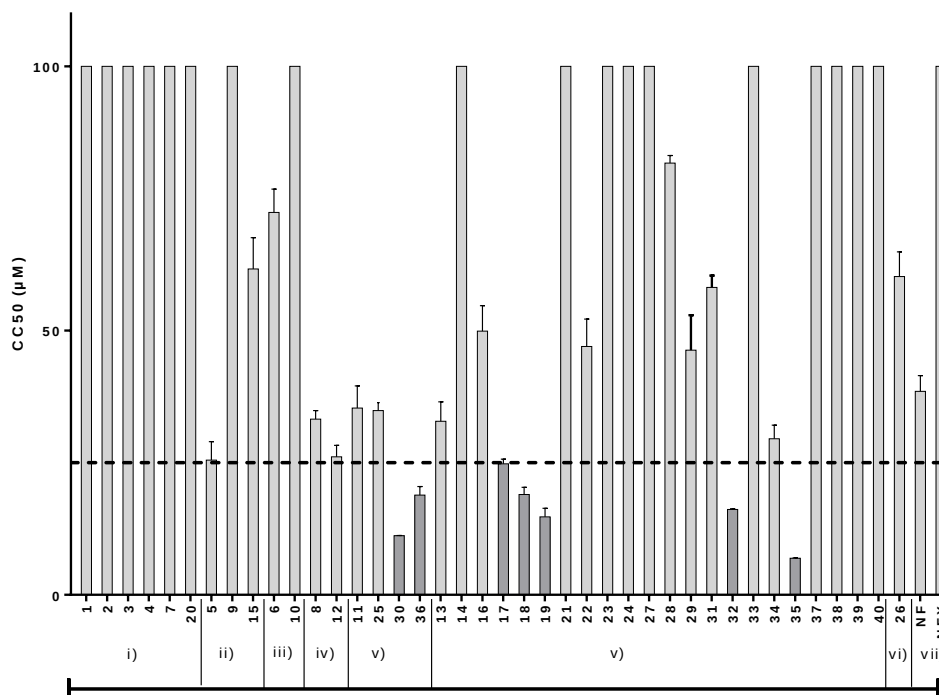
Composto	CC ₅₀ (μM) (média ± dp)	Composto	CC ₅₀ (μM) (média ± dp)
1	> 100	21	>100
2	> 100	22	46,98 ± 5,2
3	> 100	23	> 100
4	> 100	24	> 100
5	25,5 ± 3,4	25	34,87 ± 1,4
6	72,35 ± 4,4	26	60,23 ± 4,6
7	> 100	27	> 100
8	33,26 ± 1,6	28	81,69 ± 1,4
9	> 100	29	46,29 ± 1,4
10	>100	30	11,2 ± 6,6
11	35,36 ± 4,16	31	58,18 ± 0,02
12	26,11 ± 2,1	32	16,16 ± 2,2
13	32,86 ± 3,6	33	>100
14	>100	34	29,55 ± 2,5
15	61,68 ± 5,8	35	6,92 ± 0,06
16	49,9 ± 4,8	36	18,88 ± 1,59
17	24,78 ± 0,8	37	> 100
18	18,98 ± 1,3	38	> 100
19	14,77 ± 1,6	39	> 100
20	> 100	40	> 100
NF	38 ± 3,5	NFX	> 100

Dados apresentados em médias ± desvio-padrão de ensaios realizados em triplicata. NF: nifuroxazida; NFX: nifurtimox

Como critério de seleção dos compostos para os subsequentes ensaios de suscetibilidade das culturas de parasita, foram selecionadas as estruturas que apresentaram valores de CC₅₀ > 25 μM, de maneira a excluir os compostos **17**, **19**, **18**, **30**, **32**, **35** e **36**. Como critério adicional, buscou-se escolher os derivados que apresentavam substituintes químicos representativos para a quimioteca, visto que os

substituintes que compõem o conjunto de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos podem ser classificados em alquila, cicloalquila, heterocíclicos e benzenos substituídos. A Figura 25 ilustra o perfil de toxicidade de todos os compostos, assim como os que apresentaram valores de citotoxicidade abaixo de 25 μM .

Figura 25. Valores de citotoxicidade ($\text{CC}_{50} \mu\text{M}$) da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos contra as células THP-1 diferenciadas.



Dados apresentados em média e desvio-padrão de ensaios realizados em triplicata. Compostos com valores de $\text{CC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ estão representados como $\text{CC}_{50} = 100 \mu\text{M}$. Limite de toxicidade de 25 μM demarcado por linha tracejada e os compostos que apresentaram valor de CC_{50} menor que o limite estão apresentados em cinza escuro. Substituintes; i): alquila; ii): heterocíclicos; iii): cicloalquil; iv): benzeno; v): 2/3 ou 3,4-benzeno substituídos; vi): 4-benzeno substituídos; vii): naftaleno; viii): fármacos de referência
NF: nifuroxazida; NFX: nifurtimox

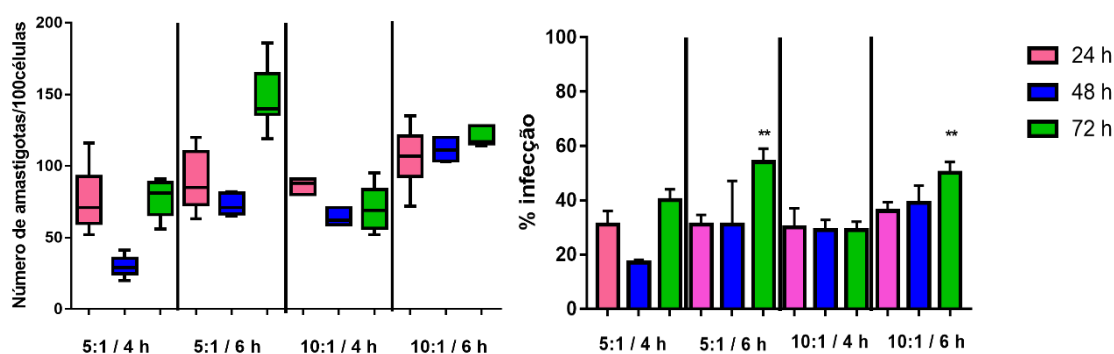
5.5 Padronização da infecção de macrófagos THP-1 por amastigotas da *L. (L.) infantum*

Várias células podem ser utilizadas para *screening* de candidatos a fármacos em modelos amastigotas/macrófagos de infecção para *Leishmania*. Por exemplo: células humanas, U937, HL-60; as células de linhagem monocíticas, THP-1; células de hospedeiros animais, como macrófagos derivados de medula, e linhagens murinas monocíticas, J774 e RAW264,7 (GEBRE-HIWOT *et al.*, 1992; JAIN *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2007; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

Antes de determinar a sensibilidade da forma amastigota diante dos compostos testados, foi realizada a padronização das condições do modelo de infecção dos promastigotas de *L. (L.) infantum* em macrófagos THP-1 diferenciados. Os ensaios foram realizados em microplaca de 24 poços e determinados pela contagem dos macrófagos infectados em microscopia ótica (1.000x) através da fixação em lamínulas.

As condições avaliadas foram a proporção de parasitas por macrófagos (10:1 ou 5:1 promastigotas por célula) em diferentes tempos de incubação para infecção (6 e 4 horas). A porcentagem de infecção dos amastigotas representada pela porcentagem de células infectadas em relação ao número total de células e o parasitismo representado pelo número de amastigotas a cada 100 macrófagos foram calculados a partir da contagem de 900 macrófagos por condição testada, durante os períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação (Figura 26).

Figura 26. Número de amastigotas por 100 células e porcentagem de infecção dos macrófagos infectados com promastigotas de *L. (L.) infantum*.



Macrófagos infectados com 5 e 10:1 parasitas/macrófagos incubados por 24 (rosa), 48 (azul) e 72 (verde) horas a 37 °C com 5% de CO₂. Resultado da média e desvio-padrão de dois experimentos independentes, analisados pelo teste *one-way* ANOVA e teste de Tukey. $p < 0,01$ (**)

Foi observado nas proporções de 5:1 e 10:1 com 6 horas de incubação que a porcentagem de macrófagos infectados foi igual ou superior a 50% em relação ao total de células infectadas (Figura 26 – porcentagem de infecção). Para a condição de 6 horas de incubação, também foi observado que, para ambas as proporções (10:1 e 5:1), não houve diferença significativa entre a porcentagem de macrófagos infectados após 48 horas de cultura, de forma que a porcentagem de infecção determinadas para as proporções de 10:1 e 5:1 foram de 40% e 31%, respectivamente.

Como os ensaios prévios de viabilidade das células THP-1 diferenciadas determinaram que, após 48 horas de incubação, houve um significativo aumento na quantidade de células viáveis disponíveis, os ensaios de padronização da infecção com a forma amastigota foram considerados até o período de 48 horas de incubação, portanto. Os ensaios posteriores de determinação da diminuição da carga parasitária de macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum* em resposta à exposição dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos foram, então, realizados seguindo protocolo previamente reportado (SILVA *et al.*, 2016).

Jain e colaboradores, ao padronizar diferentes modelos de infecção e resgate de promastigotas de *Leishmania* para células THP-1, observou que a proporção de parasitas/macrófagos 10:1 apresentaram rendimento ótimo para infecção (JAIN *et al.*, 2012). Observaram, também, que a quantidade de macrófagos infectados se dá em maior proporção quando o período de incubação para internalização das formas promastigotas é de 6 horas. Tal fenômeno ocorre, provavelmente, por proporcionar maior tempo de exposição para a fagocitose pelos macrófagos.

Neste estudo, o mesmo foi observado em ambas as proporções de parasita: macrófago testadas durante 6 horas de incubação. Apesar disso, o comportamento mais linear de infecção (e menor desvio padrão) foi observado para o parâmetro 10:1 / 6 horas. Tal condição foi a escolhida como padrão para os ensaios de avaliação do potencial de inibição dos compostos estudados contra a forma amastigota do parasita.

5.6 Determinação do potencial anti-*Leishmania* dos compostos nitro-heterocíclicos contra a forma amastigota da *L. (L.) infantum*

Macrófagos de células THP-1 diferenciados foram infectados com promastigotas de *L. (L.) infantum* no início da fase estacionária, em culturas de 4 dias, na proporção de 10 parasitas/células (10:1). Avaliou-se a diminuição da carga parasitária após a exposição das culturas aos compostos com 24 e 48 horas. Culturas de macrófagos infectados não tratados, isto é, não expostos aos compostos, foram consideradas como controle positivo para os ensaios.

A porcentagem de infecção foi considerada por meio da porcentagem de células infectadas em relação à quantidade total de células contadas para cada condição do ensaio. Além disso, os resultados também foram expressos em relação ao parasitismo, representado pelo número de amastigotas/100 células. Foram realizados testes

estatísticos, *one-way* Anova e teste Tukey, a fim de se observar se cada condição de tratamento apresentou diferença estatística em relação ao controle positivo.

Anfotericina B, miltefosina e nifuroxazida foram consideradas como fármacos de referência para os nitroderivados. Os compostos selecionados para o ensaio de inibição do crescimento das formas amastigotas intracelulares foram os compostos **40** [$\text{C}_6\text{H}_4\text{-4-OC}_7\text{H}_{15}$] análogo 4-benzeno substituído, que apresentou alta atividade contra as formas promastigotas; **13** [$\text{C}_6\text{H}_4\text{-4-CH}_3$] análogo 4-benzeno substituído, que demonstrou atividade baixa contra os promastigotas; **15** [5-4 $\text{CH}_3\text{-1,2,3-tiadiazol}$], análogo heterocíclico de atividade moderada e **2** [$\text{-CH}_2\text{CN}$], análogo alquila de atividade moderada.

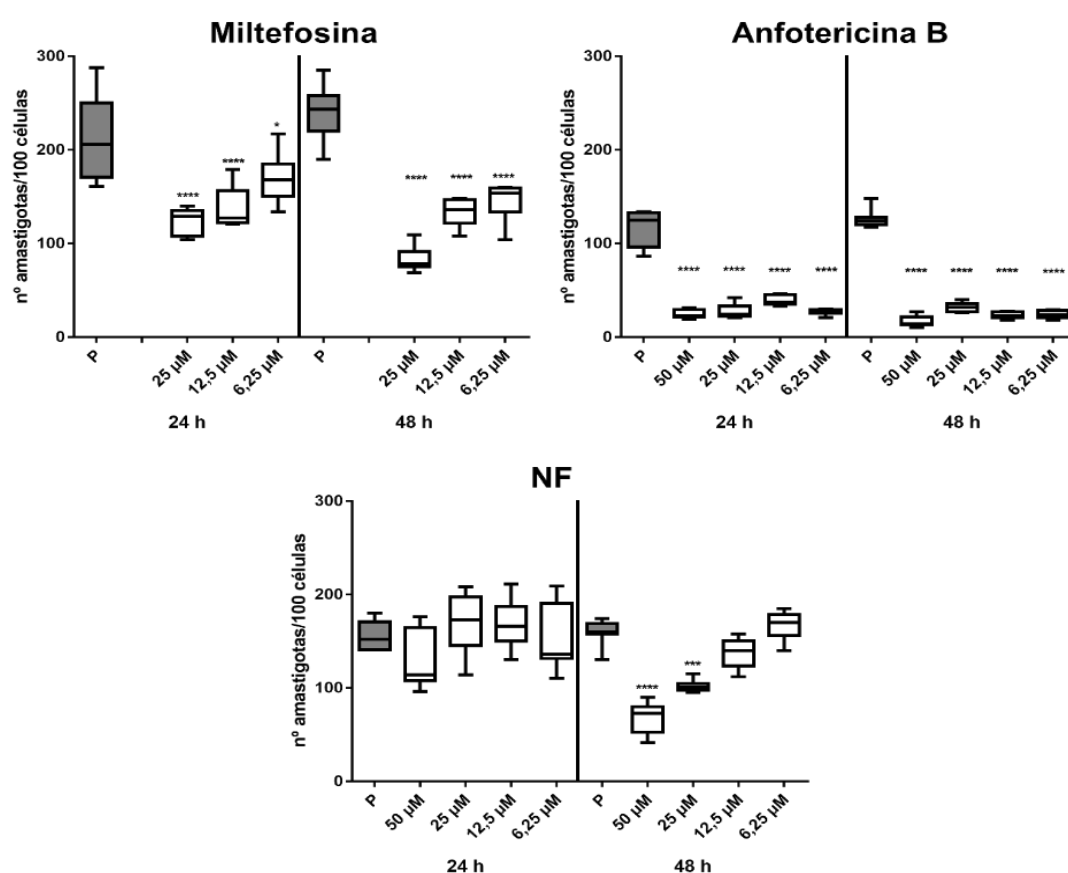
A inibição do crescimento das formas amastigotas intracelulares nas células THP-1 diferenciadas foram quantificadas de acordo com a sua exposição a diferentes concentrações (50; 25; 12,5 e 6,25 μM) dos compostos e fármacos de referência. A faixa de concentração utilizada foi escolhida de modo a abranger a concentração tóxica mínima (CC_{50}) de cada composto testado e a diminuição da carga parasitária nas células foi avaliada após 24 e 48 horas de incubação das células. Devido à alta toxicidade da miltefosina até 48 horas de incubação ($\text{CC}_{50} = 14,49 \pm 0,04 \mu\text{M}$), a influência do fármaco não foi avaliada na concentração de 50 μM .

Anfotericina B, como esperado, mostrou-se o fármaco de maior eficácia quanto à diminuição da carga parasitária (Figura 27). Em relação ao controle positivo, todas as concentrações testadas foram capazes de diminuir a infecção de maneira significativa ($P < 0,0001$), inclusive aparentando efeito em relação à diminuição da infecção a partir de 24 horas de incubação (Tabela 12). A maior concentração testada (50 μM) foi capaz de diminuir a infecção de 44 células infectadas/ 100 macrófagos para 14 células infectadas/100 macrófagos após 48 horas de incubação. Apesar de os resultados serem superiores aos compostos nitro-heterocíclicos, a alta toxicidade da anfotericina B abre possibilidade para pesquisa e desenvolvimento de melhores alternativas terapêuticas. Alguns compostos, por exemplo, apresentaram eficiência similar à miltefosina, fármaco também de referência para o tratamento da *Leishmania*. A miltefosina, por sua vez, foi capaz de diminuir a porcentagem de infecção total para 39% de um total de 60% de células infectadas após 48 horas de incubação de células THP-1 expostas à 25 μM do composto em análise.

Apesar de apresentar moderada atividade contra a forma promastigota do parasita, a nifuroxazida (NF) foi utilizada nesse ensaio como parâmetro de comparação de potência

inibitória com seus análogos. Dadas as concentrações testadas, NF só passa a apresentar diminuição da carga parasitária a partir de 48 horas de exposição às células infectadas, em um comportamento dose-resposta (Figura 27). Ao tempo final de incubação, a nifuroxazida foi capaz de diminuir a infecção para 31% de um total de 51% de células infectadas. É notável que esta classe de compostos apresenta potencial quanto à ação anti-amastigota e menor toxicidade em relação as células THP-1 do que os fármacos de referência em questão.

Figura 27. Parasitismo (n. de amastigotas/100 células) em resposta à anfotericina B, miltefosina e nifuroxazida durante 24 e 48 horas.



P: células infectadas não tratadas (cinza) (controle positivo). Teste *one-way* ANOVA e teste Tukey calculados entre o controle positivo e cada condição avaliada (50 µM – 6,25 µM). $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Tabela 12. Avaliação da porcentagem de infecção dos macrófagos infectados após tratamento com anfotericina B, miltefosina e nifuroxazida.

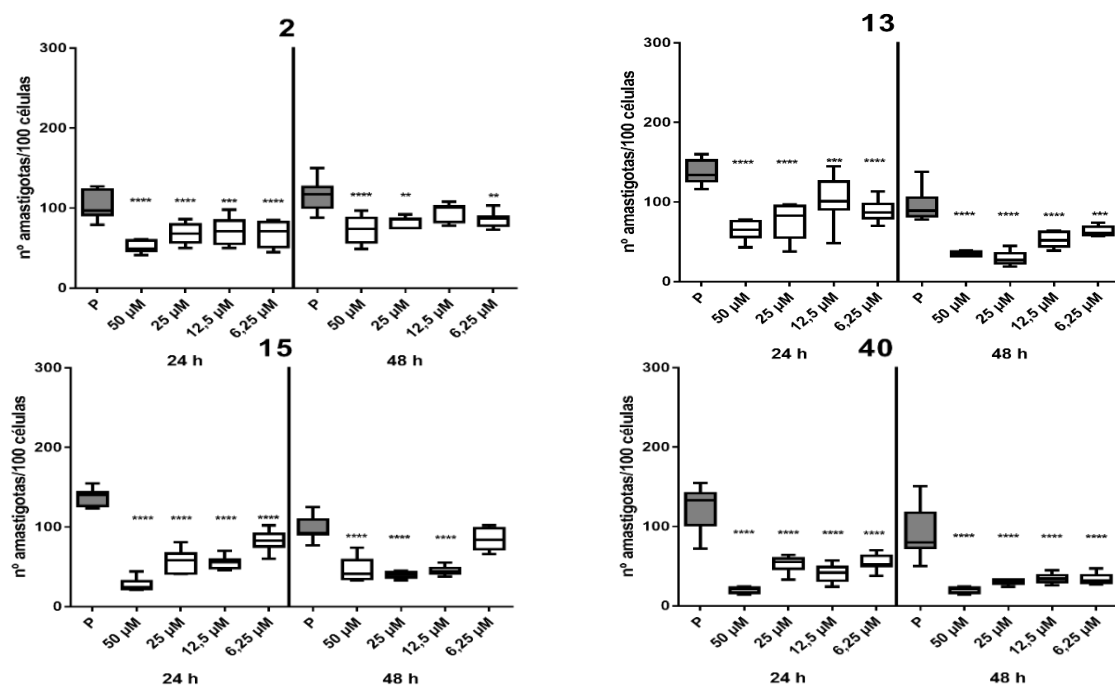
μM	Anfotericina B				Miltefosina				Nifuroxazida			
	24 horas		48 horas		24 horas		48 horas		24 horas		48 horas	
	%Ø	%inf	%Ø	%inf	%Ø	%inf	%Ø	%inf	%Ø	%inf	%Ø	%inf
50	71	21	86	14	-	-	-	-	58	42	69	31
25	77	23	74	26	61	39	61	39	48	52	61	39
12,5	72	28	78	22	33	47	53	47	49	51	52	48
6,25	78	22	80	20	49	51	52	48	54	46	49	51
P	56	44	60	40	67	43	40	60	50	50	49	51

%Ø: porcentagem de macrófagos não infectados; %inf: porcentagem de macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum* e P: macrófagos THP-1 infectados não tratados (controle positivo).

O desempenho dos compostos selecionados (**2**; **13**; **15** e **40**) em relação à diminuição do parasitismo e a porcentagem da infecção estão apresentados na Figura 28 e Tabela 13. O mesmo padrão dose-resposta observado para nifuroxazida foi observado para os compostos testados, principalmente para compostos que apresentaram menor atividade contra a forma promastigota (**13** e **15**). Diferente da NF, todos os análogos testados apresentaram efeito na carga parasitária a partir de 24 horas de incubação.

A concentração de 50 μM foi capaz de reduzir a carga parasitária de maneira estatisticamente relevante ($p < 0,001$) em todos os tempos de incubação. O composto **40** após 48 horas de exposição às células demonstrou, para um total de 41% de células infectadas, a diminuição da porcentagem de infecção para 16%. O composto **13**, em um total de 43% de macrófagos infectados, foi capaz de diminuir as células infectadas para 26% de células. O composto **15**, por sua vez, a partir de um total de 43% de macrófagos infectados, foi capaz de diminuir a carga parasitária para 28% células infectadas. Por fim, o composto **2** de um total de 57% de macrófagos infectados diminuiu para 28% células infectadas.

Figura 28. Parasitismo (n. de amastigota/100 células) em resposta aos compostos **2**, **13**, **15** e **40** durante 24 e 48 horas de incubação.



P: células infectadas não tratadas (cinza) (controle positivo). Teste *one-way* ANOVA e teste Tukey calculados entre o controle positivo e cada condição avaliada (50 μM – 6,25 μM). $p < 0,0001$ (****)

Tabela 13. Porcentagem de infecção dos macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum* após o tratamento com diferentes concentrações dos compostos **2**, **13**, **15** e **40** durante 24 e 48 horas de incubação.

Concentração μM	Porcentagem de Infecção							
	24 horas				48 horas			
	%Ø	%inf	%Ø	%inf	%Ø	%inf	%Ø	%inf
Composto 2					Composto 13			
50	67	33	68	32	69	31	74	26
25	65	35	64	36	71	29	78	22
12,5	63	37	70	30	60	40	70	30
6,25	67	33	66	34	62	38	69	31
P	43	57	43	57	47	53	57	43
Composto 15					Composto 40			
50	80	20	72	28	85	15	84	16
25	71	29	75	25	72	28	78	22
12,5	70	30	71	31	76	24	75	25
6,25	65	35	58	42	68	32	76	24
P	47	53	57	43	53	47	64	41

%Ø: porcentagem de macrófagos não infectados; %inf: porcentagem de macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum* e P: macrófagos THP-1 infectados não tratados (controle positivo).

O potencial inibitório das formas amastigotas apresentado pelo composto **40** é comparável com a anfotericina B para as mesmas condições de ensaio. Notavelmente, quanto à toxicidade, o composto **40** passa a ser 5 vezes menos tóxicos do que o fármaco de referência para macrófagos THP-1 diferenciados após 48 horas de incubação. Em relação à quimioteca, o composto **40** [$\text{-C}_6\text{H}_4\text{-4-OC}_7\text{H}_{15}$] também se mostrou o mais ativo contra a forma promastigota da *L. (L.) infantum*, o que indica que o substituinte 4-pentoxi -benzeno garante alto potencial de inibição de ambas as formas, promastigota e amastigota da *L. (L.) infantum*.

Como as condições do ensaio *in vitro* são influenciadas pelas propriedades farmacocinéticas dos compostos, identificou-se que aqueles que possuíam substituintes mais lipofílicos foram mais eficazes no que se refere à diminuição da carga parasitária das células infectadas. No composto **2** [$\text{-CH}_2\text{CN}$], observa-se que o substituinte ciano mostrou-se ser mais eficaz contra a forma promastigota do que os compostos **13** [$\text{C}_6\text{H}_4\text{-4-CH}_3$] e **15** [5-4 CH_3 -1,2,3-tiadiazol], mas a maior lipofilicidade dos substituintes mais volumosos garante maior potência quanto à diminuição da carga parasitária em células THP-1 infectadas com a forma amastigota de *L. (L.) infantum*.

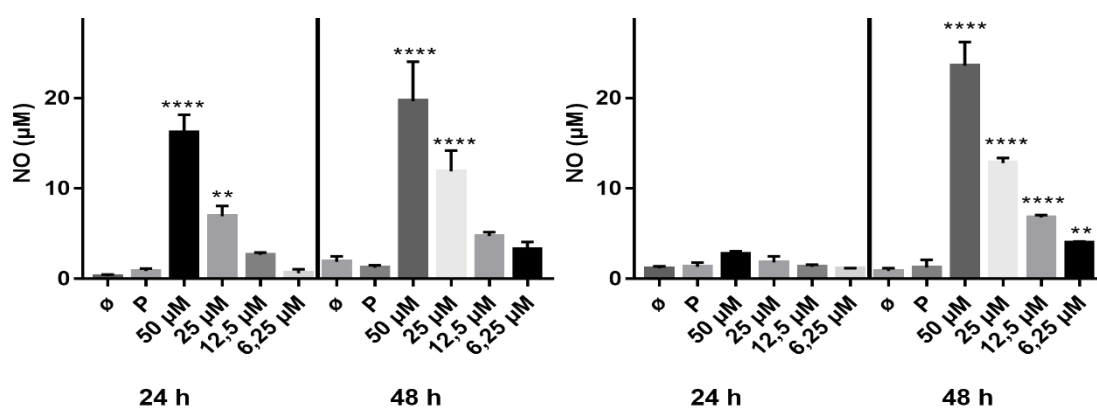
5.7 Avaliação da dosagem de óxido nítrico (NO) em células de macrófagos THP-1 diferenciados infectadas com amastigotas de *L. (L.) infantum* expostas aos compostos nitro-heterocíclicos

Produção de NO e outras espécies reativas de nitrogênio e oxigênio estão associadas ao processo de controle da infecção a partir da ativação dos macrófagos, sinalizando a erradicação do parasita dentro dos fagolisossomos. Os parasitas da espécie *Leishmania* possuem mecanismos de escape da resposta imune, permitindo a sobrevivência do parasita dentro dos macrófagos, células que participam como agentes efetores na imunidade inata do hospedeiro.

Paralelamente aos ensaios de diminuição da carga parasitária, foi realizada a quantificação de óxido nítrico. A quantificação da produção de NO foi realizada de forma indireta pela reação colorimétrica de Griess, que consiste na detecção de nitrito (NO_2^-) como resultado da oxidação do óxido nítrico no sobrenadante da cultura de células. Tais amostras foram coletadas proveniente das placas de infecção tratadas com os compostos testados e fármacos de referência após 24 e 48 horas de incubação em 37 °C com 5% de CO_2 .

Para todos os compostos testados, assim como para os fármacos de referência, somente os compostos **2** e **15** apresentaram diferença na produção de NO. A Figura 29 mostra os resultados dos ensaios de detecção de NO para os tempos 24 e 48 horas para esses compostos. É perceptível que a produção de NO se apresenta de maneira dose-resposta para ambos, com destaque para 48 horas, quando houve aumento significativo na quantidade de NO formada. Foram considerados como controle positivo e negativo células infectadas não tratadas e células não infectadas não tratadas, respectivamente. Em todas as situações, as células correspondentes ao controle positivo e negativo não apresentaram produção significativa de NO pelo método de Griess.

Figura 29. Produção de NO para dos compostos **2** e **15** durante 24 e 48 horas de tratamento em macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum*.



0: células viáveis não infectadas; P: macrófagos infectados não tratados (controle positivo) correspondentes aos tempos 24 e 48 horas. Teste estatístico *one-way* ANOVA e Teste de Tukey entre o controle positivo e cada condição avaliada (50 µM – 6,25 µM). $p < 0,001$ (****) e $p < 0,01$ (**)

Os resultados obtidos sugerem que os compostos **2**, **13**, **15** e **40** apresentam eficácia tanto contra a forma promastigota quanto às formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*. Os resultados apresentados de produção de NO sugerem que a diversidade dos substituintes da quimioteca podem conferir diferentes mecanismos de ação dentro das células em resposta à infecção. O perfil de produção de NO apresentado pelos compostos **2** [-CH₂CN] e **15** [5-4 CH₃-1,2,3-tiadiazol] indicam que eles parecem expressar uma resposta dos macrófagos infectados que envolve a sinalização de processos envolvidos com a apoptose celular, diferente dos outros compostos, em relação à sensibilidade do método.

Mendonça *et. al.* (2019) e Silva *et. al.* (2016) demonstraram que os compostos **8** [C₆H₄], **13** [C₆H₄-4-CH₃], **19** [C₆H₄-4-Cl], **25** [C₆H₄-4-NO₂] e **27** [C₆H₄-4-C₄H₉], análogos 4-benzeno substituídos da quimioteca, demonstraram efeitos indutores de

processos similares à sinalização da apoptose celular contra a forma promastigota de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* (MENDONÇA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2016). Ambos os trabalhos demonstraram que, em altas doses, os compostos **8**, **27** e **19** apresentavam indicadores de apoptose celular em maior concentração que a anfotericina B, através da expressão da externalização de fosfatidilserina determinado por citometria de fluxo. Isso sugere que o mecanismo de ação da classe de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos contra a atividade anti-*Leishmania* de ambas as formas morfológicas do parasita envolvem mecanismos que envolvem a sinalização de processos de apoptose celular.

Os resultados encontrados parecem, assim, corroborar com a hipótese de que os compostos nitro-heterocíclicos agem como pró-fármacos e estão envolvidos no processo de estresse oxidativo e sinalização de mecanismo similar à apoptose dos parasitas tripanossomatídeos, através da produção de espécies reativas metabolizadas por enzimas da classe das nitrorredutases (BOT *et al.*, 2013; FIELD *et al.*, 2017; VOAK *et al.*, 2013, 2014; WYLLIE *et al.*, 2016a). Os resultados sugerem que a sua ação anti-*Leishmania* está envolvida diretamente com a inibição do mecanismo de escape do estresse oxidativo do parasita ou como indutores de apoptose.

5.8 Avaliação das alterações morfológicas provocadas pelos compostos nitro-heterocíclicos em macrófagos THP-1 infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum*

A fim de observar os efeitos dos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos durante o tratamento nos macrófagos THP-1 infectados, quanto às alterações das ultraestruturas das formas amastigotas intracelulares, foi utilizada a microscopia eletrônica de transmissão (MET). De acordo com protocolo estipulado por Sesso (*et al.*, 2017) e Brito (MARIANE PEREIRA BRITO, 2019), a concentração ideal de células necessária para fixação em glutaraldeído 1% (resina fixadora para o MET) é de 5×10^5 células. Antes da incorporação, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer coradas com *Trypan Blue*.

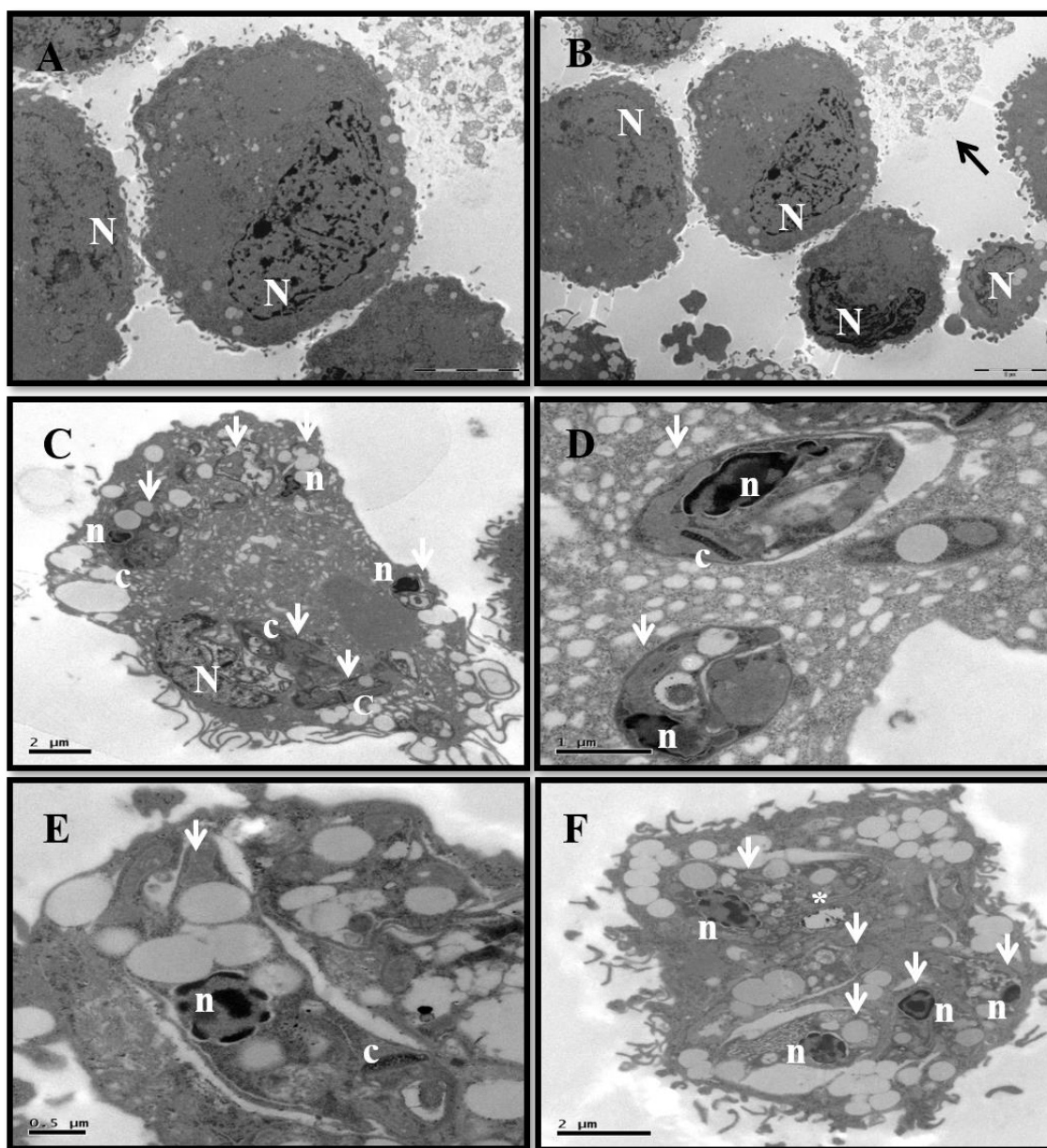
Para o ensaio foram considerados como controle negativo e positivo os macrófagos THP-1 diferenciados viáveis não infectados e infectados com amastigotas após 48 horas de incubação, respectivamente. Na figura 30, estão representadas as amostras referentes aos controles obtidos por meio do MET, em que é possível observar as estruturas clássicas das células macrofágicas, como o núcleo (Figura 30 A e B - N) em vários estados de

condensação da cromatina; membrana citoplasmática íntegra e a presença de alguns vacúolos de gordura no citoplasma. Também é possível identificar, em ambos os controles, algumas células de macrófagos não viáveis, em que há ruptura da membrana celular e destruição citoplasmática (Figura 30 B - seta preta).

As células infectadas que não foram submetidas a nenhum tratamento apresentaram aparência normal, tendo a célula do hospedeiro demonstrado núcleo com cromatina descondensada (Figura 30 C - N). Pode-se identificar as formas amastigotas intracelulares presentes de maneira individual ou em grupo inserido nos vacúolos parasitóforos (Figura 30 C-F) e, morfológicamente, as formas amastigotas apresentaram formato arredondado (Figura 30 F), isto é, sem alteração da forma, e algumas organelas puderam ser identificadas como o núcleo (Figura 30 C-F - n) e o cinetoplasto (Figura 30 C-F - c).

Alguns amastigotas também apresentaram forma fusiforme, indicando a presença de promastigotas internalizados ainda em processo de diferenciação (Figura 30 E). As culturas de macrófagos infectados apresentam os amastigotas em sua maioria intactos, inseridos dentro do vacúolo parasitóforo, mas, em algumas células, é possível identificar a condensação da cromatina nuclear do parasita (Figura 30 D - n) e amastigotas em processo de destruição (Figura 30 F - *) dentro do vacúolo, o que sugere o início do processo de resposta celular à infecção.

Figura 30. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos THP-1 infectados com *Leishmania (L.) infantum*.



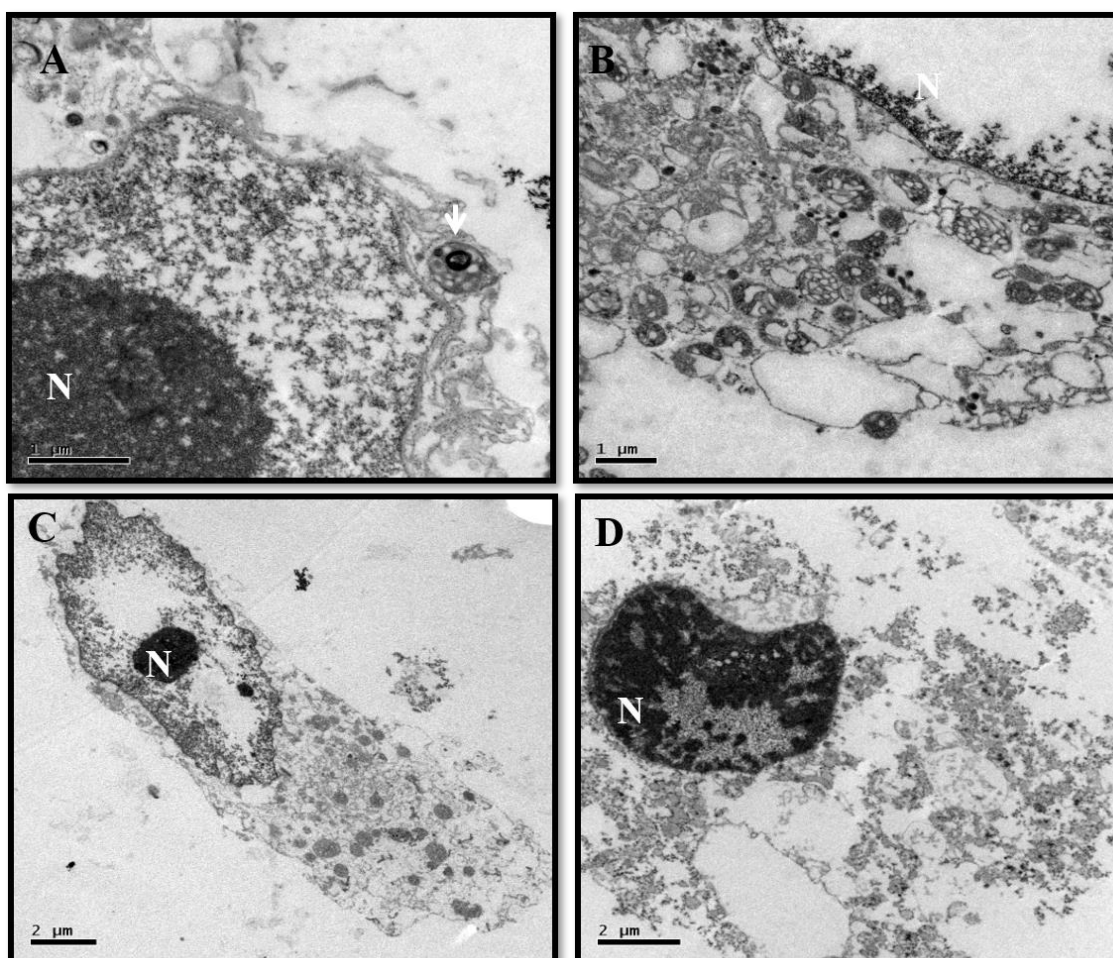
A-B: células não infectadas; C-F: células infectadas com amastigota de *L. (L.) infantum* incubados por 48 horas a 37 °C com 5% de CO₂. Seta preta: macrófago não viável, ruptura da membrana plasmática; N: núcleo do macrófago; Seta branca: amastigota; n: núcleo do amastigota; c: cinetoplasto; *: amastigota afetado. Tamanhos: A-6,2k; B- 2,55k; C-8k; D-25k, E-30k e F-12k.

Devido à alta citotoxicidade apresentada pelos fármacos de referência, as concentrações testadas de anfotericina B (CC₅₀: 35,55 ± 1 µM) e miltefosina (CC₅₀: 14,49 ± 0,04 µM) foram escolhidas respeitando-se os valores de CC₅₀ previamente obtidos para 48 horas de incubação a 37 °C com 5% de CO₂. Após o tratamento com 12,5 µM de miltefosina (Figura 31 A-B) e 25 µM de anfotericina B (Figura 31 C-D), é possível confirmar a alta citotoxicidade dos fármacos contra as células, observando a presença de

edemas no citoplasma (Figura 31 A-B) e alta condensação da cromatina nuclear apresentada pelos macrófagos (Figura 31 - N).

Após o período de 48 horas de incubação das células submetidas ao tratamento com miltefosina e anfotericina B, foi observado, também, a presença em menor quantidade de amastigotas intracelulares íntegros encontrados dentro dos vacúolos parasitóforos (Figura 31 A – seta branca), confirmando a eficácia dos fármacos de referência quanto à eliminação dos parasitas intracelulares determinada pelos ensaios de parasitismo. Apesar disso, as células submetidas às concentrações dos fármacos de referência apresentam, de alguma maneira, estarem submetidas a grande estresse, tanto quando comparadas com células infectadas e não infectadas viáveis quanto com as células submetidas a maiores concentrações dos compostos.

Figura 31. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos THP-1 diferenciados infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com miltefosina e anfotericina B.



A-B: células tratadas com 12,5 µM de miltefosina; C-D: células tratadas com 25 µM de anfotericina B. N: núcleo do macrófago e Seta branca: amastigota. Tamanhos: A-25k; B- 15k; C-8k, D-10k.

Após o tratamento com os compostos sob análise, de maneira geral, observa-se que os macrófagos infectados com amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* e expostos a 50 μ M dos compostos evidenciaram algumas células em que o núcleo (Figura 32 - N) apresenta a cromatina em condições similares aos controles negativos e positivos (Figura 32 C). Também foram observadas células não infectadas nas culturas após os tratamentos, confirmando a redução da infecção observada pelos resultados previamente obtidos em relação à diminuição do parasitismo.

Quanto às alterações dos aspectos ultraestruturais apresentadas pelos macrófagos THP-1 tratados com os compostos nitro-heterocíclicos, os compostos **2** [-CH₂CN] (Figura 32 A-B) e **15** [5-4 CH₃-1,2,3-tiadiazol] (Figura 32 C-D) apresentaram perfil de resposta celular similar. As células apresentaram núcleo celular com a cromatina condensada, indicando estarem submetidos a processos de estresse oxidativo indicativos de apoptose.

Adicionalmente, é possível observar a presença de lisossomas (Figura 32 C – seta preta tracejada) e uma maior atividade das mitocôndrias (Figura 32 C-D – seta preta) no citoplasma celular. Os amastigotas intracelulares encontrados no interior do vacúolo se apresentaram em diferentes estágios de degeneração, além de vestígios estruturais no interior dos vacúolos (Figura 32 B). Foram encontrados também formas amastigotas com alta condensação da cromatina nuclear (Figura 32 A – seta branca), indicando possível processo de apoptose.

Tais resultados corroboram com os achados dos ensaios de detecção da produção de óxido nítrico (NO) das células THP-1 apresentado pelos compostos **2** e **15**, indicando que eles interferem no mecanismo de resposta celular que envolve a sinalização de apoptose celular mediada por NO.

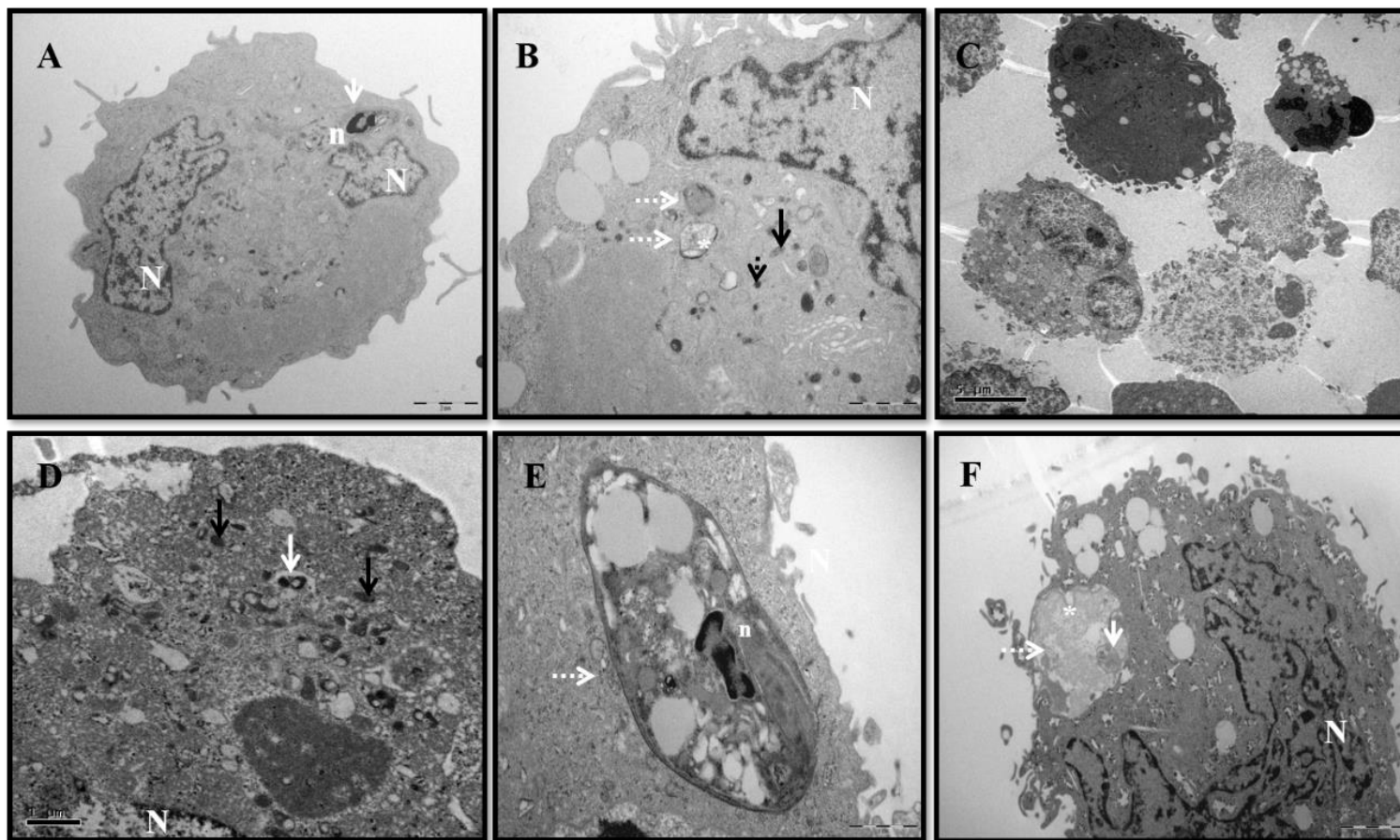
O composto **40** [-C₆H₄-4-OC₇H₁₅], que demonstrou ser, dentre os compostos analisados, o mais eficiente quanto à diminuição do parasitismo dos macrófagos infectados determinados por contagem demonstrou, também, o menor efeito tóxico perante as células (Figura 32 E-F). Por apresentar o substituinte químico de caráter mais lipofílico que os demais compostos, provavelmente é mais facilmente absorvido pelas membranas celulares e, assim, atinge os amastigotas dentro dos vacúolos parasitóforos (Figura 32 F – seta branca tracejada). Os achados apresentados pelo MET refletiram tal propriedade, os macrófagos encontrados demonstraram maior integridade do citoplasma, organelas e núcleo do que quando comparados às células tratadas com os fármacos de referência.

Após exposição de 50 μ M do composto **40**, foi possível observar que as formas amastigotas apresentaram perda de forma e intensa vacuolização do citoplasma (Figura 32 E), os parasitas encontrados dentro dos vacúolos parasitóforos foram facilmente visualizados em vários estados de degeneração (Figura 32 E-F), além de apresentarem núcleos altamente condensados (Figura 32 E - n), sugerindo que, após 48 horas de tratamento, algumas formas amastigotas ainda se encontram em processo de morte celular programada semelhante à apoptose, mas sem estresse para a célula hospedeira. Após tal período, observa-se, também, a destruição total dos parasitas dentro do vacúolo (Figura 32 F – seta tracejada) e vestígios estruturais (Figura 32 F- seta branca) podem ser observados.

De maneira geral, os compostos nitro-heterocíclicos parecem levar à degradação das formas, por meio da recuperação dos mecanismos de resposta celular à infecção dos macrófagos. A atividade ainda parece conduzir a um processo de morte celular programada semelhante a apoptose nos parasitas intracelulares, porém os compostos **2** e **15** demonstraram induzir tal resposta apoptótica para as células hospedeiras também. Apesar disso, as células submetidas às maiores doses dos compostos se mostraram menos afetadas do que quando em presença dos fármacos miltefosina e anfotericina B

Apesar de os compostos derivados do 5-nitro-2-furfurilidênicos ainda não possuírem mecanismo de ação totalmente esclarecido, eles apresentam potencial contra várias espécies de parasitas da classe *Kinetoplastidea*, o que sugere que eles são potenciais candidatos a fármaco com ação de amplo espectro.

Figura 32. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos THP-1 diferenciados infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos **2**, **15** e **40**.



A-B: células tratadas com 50 μ M do composto **2**; C-D: células tratadas com 50 μ M do composto **15**; E-F: células tratadas com 50 μ M do composto **40**. Seta preta: mitocôndria dos macrófagos; seta preta tracejada: lisossomos; N: núcleo do macrófago; seta branca: amastigota; seta branca tracejada: vacúolo parasitóforo; n: núcleo do amastigota e *: amastigota afetado. Tamanhos: A-6,2 k; B- 15 k; C-4 k, D-15 k; E-24 k e F-6,2 k..

5.9 Avaliação atividade dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos contra a formas promastigotas e amastigota de *L. (L.) major*

A capacidade inibitória dos compostos foi avaliada quanto à inibição do crescimento de ambas as formas morfológicas intracelular e extracelular de *L. (L.) major*. Na tabela 14, estão dispostos os valores de inibição de crescimento para as formas promastigotas, medidos através do método de redução da Resazurina, assim como os valores transformados em potência de log ($-\log IC_{50}$) pIC_{50} em molar (M).

A figura 33 mostra o conjunto de compostos classificados quanto à potência da atividade biológica: alta (pIC_{50} entre 6,47 e 7,06), moderada (pIC_{50} entre 6,36 e 5,26) e baixa (pIC_{50} entre 4,97 e 4,87). As curvas de dose-resposta bem como os valores de porcentagem de inibição estão disponíveis no Anexo 6 (ANEXO 6 - Curva dose-resposta correspondentes à inibição de crescimento parasitário para as formas promastigotas de *L. (L.) major*).

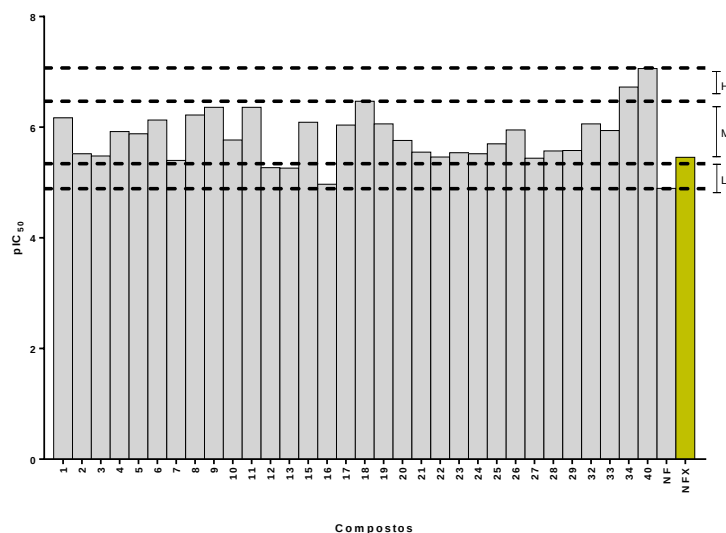
O nifurtimox foi utilizado como fármaco de referência, apresentando valores próximos aos encontrados por estudos anteriores, que utilizaram a mesma cepa de *L. (L.) major* (MEREDITH *et al.*, 2017; VOAK *et al.*, 2013, 2014). A nifuroxazida foi avaliada como composto protótipo para os derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos, demonstrando, contra a forma promastigotas da espécie *L. (L.) major*, baixa atividade ($IC_{50} = 12,79 \pm 1,04 \mu M$). Todos os compostos avaliados apresentaram maior atividade que a NF, indicando que todas as modificações estruturais realizadas se mostram mais eficiente que o substituinte 4-fenol. Os compostos **7**, **13**, **12**, **16** e **27** se mostraram menos potentes em relação ao fármaco de referência, enquanto os demais compostos avaliados se mostraram mais ativos. O derivado 4-pentoxi benzeno (**40**) se mostrou o mais ativo ($IC_{50} = 0,087 \pm 0,001 \mu M$) dentre os compostos avaliados, comportando-se como 40 vezes mais potente que o fármaco de referência.

Tabela 14. Atividade anti-*Leishmania* dos compostos nitro-heterocíclicos, composto protótipo e fármaco de referência contra a forma promastigota da *L. (L) major*.

Composto	IC ₅₀ (μM) (média ± dp)	pIC ₅₀	Composto	IC ₅₀ (μM) (média ± dp)	pIC ₅₀
1	0.67 ± 0,007	6.17	18	0.34 ± 0,029	6.47
2	3,03 ± 0, 05	5.52	19	0.88 ± 0,13	6.06
3	3.27 ± 0,11	5.48	20	1,74 ± 0,089	5.76
4	1.21 ± 0,01	5.92	21	2.81 ± 0,009	5.55
5	1.31 ± 0,11	5.88	22	3.44 ± 0,12	5.46
6	0.74 ± 0,0008	6.13	23	2.88 ± 0,014	5.54
7	3.98 ± 0,04	5.40	24	3.01 ± 0,02	5.52
8	0,6 ± 0,02	6.22	25	1.98 ± 0,007	5.70
9	0.44 ± 0,025	6.36	26	1.12 ± 0,009	5.95
10	1,71 ± 0,09	5.77	27	3.64 ± 0,003	5.44
11	0.44 ± 0,025	6.36	28	2,71 ± 0,12	5.57
12	5.39 ± 0,18	5.27	29	2.65 ± 0,6	5.58
13	5.45 ± 0,07	5.26	32	0.87 ± 0,02	6.061
14	> 100	-	33	1,14 ± 0,036	5.940
15	0,81 ± 0,03	6.09	34	0,188 ± 0,008	6.725
16	10.70 ± 0,95	4.97	40	0,087 ± 0,001	7.06
17	0.91 ± 0,13	6.04			
NFX	3,5 ± 0,09	5,45	NF	12,79 ± 1,04	4,89

Os valores de atividade biológica IC₅₀ (μM) estão apresentados em média e desvio-padrão de ensaios realizados em triplicata. Os valores de atividade biológica em potência de log (M) estão representados por pIC₅₀. NF: nifuroxazida. e NFX: nifurtimox.

Figura 33. Atividade anti-*Leshmania* convertida em pIC_{50} ($-\log IC_{50}$) do conjunto de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos, nifuroxazida (NF) e nifurtimox (NFX).



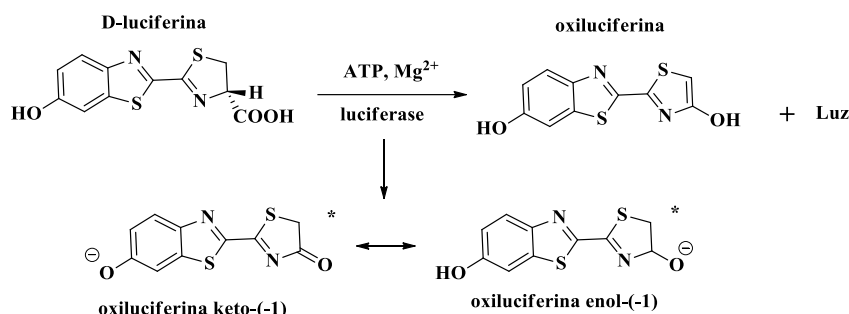
H: compostos com alta atividade contra a forma promastigota; M: compostos com atividade moderada, L: compostos com baixa atividade.

Composto **14** não apresentou valores de atividade biológica para as condições do ensaio ($IC_{50} > 100$).

Para avaliar a capacidade inibitória de crescimento das formas amastigotas intracelulares, foram utilizadas cepas de *Leishmania (L.) major* capazes de expressar a enzima luciferase, desenvolvida por Voak e colaboradores (2013). O ensaio garante que o crescimento desses parasitas possa ser monitorado, através da medição da luminescência emitida, quando as moléculas de ATP dos parasitas metabolicamente ativos oferecem energia necessária para a enzima luciferase oxidar seu substrato. Os métodos baseados na presença de luciferase são rápidos, sensíveis e altamente indicados para a triagem de grandes conjuntos de compostos (*high throughput screening*), mas, em contrapartida, apresentam a principal desvantagem do alto custo dos reagentes utilizados (KASKOVA; TSARKOVA; YAMPOLSKY, 2016).

A detecção da luminescência se dá através da reação catalisada pela enzima luciferase, a partir da oxidação do seu substrato luciferina, que é responsável pela propriedade de bioluminescência de certos organismos, como vaga-lumes. A reação de oxidação ocorre pela descarboxilação da luciferina em presença do oxigênio molecular, resultando na molécula de oxiluciferina (Figura 34). As moléculas resultantes em seu estado eletronicamente excitado, formas tautoméricas ceto e enol, são capazes de emitir luz no espectro visível (540 – 600 nm) (SMIRNOVA; UGAROVA, 2017).

Figura 34. Mecanismo da reação de emissão de bioluminescência através da oxidação da luciferina.



Fonte: adaptado de Kaskova et. al., 2016.

Foram selecionados alguns compostos, dentre o conjunto avaliado, a fim de investigar a sua potência quanto à forma amastigota da *L. (L.) major*. Os compostos foram escolhidos de maneira a englobar aqueles que apresentaram diferentes valores de atividade biológica contra as formas promastigotas. Além disso, foram consideradas, também, as respectivas citotoxicidades às células THP-1.

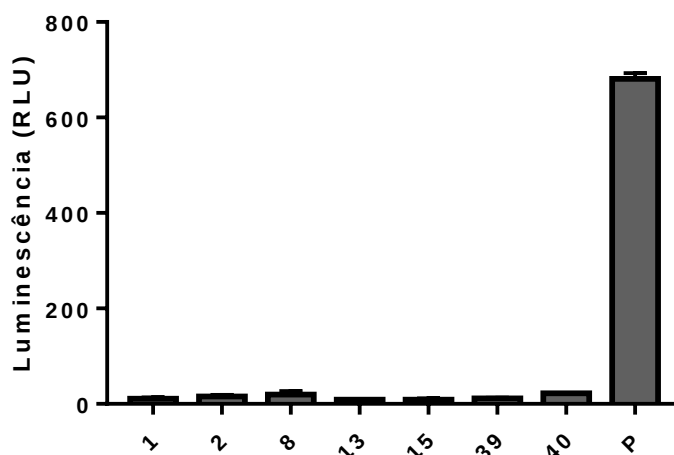
Inicialmente, a influência na porcentagem de crescimento dos amastigotas intracelulares em culturas de macrófagos THP-1 diferenciados foi avaliada quanto à presença de 30 µM dos compostos após 72 horas de incubação. Como controle positivo do ensaio, foi considerada a expressão de luminescência referente às culturas de macrófagos THP-1 não tratados infectados, contendo 100% de parasitas viáveis. Todos os ensaios de inibição da forma amastigota foram realizados em placa de 96 poços próprias para cultura celular e para a leitura da luminescência, as amostras de células lizadas foram transferidas para placas de 96 poços brancas. A atividade da enzima luciferase foi analisada utilizando o kit Promega

Como controle negativo do ensaio, foram consideradas as culturas de células THP-1 diferenciadas não infectadas e não tratadas. Considerando-se este um ensaio de triagem inicial do efeito dos compostos, alíquotas de 50 µL do material lizado em triplicata foram agrupados em um poço separado e, em seguida, 10 µL do lizado agrupado foram analisados. A atividade da luciferase foi medida após a adição de 50 µL do reagente substrato da enzima (Promega).

Na Figura 35 e na Tabela 15, encontra-se a relação dos dados de luminescências em unidade relativa de luz (RLU – *Relative Light Unit*) e dados de % de crescimento relativos à incubação de 30 µM dos compostos triados. É possível observar que todos os compostos triados apresentaram capacidade de inibir o crescimento das formas amastigotas na

concentração avaliada, apresentando inibição de quase toda a carga parasitária das culturas de macrófagos. Com isso, a construção das curvas dose-reposta e determinação dos valores de IC₅₀ dos compostos contra as formas amastigotas foram levados adiante.

Figura 35. Suscetibilidade de formas amastigotas de *L. (L.) major* que expressam luciferase em relação a 30 μ M dos compostos nitro-heterocíclicos.



Os ensaios foram realizados em placa de 96 poços em triplicata. Culturas de $2,5 \times 10^4$ células/mL foram infectadas com 5×10^5 parasitas/mL de promastigotas de *L. (L.) major* durante 72 horas de incubação em 37°C, com 5% de CO₂. A atividade da enzima luciferase foi determinada através do agrupamento do material lisado das triplicatas em uma alíquota e, por isso, não apresentam valores de desvio-padrão. A luminescência foi medida em unidades relativas de luz (RLU) e os valores corrigidos pelo controle negativo (macrófagos não infectados) foram plotados em comparação com o controle positivo (macrófagos infectados 100% viáveis). P: controle positivo (100% parasitas viáveis)

Tabela 15. Valores de porcentagem de inibição do crescimento de amastigotas intracelulares e luminescência emitida correspondente para 30 μ M dos compostos avaliados.

Compostos	Amastigota de <i>L (L.) major</i>	
	% <i>Crescimento</i>	Luminescência (RLU)
1	1,80	29
2	2,55	34
8	4,05	44
13	0,15	28
15	1,80	29
39	1,65	28
40	3,15	38
N	-	17
P	100	684

A atividade da enzima luciferase foi determinada através do agrupamento do material lisado das triplicatas, em uma alíquota e, por isso, não apresentam valores de desvio-padrão. A luminescência foi medida em unidades relativas de luz (RLU) e os valores de porcentagem de crescimento dos amastigotas intracelulares foram calculados em relação ao controle positivo (macrófagos infectados 100% viáveis).

P: controle positivo e N: controle negativo.

Como já discutido, em relação aos protocolos de triagem em busca de novos candidatos a fármacos, a escolha da forma morfológica do parasita é essencial para os ensaios de suscetibilidade. A forma promastigota da *Leishmania*, geralmente, apresenta melhor custo-benefício do que a forma intracelular amastigota, por ser de cultivo e manipulação mais convenientes e envolver menor complexidade dos protocolos envolvidos, sendo, portanto, a forma mais adequada para processos de automação.

Apesar dessas vantagens, os ensaios de triagem de alta produtividade (HTS – *high throughput screening*) que envolvem grandes conjuntos de moléculas testadas falham em detectar todos os possíveis compostos ativos, o que resulta em vários resultados falsos-negativos. Além disso, os resultados de triagens com a forma promastigota devem ser utilizados com cautela, pois essa forma morfológica está presente nos insetos vetores e não nas células humanas, indicando que a molécula que apresenta resultados promissores ou que se mostra como inativa quanto aos promastigotas pode apresentar resultados

diferentes em relação aos efeitos biológicos no parasita intracelular (LAMOTTE *et al.*, 2019; RIVAS; GIL, [s.d.]; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

Estudos comparativos de HTS na literatura quanto à eficiência de conjuntos de potenciais candidatos a fármacos determinaram que a forma promastigota é mais sensível à ação dos compostos do que a forma amastigota (MUYLDER *et al.*, 2011). Dessa forma, os ensaios de triagem devem levar em consideração, principalmente, a ação dos compostos contra as formas amastigotas e utilizar a triagem em promastigotas como estágio inicial do processo de identificação das moléculas de interesse.

Além de os amastigotas intracelulares se constituírem da forma clinicamente mais relevante para os ensaios *in vitro*, ambas as formas da *Leishmania* não só são morfologicamente diferentes como também apresentam variação quanto aos seus componentes bioquímicos (NADERER; MCCONVILLE, 2011). A escolha dos parâmetros adequados para os ensaios *in vitro* com amastigotas intracelulares depende de fatores como o tipo da célula hospedeira e a taxa de multiplicação específica para cada espécie da *Leishmania*. Isso denota a importância da validação da atividade dos compostos em diferentes condições. Os avanços nos protocolos de ensaios de suscetibilidade na forma intracelular vêm consagrando os ensaios de triagem como uma alternativa viável para busca de candidatos a fármaco. (BAEK *et al.*, 2020; HEFNAWY *et al.*, 2018; HENDRICKX *et al.*, 2019; SIQUEIRA-NETO *et al.*, 2012).

Na Tabela 16, encontram-se os valores de IC₅₀ determinados para as formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) major* dos compostos selecionados, assim como os valores de citotoxicidade (CC₅₀) em relação às células THP-1 e o índice de seletividade (IS) (CC₅₀/IC₅₀) relativo à preferência pela forma amastigota. Referente aos ensaios, as curvas de dose-resposta bem como os valores de porcentagem de inibição estão disponíveis no Anexo 7 (ANEXO 7 - Curva dose-resposta correspondentes à inibição de crescimento parasitário para as formas amastigota de *L. (L.) major*).

Os compostos da quimioteca foram escolhidos de forma a representar a natureza química dos grupos de substituintes, alquila, ciclo alquila, heterocíclicos, benzeno e 4-benzeno substituídos. Dessa forma, foram selecionados os compostos: **2** [-CH₂CN] (alquila), **8** [-C₆H₄] (benzeno), **10** [ciclo-hexano] (ciclo alquila), **15** [5-4 CH₃-1,2,3-tiadiazol] (heterocíclico), **20** [-C₈H₁₇] (alquila) e os derivados 4-benzeno substituídos, **28** [C₆H₆-4-tet-butil], **33** [C₆H₆-4-butil amino], **34** [C₆H₆-4-butoxi] e **40** [C₆H₆-4-heptoxi].

É importante notar que, para os ensaios de suscetibilidade em que a *Leishmania* na forma amastigotas infecta os macrófagos, os compostos que apresentam atividade devem

atravessar vários compartimentos com diferentes faixas de pH e envolvendo diferentes mecanismos de transporte celular de moléculas pequenas, como transporte ativo, passivo ou facilitado por moléculas transportadoras. Compostos transportados ativamente ou que atravessam a membrana por meio da diferença do gradiente de concentração entre o ambiente extracelular e intracelular conseguem alcançar, em altas concentrações, o ambiente interno do fagolisossoma (pH ácido) e o parasita (pH neutro). Vale ressaltar que uma importante desvantagem dos ensaios de triagem com células é que os compostos estão suscetíveis também a atividades de bombas de efluxo, por exemplo, o que resultaria em compostos inativos, apesar de poderem apresentar estrutura potencialmente otimizável (MARTIN; CANTIZANI; PEÑA, 2017).

Tabela 16. Suscetibilidade dos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos para as formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) major*.

Compostos	<i>L. (L.) major</i> IC ₅₀ (μM)		<i>THP-1</i>	IS
	Promastigota (média ± dp)	Amastigota (média ± dp)	CC ₅₀ (μM) (média ± dp)	
2	3,03 ± 0,05	2,05 ± 0,14	> 100	> 48
8	0,6 ± 0,02	0,32 ± 0,027	33,26 ± 1,6	101
10	1,71 ± 0,09	0,14 ± 0,009	> 100	> 714
15	0,81 ± 0,03	0,59 ± 0,08	61,68 ± 5,8	104
20	1,74 ± 0,089	0,46 ± 0,0029	> 100	216
28	2,71 ± 0,12	0,45 ± 0,02	81,69 ± 1,4	181
33	1,14 ± 0,036	0,84 ± 0,05	>100	121
34	0,188 ± 0,008	1,84 ± 0,09	29,55 ± 2,5	16
40	0,087 ± 0,001	0,006 ± 0,0003	> 100	16581
Nifurtimox	3,5 ± 0,09	2,15 ± 0,01 ¹	> 100 ¹	> 47 ¹
Nifuroxazida	12,79 ± 1,04	> 30	38,75	nd

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados de IC₅₀ e CC₅₀ foram apresentados em média e desvio-padrão (dp). O índice de seletividade (IS) é relativo à razão entre o CC₅₀ referente à toxicidade dos compostos quanto às células THP-1 diferenciadas e o IC₅₀ referente à ação dos compostos quanto à forma amastigota de *L. (L.) major*. nd: não determinado; ¹(Voak et. al., 2013).

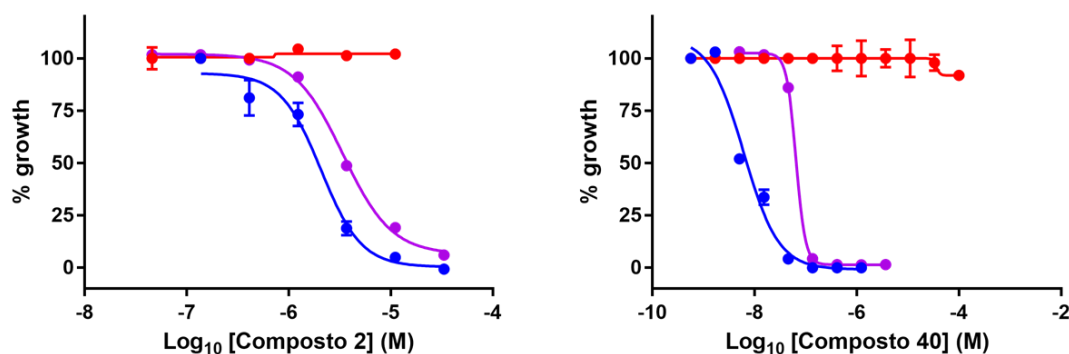
Para o caso dos compostos nitro-heterocíclicos estudados em faixas de pH ácido, as estruturas se encontram na sua forma molecular, sugerindo que o seu transporte para

dentro das estruturas do fagolisossoma pode ocorrer tanto por meio de transporte facilitado quanto ativo. O transporte das estruturas pelas membranas biológicas está relacionado às propriedades que garantem o equilíbrio hidrófilo-lipófilo dos compostos, como o coeficiente de partição (logP), que está relacionado à lipofilicidade, permitindo que estes sejam melhor absorvidos, transportados pelas membranas das células e, assim, possam entrar em contato com o parasita e exercer o efeito biológico desejado.

Dentre os compostos analisados, é possível perceber a influência que os substituintes 4-benzeno substituídos exercem para a atividade anti-amastigota. Em geral, tais substituintes conferiram aumento significativo da atividade aos compostos, apesar de o comportamento também não ser apresentado pelo composto **34** [-C₆H₄-4-OC₄H₉]. Compostos que possuíam substituintes que adicionavam menor volume e lipofilicidade à estrutura protótipo, como o composto **2** [-CH₂CN] e o **15** [5-4 CH₃-1,2,3-tiadiazol], apresentaram menor influência para a inibição do crescimento dos amastigotas intracelulares. Os derivados que apresentaram maior aumento de atividade referente à razão entre os valores de suscetibilidade das formas promastigotas/amastigotas foram: compostos **40** [-C₆H₄-4-OC₇H₁₅] e **10** [-C₆H₁₁-], que se mostraram como 12 vezes mais ativos; composto **28** [-C₆H₄-4-terc-C₄H₉], que foi 6 vezes mais ativo, e o composto **20** [-C₈H₁₇], que se mostrou 3 vezes mais ativo contra a forma intracelular em relação à extracelular.

Na Figura 36, estão ilustradas as curvas dose-resposta dos compostos **2** e **40** referentes à atividade anti-promastigota, anti-amastigota e citotoxicidade. Podemos observar o impacto da lipofilicidade referente à inibição de crescimento das culturas de amastigotas intracelulares. Ambos os derivados nitro-heterocíclicos apresentam o mesmo perfil de baixa toxicidade às células THP-1 diferenciadas (CC₅₀ > 100 µM). O composto **40** [-C₆H₆-4-OC₇H₁₅] (Figura 36) que possui o substituinte mais lipofílico se mostrou como o mais potente tanto para as formas promastigotas quanto amastigotas, demonstrando ser 350 vezes mais ativo do que o nifurtimox, usado como fármaco de referência. Além disso, também apresentou maior valor de índice de seletividade, indicando que o composto é mais seletivo ao parasita intracelular do que às células THP-1, reforçando-o como estrutura de interesse para próximas etapas do processo de descobrimento de novos fármacos, como ensaios de farmacocinética em modelos animais, além de se poder explorar a estrutura do seu substituinte em subsequentes estudos de otimização ao arcabouço químico dos compostos derivados do 5-nitro-2-furfurilideno.

Figura 36. Curvas dose-resposta de inibição do crescimento para *L. (L.) major* e células THP-1 referentes aos compostos **2** (esquerda) e **40** (direita).



Diferentes concentrações (100 – 0,0005 μ M) dos compostos foram testadas e as curvas dose-respostas foram construídas para culturas de promastigotas (roxo), amastigotas (azul) e células THP-1. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os gráficos representam a média e desvio-padrão referente à porcentagem de inibição de crescimento das culturas em cada concentração testada.

5.10 Investigação do mecanismo de ação da quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos envolvendo a enzima nitroredutase

Inicialmente, avaliou-se a quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos quanto ao efeito no crescimento do parasita *T. brucei*, para posteriormente determinar se a indução da expressão em excesso da nitroredutase do tipo 1 causaria alteração dos valores de atividade biológica (IC_{50}).

Esses ensaios foram realizados porque dados na literatura sugerem fortemente que a enzima nitroredutase do tipo 1 está envolvida na ativação de pró-fármacos como o nifurtimox, fármaco utilizado para o tratamento de doença de Chagas e tripanossomíase africana (BOT *et al.*, 2010; HALL *et al.*, 2010; MEREDITH *et al.*, 2017; WILKINSON *et al.*, 2008).

Inicialmente, a quimioteca completa foi triada quanto ao seu efeito anti-*T. brucei* com cepas *wyld-type*, a fim de se selecionar, posteriormente, alguns compostos com base em critérios como compostos com substituintes químicos representativos e atividade biológica apresentada contra a forma tripomastigota do *Trypanosoma brucei*.

Dessa maneira, foi avaliada a capacidade de inibição do crescimento das culturas das formas tripomastigotas presentes no sangue dos hospedeiros vertebrados (*bloodstream form* – BSF) do *T. brucei*, em presença dos compostos estudados. As curvas de dose-resposta bem como os valores de porcentagem de inibição estão disponíveis no Anexo 8 (ANEXO 8- Curva dose-resposta correspondentes à inibição de crescimento parasitário para as formas tripomastigotas de *T. brucei*).

Os resultados dos valores de concentração necessária para inibir o crescimento (IC_{50}) de culturas de *T. brucei*, determinados após 72 horas de incubação em 37° C com 5% de CO_2 , e os valores em potência de log (pIC_{50}) estão dispostos na Tabela 17. A figura 37 mostra o conjunto de compostos classificados quanto à potência da atividade biológica (pIC_{50}): alta (pIC_{50} entre 7,60 e 7), moderada (pIC_{50} entre 6,99 e 5,59) e baixa (pIC_{50} entre 5,58 e 5,30).

O composto **40** [$-C_6H_4-4-OC_7H_{15}$] ($IC_{50} = 0,033 \pm 0,00032 \mu M$) se apresentou como o mais ativo contra a forma BSF de *T. brucei*, sendo 76 vezes mais potente que o fármaco de referência aprovado para o tratamento do parasita, o nifurtimox, consagrando-se como um potencial candidato como molécula de interesse que apresenta atividade de amplo espectro, isto é, com resultados de IC_{50} promissores para os demais parasitas do gênero *Kinetoplastida*, como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp* (MENDONÇA *et al.*, 2019; PALACE-BERL *et al.*, 2018).

Em relação ao fármaco de referência, todos os compostos mostraram capacidade de inibição do crescimento de maneira mais eficientes que o nifurtimox ($IC_{50} = 2,53 \pm 0,33 \mu M$). Com exceção para os compostos **4** [$-OC_2H_5$] ($IC_{50} = 2,97 \pm 0,7 \mu M$), **15** [$5-4 CH_3-1,2,3$ -tiadiazol] ($IC_{50} = 3,9 \pm 0,07 \mu M$) e **27** [$C_6H_4-4-C_4H_9$] ($IC_{50} = 4,95 \pm 0,58 \mu M$), mas que apresentaram valores próximos de IC_{50} ao fármaco.

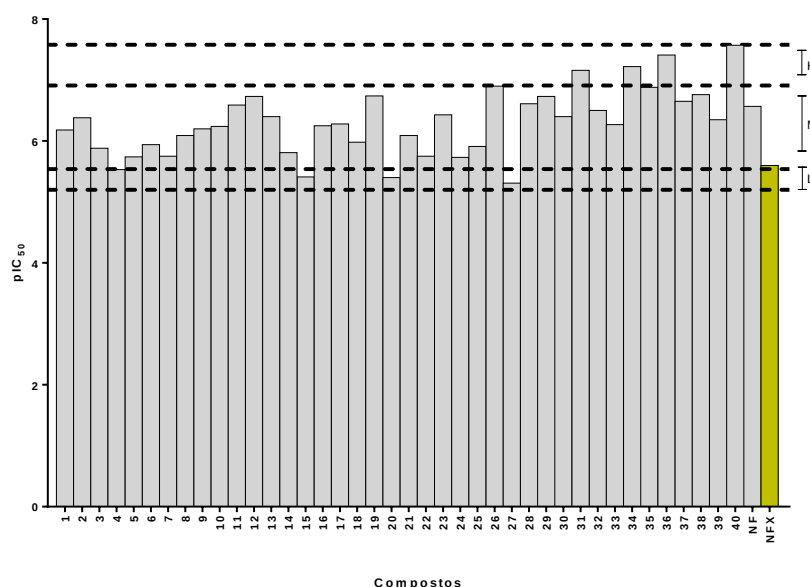
Os valores correspondentes ao índice de seletividade (IS) também estão disponíveis na Tabela 17. A ação dos compostos, em geral, mostrou-se mais seletiva ao parasita do que tóxica aos macrófagos, isto é, apresentando altos valores de IS. De fato, a quimioteca estudada quando comparada com o nifurtimox (IS >39) somente apresenta maior seletividade às células, isto é, menores valores de IS, para os compostos **4** [$-OC_2H_5$], **5** [furano], **15** [$5-4 CH_3-1,2,3$ -tiadiazol], **18** [$C_6H_4-4-OCH_3$], **20** [C_8H], **22** [$C_6H_4-4-C_3H_7$], **27** [$C_6H_4-4-C_4H_9$] e **30** [$C_6H_4-3,4-OCH_3$].

Tabela 17. Atividade dos compostos nitro-heterocíclicos e nifurtimox em relação à forma tripomastigotas de *T. brucei*.

Composto	IC ₅₀ (μM) (média ± dp)	pIC ₅₀	IS	Composto	IC ₅₀ (μM) (média ± dp)	pIC ₅₀	IS
1	0,65 ± 0,05	6,18	153,01	21	0,81 ± 0,01	6,09	123
2	0,41 ± 0,02	6,38	241,31	22	1,77 ± 0,18	5,75	26,59
3	1,31 ± 0,09	5,88	76,54	23	0,37 ± 0,09	6,43	271,37
4	2,97 ± 0,7	5,53	33,66	24	1,86 ± 0,05	5,73	53,82
5	1,83 ± 0,65	5,74	13,93	25	1,23 ± 0,07	5,91	28,39
6	1,15 ± 0,07	5,94	62,75	26	0,13 ± 0,02	6,90	478,63
7	1,77 ± 0,2	5,75	56,63	27	4,95 ± 0,58	5,31	20,19
8	0,8 ± 0,02	6,09	41,34	28	0,25 ± 0,05	6,61	330,55
9	0,62 ± 0,08	6,20	160,12	29	0,19 ± 0,06	6,73	247,67
10	0,58 ± 0,01	6,24	172,18	30	0,4 ± 0,01	6,40	28,08
11	0,26 ± 0,01	6,59	137,96	31	0,07 ± 0,01	7,16	836,52
12	0,19 ± 0,03	6,73	138,96	32	0,31 ± 0,03	6,50	51,42
13	0,4 ± 0,17	6,40	82,34	33	0,54 ± 0,05	6,27	184,85
14	1,56 ± 0,06	5,81	64,27	34	0,060 ± 0,001	7,22	486,82
15	3,9 ± 0,07	5,41	15,80	35	0,13 ± 0,02	6,88	52,88
16	0,57 ± 0,08	6,25	88,30	36	0,04 ± 0,00078	7,41	485,18
17	0,53 ± 0,02	6,28	47,18	37	0,22 ± 0,03	6,65	446,53
18	1,05 ± 0,19	5,98	18,08	38	0,17 ± 0,01	6,76	579,37
19	0,18 ± 0,04	6,74	80,68	39	0,44 ± 0,03	6,35	225,02
20	2,18 ± 0,2	5,66	25,13	40	0,033 ± 0,00032	7,57	3696,86
NFX	2,53 ± 0,33	5,59	> 39	NF	0,26 ± 0,08	6,56	143,75

Valores de IC₅₀ (μM) e pIC₅₀ correspondentes à inibição relativa do crescimento das culturas de BSF de *T. brucei* (wild-type). Dados correspondem à média e ao desvio-padrão de dois ensaios independentes BSF realizados em triplicata. Nifuroxazida (NF) foi considerada como composto-protótipo e nifurtimox (NFX) como fármaco de referência. Índice de seletividade (IS) corresponde à razão entre os valores de CC₅₀ (μM) das células THP-1/IC₅₀ (μM) do *T. brucei*.

Figura 37. Valores de atividade anti-*T. brucei* convertida em pIC_{50} ($-\log IC_{50}$ M) da quimioteca de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos.



H: compostos com alta atividade contra a forma promastigota; M: compostos com atividade moderada, L: compostos com baixa atividade. NFX: nifurtimox (amarelo); NF: nifuroxazida.

Com o objetivo de testar a hipótese de que os compostos estudados são biorreduzidos pelas enzimas nitrorredutases, foram, então, avaliadas as capacidades inibitórias do seu crescimento quanto a uma cepa mutante da forma tripomastigota de *T. brucei* capaz de ser induzida a expressar a enzima nitroredutase do tipo 1 do parasita (*TbNTR1*) (WILKINSON *et al.*, 2008).

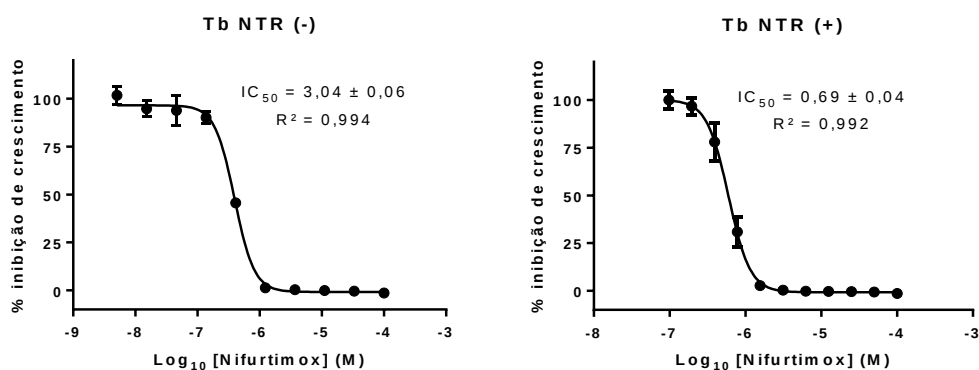
A enzima NTR1 foi clonada juntamente com um vetor capaz de sofrer indução da expressão em presença de tetraciclina (1 µg/mL). Tal cepa foi denominada de *TbNTR* e os ensaios de suscetibilidade foram realizados com compostos selecionados que apresentam substituintes químicos representativos da quimioteca, apresentaram diferentes perfis de atividade (alto, moderado e baixo) contra a cepa de *T. brucei* original (*wyld-type*) e apresentaram resultados satisfatórios de citotoxicidade ($CC_{50} > 25$ µM).

A capacidade de inibição de crescimento (IC_{50} µM) das culturas parasitárias referentes aos compostos selecionados da quimioteca (2, 8, 10, 15, 28, 31, 34, 36 e 40) foi avaliada, então, para a forma tripomastigota de *TbNTR*, em presença [*TbNTR* (+)] e ausência [*TbNTR* (-)] de tetraciclina. Tal estratégia é baseada em estudos prévios, com derivados nitro-heterocíclicos ativados pelas nitrorredutases, em que, para parasitas mutantes que não expressavam a NTR1, foi observado que estes passavam a se mostrar resistentes aos efeitos dos compostos testados. Consequentemente, a super expressão do

gene NTR resulta, então, em uma resposta hipersensível aos seus efeitos (BOT *et al.*, 2013; HALL *et al.*, 2010; TROCHINE *et al.*, 2014; WILKINSON *et al.*, 2008).

Dessa maneira, o nifurtimox foi utilizado como fármaco de referência e controle para os ensaios, de forma que, para cada microplaca do ensaio realizado com os compostos, os valores de inibição do crescimento apresentados pelo nifurtimox foi considerado como critério de qualidade do ensaio. Ademais, os valores de inibição do crescimento das culturas parasitárias correspondentes às concentrações (μM) testadas relativas ao nifurtimox estão dispostas na Tabela 18, assim como as respectivas curvas dose-resposta e valores de IC_{50} (μM) (Figura 38).

Figura 38. Curva dose-resposta correspondente à inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações de nifurtimox para as condições de indução da super expressão da NTR1 *TbNTR* (+) e expressão normal da proteína *TbNTR* (-).



Valores de atividade biológica: IC_{50} e coeficiente de determinação ajustado (R^2).

Tabela 18. Inibição do crescimento parasitário de culturas de tripomastigotas de *T. brucei* para as condições de indução da super expressão da NTR1 *TbNTR* (+) e expressão normal da proteína *TbNTR* (-) relativos a diferentes concentrações de nifurtimox.

Concentração		IC	
μM	log (M)	<i>TbNTR</i> (-) (média $\pm$ dp)	<i>TbNTR</i> (+) (média $\pm$ dp)
100	-4	0,0 $\pm$ 0,21	0,0 $\pm$ 0,45
50	-4,3	0,08 $\pm$ 0,43	0,04 $\pm$ 0,48
25	-4,6	0,30 $\pm$ 0,37	0,22 $\pm$ 0,41
12,5	-4,9	0,37 $\pm$ 0,43	0,15 $\pm$ 0,48
6,25	-5,2	1,34 $\pm$ 0,17	0,22 $\pm$ 0,46
3,12	-5,5	45,63 $\pm$ 1,39	1 $\pm$ 0,62
1,6	-5,8	90 $\pm$ 3,32	3,81 $\pm$ 0,8
0,8	-6,1	93 $\pm$ 7,63	30,89 $\pm$ 6,82
0,4	-6,4	94 $\pm$ 4,23	77,98 $\pm$ 3,61
0,2	-6,7	100 $\pm$ 4,61	96,09 $\pm$ 3,7
0,01	-7	100 $\pm$ 1,51	100 $\pm$ 4,6

Dados apresentados em média e desvio-padrão (dp) de ensaios em triplicata e repetição de, pelo menos, um ensaio independente. IC: porcentagem (%) de inibição de crescimento.

O nifurtimox é considerado fármaco de referência para o tratamento de doença de Chagas, causado pelo *Trypanosoma cruzi*, e a Tripanossomíase Humana Africana (HAT), causada pelo *T. brucei*, e se comporta como pró-fármaco bioativado pelas enzimas nitrorredutases de ambos os parasitas (HALL; BOT; WILKINSON, 2011; VOAK *et al.*, 2013; WILKINSON *et al.*, 2008; WYLLIE *et al.*, 2016b). Os valores de IC₅₀ encontrados para o nifurtimox corroboram com os dados apresentados pela literatura. Para a condição de super expressão de NTR1, os parasitas se mostraram até 6 vezes mais sensíveis ao fármaco [*TbNTR* (+): IC₅₀ = 0,69 $\pm$ 0,04 μM / *TbNTR* (-): IC₅₀ = 3,04 $\pm$ 0,06 μM], confirmando que ele é metabolizado pela enzima.

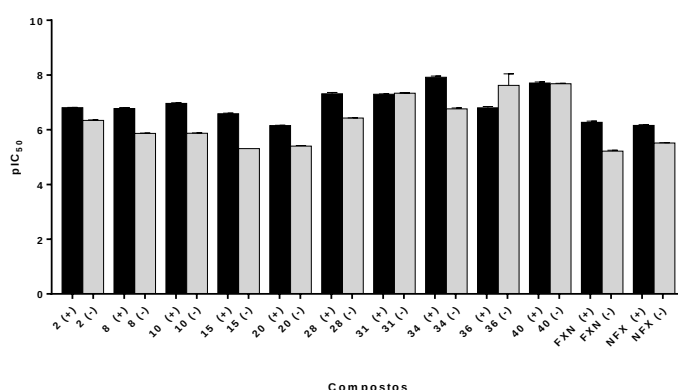
Também foi considerado como fármaco de referência para o ensaio o fexinidazol, que é de administração oral, aprovado para o tratamento de HAT desde 2010 (TORREELE *et al.*, 2010) e encontra-se em fase de estudos clínicos para o tratamento contra *T. cruzi* e *Leishmania* spp. O fármaco também se comporta como pró-fármaco e já

foram reportadas que ele é metabolizado por nitrorredutases de *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania* spp (BAHIA *et al.*, 2014; “Fexinidazole for Chagas | DNDi”, 2020; PATTERSON; FAIRLAMB, 2018; SUNDAR; SINGH, 2016; WYLLIE *et al.*, 2012). Assim como o nifurtimox, concordando-se com o indicado pela literatura, as culturas de parasitas mutantes se mostraram 10 vezes mais sensíveis ao fármaco [*TbNTR* (+): $IC_{50} = 0,19 \pm 0,03 \mu M$ / *TbNTR* (-): $IC_{50} = 6,08 \pm 0,44 \mu M$] (Tabela 18).

Os resultados de IC_{50} (μM) correspondentes ao parasita mutante com e sem indução da expressão de NTR estão dispostos na Tabela 19. A fim de facilitar a visualização das diferenças de atividade apresentadas pelos compostos selecionados contra ambas as condições de expressão de NTR1 do parasita, foi determinada a razão entre as duas atividades observadas [*TbNTR* (-) / *TbNTR* (+)], para determinar a ordem de grandeza entre elas. Além disso, os valores de atividade também foram transformados em potência logarítmica ($-\log IC_{50}$), pIC_{50} (M) e estão representados na Figura 39.

Os resultados de IC_{50} (μM) obtidos em relação às culturas de *TbNTR* (-) foram consideradas como controle, uma vez que, em ausência da tetraciclina, apresentam níveis de expressão da NTR 1 normais. De fato, os resultados dos ensaios de suscetibilidade para a cepa *TbNTR*(-) foram comparáveis aos resultados obtidos para as culturas de *T. brucei* original (*wild-type*), corroborando os dados de literatura, ou seja, que as cepas *TbNTR* apresentam o mesmo perfil de crescimento quando comparados à cepa *wild-type* (WILKINSON *et al.*, 2008).

Figura 39. Diferenças entre as suscetibilidades de culturas mutantes de *T. brucei* induzidas à superexpressão de nitrorredutase (NTR 1) em relação aos compostos.



Valores em pIC_{50} são correspondentes às médias dos resultados de inibição relativa do crescimento (IC_{50} M) em potência de log. Dados correspondem à média de dois ensaios independentes realizados em quadriplicata. Nifurtimox (NFX) e fexinidazol (FXN) foram considerados como fármacos de referência. Cepas induzidas a superexpressar NTR (+) estão representadas em preto e, como controle, o mutante sem indução (-), em cinza.

Tabela 19. Suscetibilidade da forma tripomastigota de *T. brucei* para as condições de indução da superexpressão da NTR1 *TbNTR* (+) e expressão normal da proteína *TbNTR* (-) em relação aos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.

Compostos	<i>T. brucei</i> IC ₅₀ (μM)		<i>TbNTR</i> (-) / <i>TbNTR</i> (+)
	<i>TbNTR</i> (-) (média±dp)	<i>TbNTR</i> (+) (média±dp)	
2	0,45 ± 0,02	0,15 ± 0,004	3
8	1,36 ± 0,03	0,16 ± 0,012	8,5
10	1,33 ± 0,027	0,10 ± 0,005	13,3
15	4,95 ± 0,49	0,1 ± 0,005	49
20	2,18 ± ,15	0,53 ± 0,031	4,11
28	0,3 ± 0,006	0,04 ± 0,005	7,5
31	0,046 ± 0,001	0,046 ± 0,001	1
33	0,9 ± 0,08	0,059 ± 0,002	15
34	0,16 ± 0,004	0,01 ± 0,001	16
36	0,032 ± 0,025	0,15 ± 0,017	0,21
40	0,015 ± 0,01	0,0146 ± 0,009	1,02
Nifurtimox	3,04 ± 0,06	0,69 ± 0,04	4,40
Fexinidazol	6,08 ± 0,44	0,19 ± 0,03	32

Valores de IC₅₀ (μM) correspondentes à inibição relativa do crescimento das culturas mutantes de tripomastigotas de *T. brucei* em presença e ausência do indutor gênico (tetraciclina) de superexpressão da enzima nitroreductase do tipo 1. Dados correspondem à média e ao desvio-padrão de dois ensaios independentes realizados em quaduplicata. Nifurtimox e fexinidazol foram considerados como fármacos de referência.

As culturas de parasitas que apresentam elevado nível de expressão de NTR do tipo 1, *TbNTR* (+), para os compostos selecionados, mostraram maior sensibilidade que os compostos na ordem de 3 a 18 vezes em relação ao controle, isto é, em comparação com os valores de suscetibilidade em relação à cultura de *TbNTR* (-). Os derivados 4-benzeno substituídos (**8**, **28**, **33** e **34**), apresentaram diferença nos valores de atividade em relação aos tripomastigotas *TbNTR* (+). Para o composto **33** [-C₆H₄-4-NC₄H₉], a cultura induzida a expressar NTR1 em elevados níveis (*TbNTR*+) se mostrou, inclusive, 15 vezes mais suscetível ao efeito do composto.

Em relação aos demais grupos de substituintes, o composto **15** [5-4 CH₃-1,2,3-tiadiazol] (substituinte heterocíclico), que apresentava atividade moderada a formas BSF

de *T. brucei wild-type*, demonstrou a maior diferença de valores de atividade entre as condições testadas e se mostrou 18 vezes mais potente em relação à forma tripomastigota de TBNTR (+). O composto **2** [-CH₂CN] (substituinte alquila), que também apresentou atividade moderada para o parasita, demonstrou hipersensibilidade ao mutante testado somente 3 vezes maior. Também de substituinte alquila, mas de maior volume e lipofilicidade, o composto **20** [-C₈H₁₇], que apresentava atividade baixa contra as formas BSF do *T. brucei wild-type*, foi 6 vezes mais potente em relação aos tripomastigotas TBNTR (+). O composto **10** [-C₆H₁₁-], que apresenta o substituinte ciclohexano, que demonstrou atividade moderada contra as formas BSF do *T. brucei wild-type*, por sua vez, foi 12 vezes mais potente em relação à condição de superexpressão da *TbNTR*.

Tais resultados indicam que, apesar de alguns se mostrarem altamente potentes quanto ao seu efeito inibitório do crescimento dos parasitas, as diferenças resultantes da influência dos substituintes químicos do conjunto de compostos estudados demonstram diferentes perfis de resposta. Os compostos benzeno substituídos **40** [-C₆H₄-4-OC₇H₁₅], **31** [-C₆H₄-4-SO₂NH₂] e **36** [-C₆H₄-3-O-C₆H₄], de alta atividade contra as formas tripomastigotas de *T. brucei* em relação à linhagem TbNTR (+) não apresentaram alteração significativa dos valores de IC₅₀ (μM). Isso indica que, apesar de apresentarem o arcabouço químico 5-nitro-2-furfurilidênico similar ao nifurtimox [4-(5-nitro-2-furfurilidênico)-amino-1,1-dióxido-3-etiltiomorfolina], o efeito de alguns substituintes químicos presentes no conjunto de compostos estudados possivelmente afeta a sua capacidade de serem metabolizados pela enzima.

Adicionalmente, propriedades químicas relacionadas aos substituintes químicos devem ser levadas em consideração quanto a interação destes compostos com o parasita e com a enzima estudada. Pedron e colaboradores (2018) demonstrou que propriedades eletrônicas associadas ao potencial de oxi-redução das moléculas são importantes para a atividade biológica contra *Leishmania* e *T. brucei*. Os substituintes benzeno substituídos 4-heptoxi (**40**), 4-sulfamoil (**31**) e 3-fenoxi (**36**), provavelmente, impactam no equilíbrio eletrônico da molécula há tornando não reativa para a enzima nitroredutase do tipo 1 em *T. brucei*.

5.11 Estudos aplicando métodos de modelagem molecular e quimiometria para a investigação das relações entre estrutura química-propriedades moleculares-atividade biológica

5.11.1 Conjunto de dados, construção dos modelos moleculares 3D e cálculo das propriedades moleculares

A construção dos modelos moleculares tridimensionais do conjunto de dados formado pelos 40 derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos e nifuroxazida foi realizada com o auxílio do programa *Hyperchem Professional 8.0* (HYPERCUBE, 2008). A estrutura cristalográfica do composto protótipo, nifuroxazida (NF), foi utilizada como arcabouço químico referência para geometria inicial dos demais compostos. A estrutura da NF, depositada no *Cambridge Structural Database* (CSD) (GROOM *et al.*, 2016) sob o código LEQTAC (PNIEWSKA; JANUCHOWSKI, 1998) foi utilizada como referência. As estruturas 3D foram verificadas quanto à disponibilidade da forma ionizada ou molecular em faixa de pH fisiológico (entre 7,4 e 7,2) com o auxílio do programa *Marvin Sketch*. Os cálculos demonstraram que todos os compostos permaneciam na forma não ionizada na faixa de pH escolhida e, portanto, as estruturas foram desenhadas na forma neutra.

A construção das estruturas 3D das moléculas seguiu conforme descrito na seção de Materiais e Métodos. A análise conformacional de cada molécula foi gerada com o programa *Balloon* (VAINIO; JOHNSON, 2007). O programa utiliza um algoritmo genético que gera confôrmeros diferentes a partir da modificação dos ângulos de torção, da estereoquímica das ligações duplas, dos centros quirais tetraédricos e da conformação de anéis. Foram gerados até 200 conformações, considerando-se o número de ligações rotáveis para cada composto (EBEJER; MORRIS; DEANE, 2012). Os valores das energias total obtidos para os compostos da quimioteca foram na faixa de 40 a 55 kcal/mol. Os mínimos locais foram selecionados e minimizadas novamente e foram as estruturas de entrada (*input*) para cálculo dos descritores nos diferentes programas utilizados.

As propriedades moleculares de natureza topológica, hidrofóbica, eletrônica, termodinâmica, geométrica, constitucional e espectrofotométrica foram calculadas a partir das estruturas tridimensionais da quimioteca, conforme descrito. Na Tabela 20 estão apresentados os descritores calculados para o conjunto de dados, assim como o

programa utilizado e a informação sobre os descritores. Os valores dos descritores calculados juntamente com a atividade biológica (pIC_{50}) encontram-se no material anexo (ANEXO 9 - Valores dos descritores calculados para os compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos).

Descritores eletrônicos foram calculados pelo método semi-empírico B3LYP, conjunto de base 6311G++(d,p) (PETERSSON *et al.*, 1988; PETERSSON; AL-LAHAM, 1991) com o programa *Gaussian* (G03W). Os valores de HOMO, LUMO e gap, em *hartree*, foram transformados em kcal/mol (1 Hartree = 6,27509 kcal/mol). As cargas de potencial eletrostático (CHELPG) para cada átomo calculadas pelo método de Breneman e Wiberg (1990).

Tabela 20. Descritores calculados para a quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.

Descritores	Programa	Natureza	Descrição
E_{HOMO}			Energia do orbital HOMO (orbital molecular de maior energia, highest occupied molecular orbital)
E_{LUMO}			Energia do orbital LUMO (orbital molecular de menor energia, lowest unoccupied molecular orbital)
GAP			$E_{HOMO} - E_{LUMO}$
μ_z			Momento de dipolo elétrico no eixo y
μ_x			Momento de dipolo elétrico no eixo x
μ_y			Momento de dipolo elétrico no eixo z
μ_T			Momento de dipolo elétrico total
CHELPG_C11	Gaussian 03W	Eletrônica	Carga CHELPG do átomo de carbono C11
CHELPG_C8			Carga CHELPG do átomo de carbono C8
CHELPG_C6			Carga CHELPG do átomo de carbono C6 (C=N)
CHELPG_C1			Carga CHELPG do átomo de carbono C1
CHELPG_N4			Carga CHELPG do átomo de carbono
CHELPG_O3			Carga CHELPG do átomo de oxigênio carbonílico
CHELPG_N (-NO2)			Carga CHELPG do átomo de nitrogênio pertencente ao grupamento nitro
CHELPG_N5			Carga CHELPG do átomo de nitrogênio N5 (C=N)

Tabela 20. Descritores calculados para a quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos (continuação).

Descritores	Programa	Natureza	Descrição
Platt			Índice que descreve a soma dos graus de contorno de superfície
Randic			Índice que descreve a soma harmônica das médias geométricas dos vértices
Balaban			Índice que descreve a soma das distancias médias (BALABAN, 1982)
Harary			Índice que descreve a soma das metades dos elementos diagonais externos da matriz de distância molecular recíproca
Hyper Wiener			Variação do índice de Wiener
Szeged			Índice que estende o de Wiener para diagramas cíclicos, contando pela soma da contagem do número de átomos em ambos os lados de cada ligação
Wiener			Índice que descreve a soma da distância entre átomos
Polarity Wiener			Índice que descreve o número de 3 distâncias de ligação na molécula
Cyclomatic number			Menor número de ligações que deve ser removido para que não haja átomos conectados restante
Fsp3	Marvin ChemAxon	Topológica	Número de carbonos sp ³ hibridizados divididos pelo número total de carbonos em uma molécula,
Aliphatic atom count			Número de átomos alifáticos em uma molécula
Aliphatic bond count			Número de ligações alifáticas em uma molécula
Aromatic atom count			Números de átomos aromáticos em uma molécula
Aromatic bond count			Número de ligações aromáticas em uma molécula
Chain atom count			Número de ligações em uma molécula
Chiral center count			Número de átomos em cadeia
			Número de carbonos quirais em uma molécula
Ring atom count			Número de anéis em uma molécula
Ring bond count			Número de ligações em anéis em uma molécula
Aliphatic ring count			Número de anéis alifáticos com ligações não aromáticas em uma molécula
Aromatic ring count			Número de anéis aromáticos em uma molécula

Tabela 20. Descritores calculados para a quimioteca de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos (continuação).

Descritores	Programa	Natureza	Descrição
Carbo ring count	Marvin ChemAxon	Topológica	Número de anéis que contenham somente carbono em uma molécula
Carboaliphatic ring count			Número de anéis alifáticos que contenham somente carbonos em uma molécula
Carboaromatic ring count			Número de anéis aromáticos que contenham somente carbonos em uma molécula
Fused aromatic ring count			Número de anéis aromáticos com ligações em comum com outros anéis em uma molécula
Fused ring count			Número de anéis fundidos em uma molécula
Heteroaromatic ring count			Número de anéis aromáticos heterocíclicos em uma molécula
Largest ring size			Tamanho do maior anel m uma molécula
Largest ring system size			Número de anéis no maior sistema de anéis em uma molécula
Ring count	Marvin ChemAxon	Constitucional/intrínseco	Número de anéis em uma molécula
Ring system count			Número de sistema de anéis em uma molécula
RBC			Número de ligações rotáveis de uma molécula
BC			Número de ligações de uma molécula
Donor count			Soma dos átomos em uma molécula que tem capacidade doadora de hidrogênio
Donor sites			Soma dos átomos de hidrogênio conectados com átomos doadores de ligação de hidrogênio
Acceptor count			Número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio
Acceptor sites			Soma de pares de elétrons nos átomos aceptores de ligações de hidrogênios
MW	ViewerLite 5.0	Estéricos/geométricos	Peso molecular
Atom Number			Número de átomos
VvdwR			Volume de Van der Waals do substituinte
ASAR			Superfície de Van der Waals do substituinte (Å ²)
avdW			Superfície de Van der Waals (Å ²)
VvdW			Volume de Van der Waals (Å ³)
ASA	Marvin ChemAxon	Estéricos/geométricos	Superfície de acessibilidade ao solvente calculada usando o raio de uma molécula de água
ASA+			Superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos com carga parcial positiva

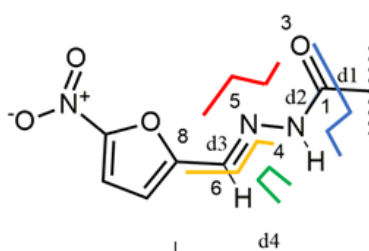
Tabela 20. Descritores calculados para a quimioteca de compostos 5-nitro2-furfurilidênicos (continuação).

Descritores	Programa	Natureza	Descrição
ASA-	Marvin ChemAxon	Estéricos/ geométricos	Superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos com carga parcial negativa
ASAH			Superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos
ASAP			Superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos polares
PSA			Área de superfície polar
MR			Refratividade molar
Pi energy			Energia π dos anéis aromáticos calculados pelo método de Huckel
Dreiding	Marvin ChemAxon	Termodinâmico	Energia calculada para cada estrutura 3D a partir do campo de força <i>Dreiding</i>
RMN C1	Dados experimentais (Palace-Berl et al, 2018)	Espectrométrica	Ressonância magnética nuclear de ^{13}C carbono do átomo C1
RMN H4			Ressonância magnética nuclear de ^1H hidrogênio ligado ao átomo N4
RMN H6			Ressonância magnética nuclear de ^1H hidrogênio ligado ao átomo C6
A1	Hyperchem Professional 8.0	Estrutural	Ângulo de torção da diedral 1 (1C-4N-5N=6C)
A2			Ângulo de torção da diedral 2 (3O-1C-4N-H)
A3			Ângulo de torção da diedral 3 (4N-5N=6C-H)
A4			Ângulo de torção da diedral 4 (4N-5N=6C-8C)
D1			Distância da ligação entre átomo R-1C
D2			Distância da ligação entre átomo 1C-4N
D3			Distância da ligação entre átomo 5N-6C
D4			Distância da ligação entre átomo R-8C
ClogP	Marvin ChemAxon	Topológica	Coeficiente de partição calculado (n-octanol/água)
ClogD2			Coeficiente de partição aparente em diferentes pHs: 2,7 e 10
ClogD7			
ClogD10			

Os ângulos de torção presentes nas diedrais do grupamento N-acilhidrazona e a distância entre as ligações entre os átomos foram calculados com o programa *HyperChem 8.0* (HYPERCUBE, 2008). Foram considerados para o conjunto de descritores os diedros:

(A1) 1C-4N-5N=6C, (A2) 3O-1C-4N-H, (A3) 4N-5N=6C-H e (A4) 4N-5N=6C-8C, assim como as distâncias (d1, d2, d3 e d4), ilustradas na Figura 40. Os ângulos diédricos foram calculados para se observar a planaridade do grupo azometínico em relação à carbonila da porção N-acilhidrazona (HC=N-N-C=O) aos substituintes ligados ao carbono carbonílico. São evidência de planaridade os ângulos diédricos de 180°, dessa forma, os valores das diedrais A1, A2, A3 e A4 obtidos foram próximos de 180° ou 0° para todos os compostos e a nifuroxazida. Além disso, a adição de diferentes substituintes volumosos não afeta a posição espacial da ligação N-acilhidrazona.

Figura 40. Representação dos compostos 5-nitro2-furfurilidênicos.



Descritores representados pelas distâncias (d1, d2, d3 e d4) das ligações entre átomos e ângulos diédricos, A1: 1C-4N-5N=6C (vermelho); A2: 3O-1C-4N-H (azul), A4: 4N-5N=6C-H (verde) e 4N-5N=6C-8C (amarelo).

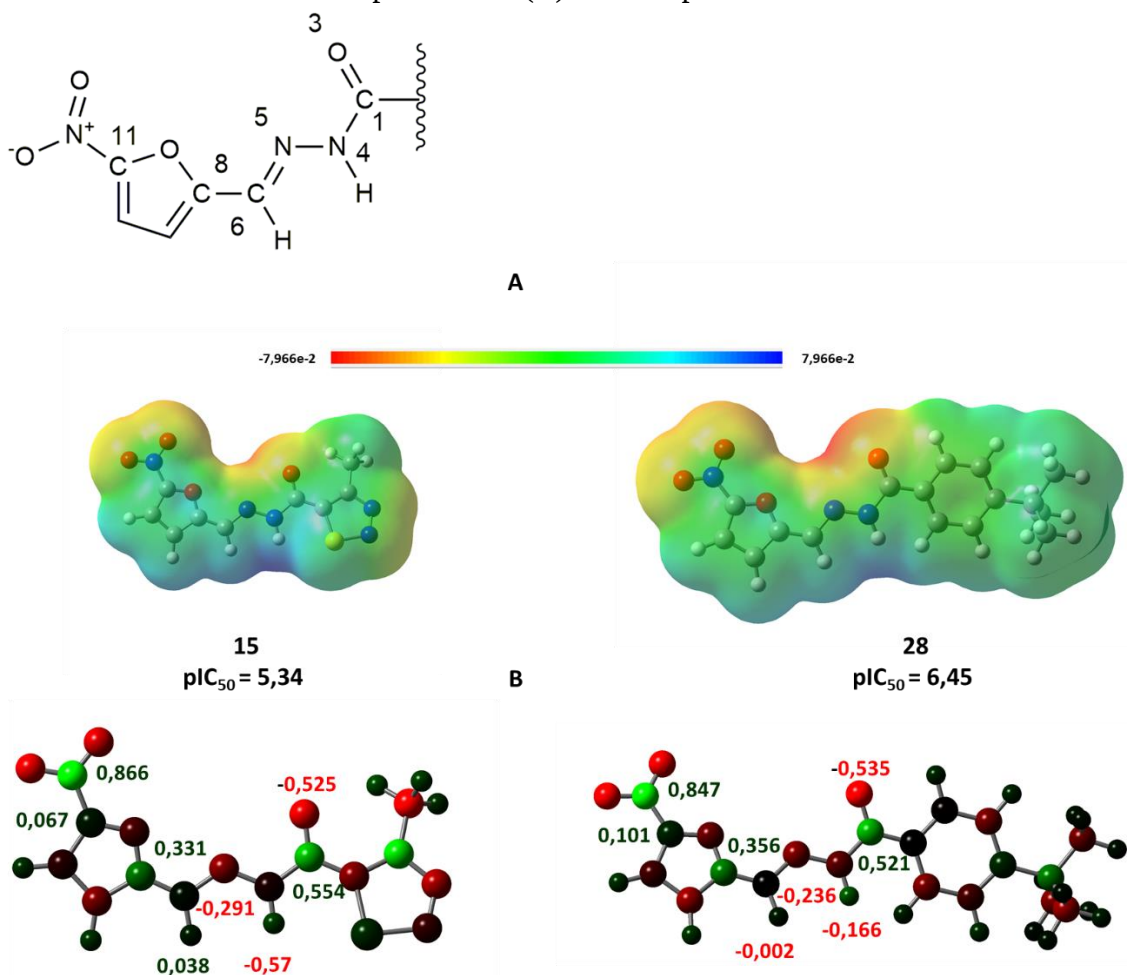
Em relação às cargas CHELPG calculadas, na Figura 41 estão ilustrados os mapas de potencial eletrostático e a representação da distribuição de cargas CHELPG geradas com o auxílio do Gausview 4,1 (DENNINGTON; KEITH; MILLAM, 2007) para os compostos **15**, de atividade moderada, e o **28**, de alta atividade, de acordo com as cargas de potencial eletrostático (CHELPG).

De maneira geral, para o conjunto de compostos estudados, as cargas negativas foram localizadas nos átomos O3, N4 e N5, correspondentes aos átomos do oxigênio carbonílico e nitrogênios da porção N-acilhidrazona, enquanto cargas positivas foram localizadas nos átomos N(NO₂), C11, C8, C6 e C1, indicando que esses átomos estão mais expostos a ataques nucleofílicos. Alguns compostos apresentaram carga negativa no carbono da porção azometínica (-HC=N-R) (Figura 41(B) - distribuição de cargas CHELP para o composto **28**), indicando, nesses compostos, que a posição está mais exposta a ataques eletrofílicos.

O mapa de potencial eletrostático é interpretado a partir do esquema de cores, de maneira que o gradiente representado pelas cores vermelho e azul representam regiões de alta distribuição de densidade eletrônica (mais negativas) e regiões de distribuição

eletrônica mais baixa (mais positivas), respectivamente (programa GaussView 4,1 (DENNINGTON; KEITH; MILLAM, 2007).

Figura 41. Mapas de superfície de potencial eletrostático (A) e distribuição de cargas CHELP por átomos (B) dos compostos **15** e **28**.



Cargas de potencial eletrostático (ESP) CHELPG assim como as superfícies do mapa de potencial eletrostático geradas foram calculadas a partir de cálculos DFT B3LYP/3611G ++ (d,p) no GAUSSIAN 03W e visualizadas com o programa GausView 4,1 (DENNINGTON; KEITH; MILLAM, 2007). A isosuperfície de densidade eletrônica foi determinada para 0,0004 a.u. e os compostos estão representados na forma de bastão. (A) Para o MEP, a coloração dos átomos correspondente a átomos de carbono em cinza, oxigênio em vermelho, hidrogênio em branco e nitrogênio em azul. Diferentes valores de distribuição de densidade eletrônica estão representados por cores diferentes: vermelho representa regiões mais eletronegativas do potencial eletrostático, azul representa regiões positivas e verde representa regiões de potencial eletrostático próximo ao zero (ou nulos). Potencial eletrostático aumenta na seguinte ordem vermelho>laranja>amarelo>verde>azul. (B) Representação da distribuição de cargas CHELP para os átomos O3, N4, N5, N(NO₂), C11, C8, C6 e C1. A coloração dos átomos corresponde ao gradiente de cores vermelho (para cargas negativas) e verde (cargas positivas).

Dados experimentais de deslocamentos químicos foram retirados de publicações prévias do grupo (PALACE-BERL *et al.*, 2015, 2018). Foram considerados como descritores os valores de deslocamentos químicos de ¹³carbono e ¹hidrogênio para o

carbono carbonílico (RMN C1) e hidrogênios ligado ao nitrogênio da ligação imida (H4) e carbono azometínico (C6) (RMN H4 e RMN H6, respectivamente).

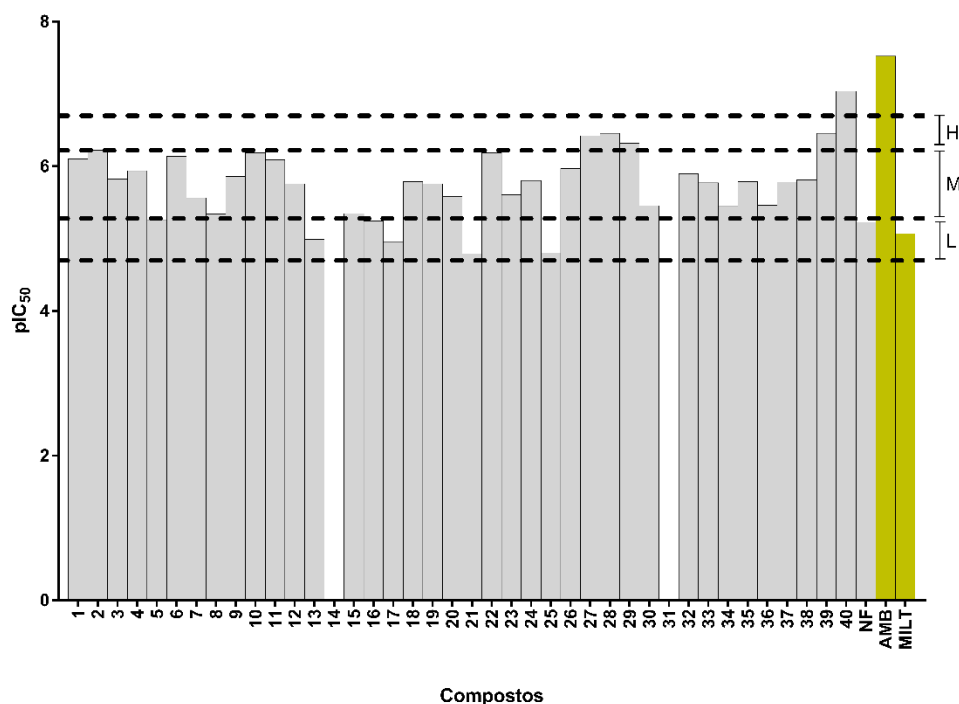
5.11.2 Investigação das relações estrutura/propriedades moleculares-atividade: análise exploratória de dados

1. Filtros utilizados para auxiliar a seleção de variáveis

Uma etapa prévia de seleção de variáveis foi realizada para se eliminar descritores pouco significantes para a atividade biológica estudada. Os valores de atividade biológica transformados em potência de log ($-\log IC_{50}$) pIC_{50} em molar (M) foram utilizados para a seleção de variáveis, análise exploratória por métodos não supervisionados HCA e PCA, assim como para a construção das redes de *activity cliff*. Os dados de pIC_{50} estão disponíveis na Tabela 9 (“Atividade anti-*Leishmania* dos compostos nitro-heterocíclicos, composto protótipo e fármacos de referência contra a forma promastigota da *L. (L) infantum*.”). A Figura 42 mostra o conjunto de compostos classificados quanto à potência da atividade biológica, como de alta (pIC_{50} entre 6,70 e 6,22), moderada (pIC_{50} entre 6,22 e 5,28) e baixa (pIC_{50} entre 5,22 e 4,79) atividade.

Os valores de pIC_{50} para os compostos de maior e menor atividade variaram entre a faixa de 6,70 a 4,79. Para a investigação das relações estrutura/propriedades moleculares e atividade biológica, é importante que o conjunto de compostos tenha diversidade estrutural e consequente variação de valores de atividade biológica. Idealmente, a diferença de ordem de magnitude entre os compostos mais e menos ativos deve ser de duas unidades logarítmicas (ABRAHAM, 2003). O presente conjunto de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos apresentou diferença de 1,9 unidades logarítmicas, o que se deve, provavelmente, à diversidade não muito acentuada dos pontos de modificações estruturais no arcabouço químico comum dos compostos estudados.

Figura 42. Atividade anti-*Leishmania* convertida em pIC_{50} ($-\log IC_{50}$) do conjunto de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos, nifuroxazida, anfotericina B e miltefosina.



AMB: anfotericina B; MILT: miltefosina (MILT) e NF: nifuroxazida. Compostos **14** e **31** não apresentaram valores de atividade biológica para as condições do ensaio, H: compostos com alta atividade contra a forma promastigota; M: compostos com atividade moderada, L: compostos com baixa atividade.

Conforme descrito em Materiais e Métodos, dois filtros foram utilizados para auxiliar a seleção de variáveis que foi considerada para a análise exploratória de dados. Para isso, uma tabela foi gerada contendo oitenta e cinco colunas (variáveis independentes ou descritores e variável dependente ou atividade biológica) e trinta e nove linhas (amostras ou compostos). O objetivo desse processo foi reduzir informações desnecessárias (ruídos) que podem prejudicar a interpretação do resultado da análise.

Calculou-se, inicialmente, o coeficiente de correlação de Pearson (r) entre cada variável independente e a atividade biológica (pIC_{50}). Em seguida, observou-se a tendência de distribuição dos dados por meio da visualização de gráficos de dispersão entre cada descritor calculado e a variável dependente.

O coeficiente de correlação de Pearson é um parâmetro estatístico que representa a correlação linear entre os descritores/propriedades calculados e o dado biológico. Em estudos de avaliação da relação estrutura-atividade sobre séries de compostos, busca-se que as propriedades estruturais calculadas estejam bem correlacionadas com as repostas biológicas (FERREIRA, 2015). Para o conjunto de dados investigado, os descritores que apresentaram valores maiores de correlação com a atividade biológica foram: a área de

superfície polar (*PSA*) ($|r| = 0,37$) (estérico/geométrico); o momento dipolo total (μT) ($|r| = 0,377$) (eletrônico); o número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio ($|r| = 0,3$) (constitucional/intrínseco) e o índice de *Platt* ($|r| = 0,32$) (topológico).

O fato de os descritores apresentarem, em geral, baixa correlação com a variável latente indicaria que, talvez, outro tipo de função, sem ser a linear, ajustaria mais apropriadamente a relação do conjunto de propriedades calculadas com a atividade biológica. Vale ressaltar que a análise exploratória realizada considera somente a função linear para a modelagem dos dados (programa *Pirouette*), o que pode ser apontado como uma limitação do método. No entanto, sabe-se que modelos mais simples e lineares são mais facilmente interpretados tanto no aspecto químico como biológico.

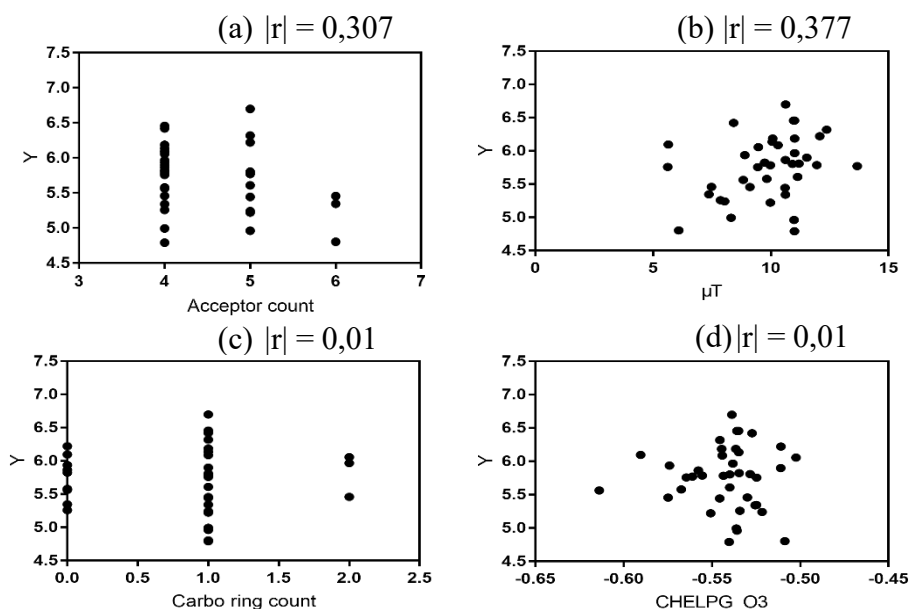
Kiralki e Ferreira (2010) determinaram um critério de avaliação para a qualidade dos descritores em análises de relações entre estrutura química e atividade biológica (REA). Propriedades moleculares que apresentam valor de coeficiente de correlação de Pearson $|r| > 0,3$ podem ser consideradas como variáveis independentes estatisticamente significantes. Considerando-se as limitações do conjunto de dados estudado, o descritor com maior correlação apresentou valor máximo de $|r| = 0,377$, um corte foi aplicado, eliminando-se os descritores que apresentaram valores de correlação menores que 0,25, mesmo com dispersão considerada apropriada.

O segundo filtro de seleção de variáveis consistiu da observação visual da distribuição de cada descritor em relação à variável dependente, por meio da visualização dos gráficos de dispersão descritor *versus* AB. Descritores que apresentaram pouca dispersão (variabilidade) dos dados foram eliminados, já que não são capazes de distinguir adequadamente o conjunto de compostos, mesmo que apresentem alto coeficiente de correlação. A Figura 43 demonstra o exemplo de diferentes perfis de distribuição e descritores bem e mal correlacionados com a variável dependente, AB.

Os dados obtidos foram também comparados com os resultados descritos por Palace-Berl (2018), do mesmo grupo de pesquisa, com o objetivo de checar quais descritores se apresentaram como significantes para a atividade biológica e quais foram as diferenças apresentadas entre o conjunto de compostos 5-nito-2-furfulidênicos para as atividades anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Leishmania*. Para as atividades anti-*T. cruzi* (conjunto T), as propriedades moleculares (descritores) que apresentaram maior correlação com a atividade biológica foram aquelas de caráter hidrofóbico, *ClogD10* ($|r| = 0,76$), *ClogD7* ($|r| = 0,7$) e *ClogP* ($|r| = 0,7$); de natureza estereoquímica, *ASAH* ($|r| =$

0,71) e *vdWR* ($|r| = 0,63$) e de caráter topológico, o índice de *Platt* ($|r| = 0,62$) e *Randic* ($|r| = 0,62$).

Figura 43. Gráficos de dispersão dos descritores moleculares: *acceptor count* (a), momento dipolo total (b), *carbo ring count* (c) e CHELPG O3 (d) versus atividade biológica anti-*Leishmania* contra a forma promastigota de *L. (L.) infantum*.



- (a) Número de aceptadores de ligação hidrogênio: descritor com correlação alta e distribuição pobre.
 (b) Momento de dipolo total: descritor com alta correlação e com boa distribuição/dispersão. (c) Número de carbonos em anel: descritor com baixa correlação e distribuição pobre. (d) Cargas parciais de potencial eletrostático: descritor com boa distribuição, apesar da baixa correlação.
 Valores de coeficiente de correlação de Pearson ($|r|$).

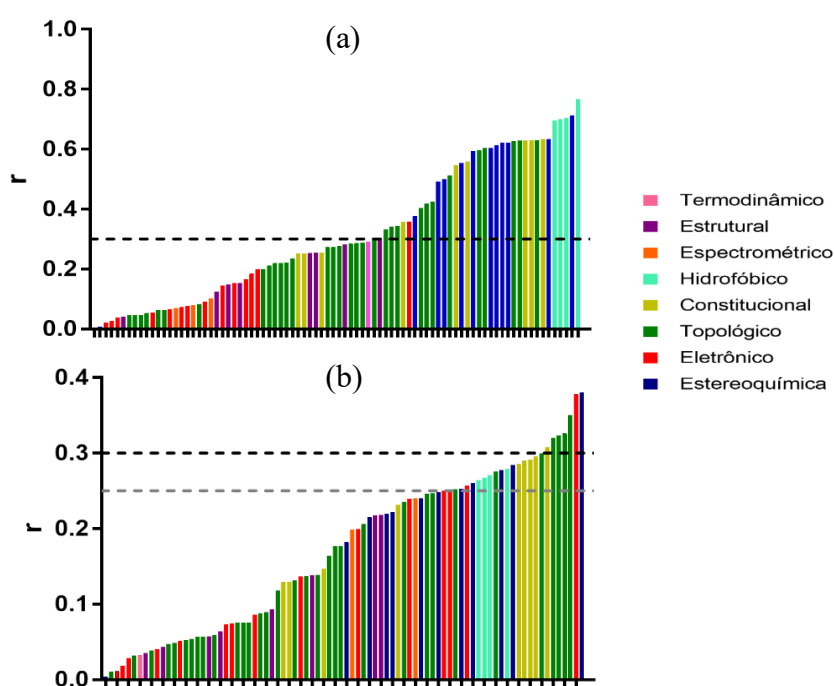
Os dados obtidos foram também comparados com os resultados descritos por Palace-Berl (2018), do mesmo grupo de pesquisa, com o objetivo de checar quais descritores se apresentaram como significantes para a atividade biológica e quais foram as diferenças apresentadas entre o conjunto de compostos 5-nito-2-furfulidênicos para as atividades anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Leishmania*. Para as atividades anti-*T. cruzi* (conjunto T), as propriedades moleculares (descritores) que apresentaram maior correlação com a atividade biológica foram aquelas de caráter hidrofóbico, *ClogD10* ($|r| = 0,76$), *ClogD7* ($|r| = 0,7$) e *ClogP* ($|r| = 0,7$); de natureza estereoquímica, *ASAH* ($|r| = 0,71$) e *vdWR* ($|r| = 0,63$) e de caráter topológico, o índice de *Platt* ($|r| = 0,62$) e *Randic* ($|r| = 0,62$).

Os descritores significantes para o conjunto T são em geral relacionados ao volume e à hidrofobicidade dos compostos e apresentam tendência linear em relação à

atividade biológica. Compostos com substituintes bifenil (35) e os 4-benzeno substituídos de maior lipofilicidade (40, 39 e 37) se mostraram como os mais ativos. Comparativamente, apesar de apresentar notavelmente menor correlação com a atividade biológica anti-*Leishmania*, o conjunto L demonstrou que, como já mencionado, os descritores eletrônicos (*momento dipolo total*) e estereoquímicos (*PSA*) foram os mais significantes para a atividade biológica. Adicionalmente, semelhante ao conjunto T, os descritores relacionados à conectividade dos compostos como as propriedades topológicas (índice de *Platt*, *Hyper Wiener* e *fsp³*) também se mostraram como significativos para a atividade biológica (Figura 44).

Os valores absolutos dos coeficientes de correlação de Pearson, bem como os respectivos gráficos de dispersão estão disponíveis no material anexo (ANEXO 11 – Valores absolutos de coeficiente de correlação de Pearson para o conjunto T e L, e ANEXO 10 - Gráficos de dispersão dos descritores moleculares calculados *versus* atividade biológica - pIC₅₀).

Figura 44. Correlação dos descritores calculados em relação à atividade biológica anti-*T. cruzi* (a) (PALACE-BERL *et al.*, 2018) e anti-*Leishmania* (b).



Linha preta pontilhada indica variáveis independentes que apresentaram valor maior que o *cut-off* de 0,3 (preta) e 0,25 (cinza) (KIRALJ; FERREIRA, 2010).

As características relacionadas ao caráter hidrofóbico para o conjunto L não demonstram o mesmo nível de correlação com a atividade biológica, mas refletiram sua importância quando se observa o efeito biológico estudado. Os compostos que se

apresentaram como de maior atividade foram os 4-benzenos substituídos, **40** [$\text{C}_6\text{H}_4\text{-4-OC}_7\text{H}_{15}$], **39** [$\text{C}_6\text{H}_4\text{-4-C}_7\text{H}_{15}$], **29** [$\text{C}_6\text{H}_4\text{-4-OC}_3\text{H}_7$], **28** [$\text{C}_6\text{H}_4\text{-4-tert-C}_4\text{H}_9$] e **27** [$\text{C}_6\text{H}_4\text{-4-C}_4\text{H}_9$]. Consequentemente, os modelos gerados com a análise exploratória de dados, como não consideram a variável dependente (AB) na modelagem dos dados, não devem apresentar o mesmo perfil de discriminação/separação dos dados, mas provavelmente as propriedades relevantes à resposta biológica (AB) devem, em geral, ser as mesmas, salvo as diferenças inerentes à especificidade de cada parasita.

O conjunto L mostrou como diferença significativa, os efeitos das características eletrônicas para a atividade biológica contra *Leishmania*. O momento dipolo é decorrente da separação de cargas, em ligações iônicas ou covalentes, proveniente de diferença de eletronegatividade entre os átomos de uma molécula (CLAYDEN; NICK; STUART, 2012). Diferenças significantes no valor do momento de dipolo podem provocar a polarização da molécula, de modo a gerar potencial suficiente para formação de ligações e influenciar a eficácia do efeito biológico estudado. Mansour e colaboradores (2014) demonstraram os efeitos bactericidas da nifuroxazida complexada com paládio, platina e rutênio e realizaram estudos quânticos e eletroquímicos buscando compreender como as estruturas eletrônicas dos complexos se relacionavam à atividade biológica. Foi observado que, para os complexos estudados, as propriedades eletrônicas de momento de dipolo e energia de LUMO foram mais significantes para a atividade biológica (MANSOUR, 2014).

Para os compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos foi observado que os valores do momento dipolar elétrico no eixo z foram mais baixos em relação aos outros eixos, indicando que as principais cargas negativas e positivas estão na orientação X-Y. Barrientos-Salcedo e colaboradores (2018) realizaram estudos computacionais com fármacos derivados de 5-nitrofuranos (nifurtimox, nitrofurantoína, nifuratel, nifuradeno, furadroxil, nifurfolina, furazolidona e nifurtoinol) e perceberam o mesmo padrão de distribuição do momento dipolo em todas as moléculas, sugerindo que o efeito indutivo causado pela influência dos grupos retiradores de elétrons do grupamento nitro é mais forte que os demais grupos substituintes presentes nas moléculas investigadas. A competição entre o grupamento nitro e os substituintes resultaram em rigidez e planaridade dos arcabouços químicos (BARRIENTOS-SALCEDO; ESPINOZA; SORIANO-CORREA, 2018).

2. Análise exploratória de dados

Após a etapa de aplicação dos filtros para a seleção de variáveis, a tabela final foi utilizada como entrada para a realização das metodologias de análise exploratória de dados (PCA e HCA). A matriz final foi composta por trinta e nove linhas e vinte e três colunas. Os métodos de reconhecimento de padrões são indicados, por exemplo, para extrair informações relevantes, relacionadas às características químicas (estrutura química/propriedades moleculares), como a identificação dos parâmetros e propriedades moleculares que influenciam a resposta biológica. O pré-processamento de dados utilizado foi o autoescalamento, devido às diferenças em ordem de magnitude das propriedades calculadas. As análises de PCA e HCA foram realizadas utilizando o programa Pirouette 3.11 (Pirouette 3.11, Infometrix Inc, 1990-2003, Woodinville).

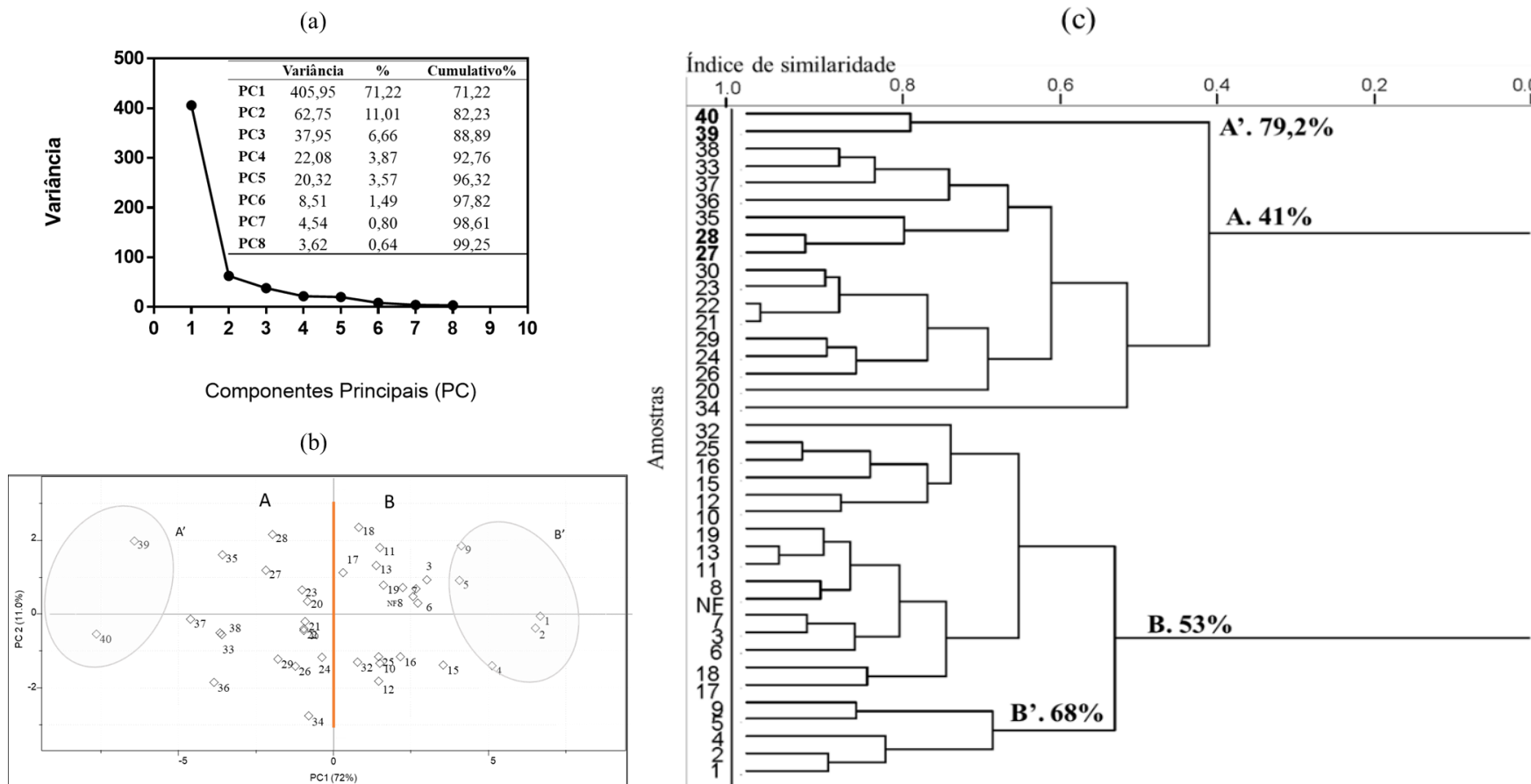
Método não supervisionado de análise de componentes principais, PCA, busca reduzir a dimensionalidade dos dados, sem que as relações entre as amostras sejam perdidas, além de salientar a discriminação de informações importantes em relação ao conjunto de dados. A projeção dos dados originais ocorre em um espaço de dimensão menor, de forma ortogonal, gerando um novo conjunto de variáveis, as componentes principais (PC) (JOLLIFFE; CADIMA, 2016). Complementarmente, a análise de agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA) busca reconhecer padrões por meio do agrupamento por similaridade e dissimilaridade das amostras, de forma que, dentro dos grupamentos, as amostras sejam ao máximo semelhantes e entre os grupos sejam ao máximo heterogêneas (FERNANDES *et al.*, 2015).

De acordo com o modelo final de PCA, as duas primeiras componentes principais, ou fatores, descrevem 82 % dos dados da variância total dos dados originais, com 71% em PC1 e 11% em PC2 (Figura 45(a), gráfico de seleção de fatores ou PCs ou variáveis latentes). Os descritores (propriedades moleculares) que mais influenciaram a separação dos compostos em PC1 e PC2 estão dispostos na tabela de pesos (*loadings*) - Tabela 21. Os valores absolutos de pesos em PC1 variaram de 0,25 a 0,29. Os descritores com maiores valores, em módulo, foram as propriedades topológicas (*Platt*, *Randic*, *Hyper Wiener* e *fsp3*), de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (*ClogD2*, *ClogD7* e *ClogD10*), estéricas (*ASAH*, *PSA* e *avdW*) e constitucionais, ou intrínsecas (*nº de átomos*, *nº de ligações* e *nº de átomos em cadeia*). Em PC2, os descritores eletrônicos *gap* e *CHELPGC11* apresentaram os maiores valores absolutos de peso 0,69 e 0,63, respectivamente, e foram os que apresentaram maior influência na separação dos compostos.

Tabela 21. Tabela de pesos (*loadings*) da análise de PC. Em destaque, descritores com altos valores de peso nas duas primeiras componentes principais, PC1 e PC2.

Descritores	PC1	PC2
Platt	0,292	0,062
Randic	0,292	0,062
Hyper Wiener	0,295	0,077
Fsp3	0,294	0,078
Nº ligação	-0,211	0,025
Chain atom nº	-0,291	-0,007
ASAH	-0,275	0,149
PSA	0,249	-0,103
avdW	0,257	-0,185
Atom nº	0,284	0,118
logD2	-0,296	-0,057
logD7	0,252	-0,087
logD10	0,285	-0,055
Gap	-0,049	0,695
CHELPG_C11	0,089	0,634

Figura 45. Resultados da PCA [(a) Gráfico de seleção de fatores ou PCs e (b) Gráfico de escores para os fatores 1 e 2] e dendrograma de amostras (n = 39) do método HCA.



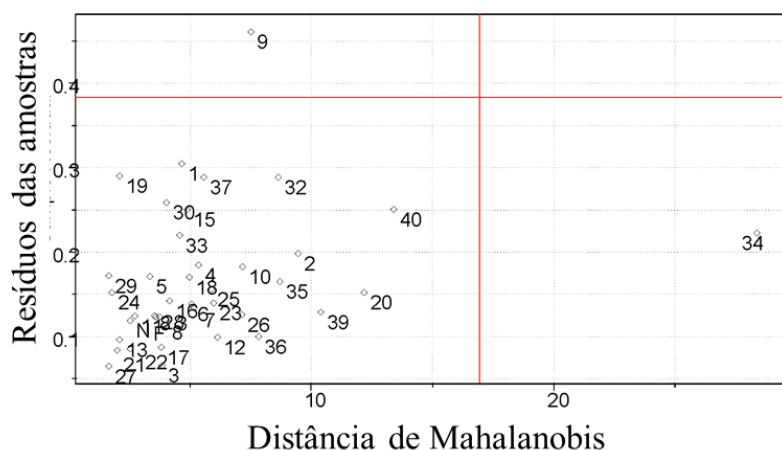
Compostos foram agrupados em dois grupos: A (IS: 41%), compostos mais volumosos e hidrofóbicos e B (IS: 53%), compostos menos volumosos com substituintes heterocíclicos, alifáticos.

O gráfico de escores (Figura 45b) revela que as duas primeiras PCs dividem as amostras em dois grupos principais, apresentados como A e B. Complementarmente, os resultados de HCA (Figura 45c) também dividem o conjunto de compostos em dois grupos. Compostos que apresentaram maior atividade em relação à forma promastigota do parasita foram agrupados no grupo A (compostos **40**, **39**, **28**, **27** e **29**). Devido às limitações do método, a discriminação dos conjuntos de compostos em grupos mais distintamente separados não foi obtida, porém se mostrou como suficiente para interpretação das propriedades estruturais que influenciam a atividade anti-*Leishmania* dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.

Em relação ao dendrograma resultante da análise de HCA (Figura 45c), os resultados complementares reforçam o critério de separação dos compostos, em que, para o grupo A (índice de similaridade de 41%), estão agrupados os análogos 4-benzeno substituídos que apresentam substituintes volumosos. Os compostos de maior atividade (**40** e **39**) foram agrupados no subgrupo A' com 79,2% de similaridade. Foram agrupados no *cluster* B (índice de similaridade de 53%) os compostos que apresentaram substituintes 4-benzeno substituídos de menor caráter hidrofóbico, inclusive os análogos de menor atividade: **13**, **17**, **21** e **25**, além dos derivados heterocíclicos, alquil e cicloalquila. Mais especificamente, no subgrupo B' (68% de similaridade), os compostos alquil (**1**, **2**, **4**) e heterocíclicos (**5** e **9**) foram agrupados. Os compostos **20** [C₈H₁₇] e **26** [2-naftaleno] foram posicionados no *cluster* A, provavelmente devido ao volume e à hidrofobicidade dos grupamentos octano e naftaleno, respectivamente.

O diagnóstico de *outliers* considera um intervalo de 95% de confiança, ajustado internamente no programa Pirouette 3.11. Para serem considerados como potenciais amostras atípicas, os compostos devem cair além da intersecção das duas linhas limítrofes do gráfico. O gráfico de resíduos das amostras *versus* distância de Mahalanobis mostra que a maioria dos compostos permaneceram dentro das linhas limítrofes e, portanto, as variáveis/propriedades moleculares calculadas foram suficientes para descrever o conjunto de dados investigado.

Apesar de os compostos **34** [-C₆H₄-4-OC₄H₉] e **9** [2-tiofeno] estarem fora das linhas limítrofes, eles não ultrapassaram a intersecção das duas linhas e, portanto, somente com a análise exploratória, não se teria consistência para afirmar que estes compostos poderiam ser classificados como amostras atípicas (Figura 46). Os dois compostos estão no gradiente de atividade moderada.

Figura 46. Gráfico da distância de Mahalanobis *versus* resíduos das amostras.

Linhas limítrofes (vermelho) representam o limite de confiança de 95 %
(Pirouette 3.11, Infometrix, Lt (2003)).

A análise exploratória de dados foi capaz de identificar a importância das características ligadas ao potencial hidrofóbico dos compostos e os resultados foram semelhantes aos estudos realizados em trabalhos prévios do grupo para os compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos. Os descritores que se mostraram como mais importantes no processo de separação em relação à atividade biológica anti-*T. cruzi* foram relacionados a características topológicas, hidrofóbicas (*ClogP*), estéricas (refratividade molar), constitucionais (n. átomos e massa molar) e eletrônico (CHELPG do carbono 5 do anel furano).

Os descritores com maiores valores de peso foram as propriedades eletrônicas *gap* e *CHELPGC11*. O descritor *gap* corresponde à diferença de energia entre os orbitais de energia HOMO e LUMO (em kcal/mol) e designa o quanto os grupos funcionais de uma molécula são reativos, isto é, indica a capacidade de participar de reações de transferência de carga (grupos aceptores ou doadores de elétrons). A carga de potencial eletrostático (CHELPG) destacada pelo modelo de PCA corresponde à do carbono 5 do anel furano, região em que o grupo nitro está conectada.

Os mapas de potencial eletrostático (MPE) dos compostos 4-benzeno substituídos que apresentaram atividade alta (40), baixa (25) e moderada (nifuroxazida) foram gerados com o auxílio do programa *GaussView* 4.1. As respectivas propriedades eletrônicas, *gap* e *CHELPGC11*, que foram denotadas como significantes pela PCA, e o momento dipolo total para cada molécula estão destacados na Figura 47 (A). É possível observar que, para

o composto de maior atividade (**40**), o substituinte 4-heptoxi garante à molécula menor *gap*.

Tal fenômeno acontece com o aumento do tamanho dos substituintes de cadeia longa ligados ao arcabouço químico, em geral ocorre um aumento da energia de HOMO e diminuição da energia de LUMO, resultando em consequente diminuição do valor de *gap*. Essa tendência indica que os substituintes de cadeia longa dificultam os elétrons em HOMO de se distribuírem por toda molécula, mas, por outro lado, tornam mais fácil para eles se excitarem para o nível LUMO de energia. O mesmo comportamento foi observado por Huang e colaboradores (2017), ao estudar a influência das energias HOMO/LUMO e *gap* em sistemas de moléculas que apresentam repetição de sistemas conjugados (monômeros, dímeros etc.) em sua estrutura, a partir de estudos utilizando cálculos de teoria funcional de densidade (DFT – *Density functional theory*) (HUANG *et al.*, 2017).

Menor energia em *gap* resulta em consequente maior reatividade, além de maior momento dipolar, portanto a estrutura se encontra mais polarizada e passível de formar ligações. Tais características se correlacionam com as propriedades de pró-fármacos dessa classe de compostos, pois é necessário que eles sejam metabolizados por proteínas e que os metabólitos gerados proporcionem o efeito biológico esperado (HALL; BOT; WILKINSON, 2011; SERAFIM; PERNICHELLE; FERREIRA, 2017). Para tal, é importante que os derivados nitrofurano estejam propensos a reações dentro do organismo do parasita.

A interpretação dos MPE é realizada por meio de esquema de cores, em que os limites do gradiente de cores são representados pelas cores vermelho (regiões de alta distribuição de densidade eletrônica; mais negativas) e azul (regiões de distribuição eletrônica mais baixa; mais positivas), determinadas pelo programa GausView 4.1 (DENNINGTON; KEITH; MILLAM, 2007). Observa-se, nos mapas gerados, que a região de maior densidade eletrônica (vermelha) está concentrada na porção 5-nitrofurano, próxima ao grupo nitro, e na ligação N-acilhidrazona, próximo ao carbono carbonílico, das moléculas dos compostos estudados.

Para o composto **40** e nifuroxazida, essa região apresenta coloração mais intensa e isso indica que a densidade eletrônica é maior em comparação ao composto de menor atividade (25). Considerando-se as cargas CHELPG referentes ao carbono 2 (CHELPGC8) e carbono 5 (CHELPGC11) do anel furano, é possível observar que o composto **40** apresenta valores mais positivos de energia para o carbono 2 (0,372) e menos positivos para o carbono 5 (0,067), em comparação com a nifuroxazida (CHELPG

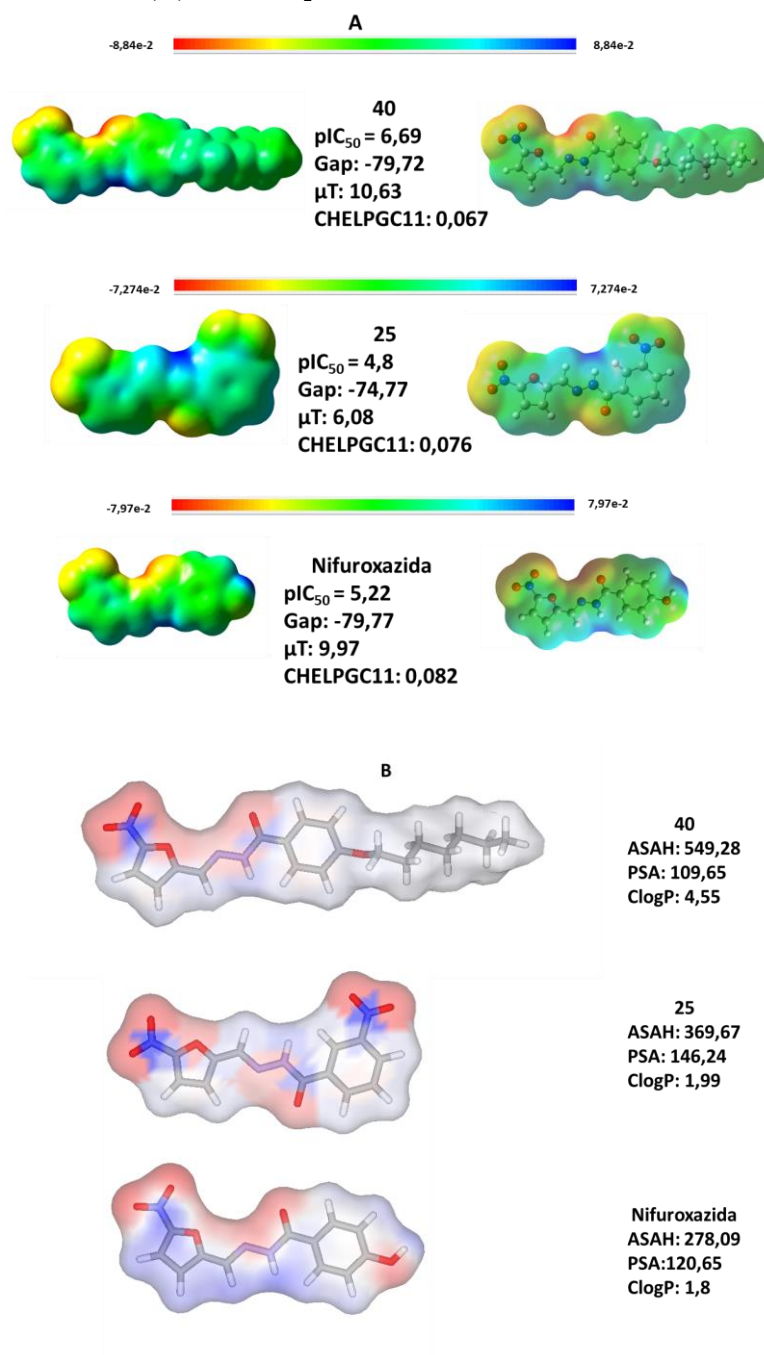
carbono 2: 0,348/ carbono 5: 0,082) e composto **25** (CHELPG carbono 2: 0,261/ carbono 5: 0,076).

As propriedades moleculares estabelecidas como importantes pelo modelo de PCA, além dos índices conectivos de topologia (*Platt, Randic, H, Wiener*), foram as de natureza estérica/geométrica (área de superfície polar – PSA e superfície acessível ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos - ASAH) e de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (ClogP e ClogD2). O coeficiente de partição aparente em faixa de pH ácida apresentou significância no peso da PC1 e, apesar de não estar incluído nos parâmetros dos ensaios biológicos realizados contra formas promastigotas, pode indicar a importância do caráter lipofílico das moléculas na faixa de pH correspondente ao ambiente ácido dos vacúolos digestivos dos macrófagos em que o parasita reside quando presente no ser humano.

As propriedades lipofílicas são amplamente utilizadas em estudos de SAR, já que estão relacionadas à capacidade dos compostos de se difundir através de barreiras biológicas, como membranas plasmáticas, barreiras hematoencefálica, entre outras, para alcançar o alvo biológico, estabelecer a interação em nível molecular e, assim, promover o efeito desejado (PATRICK, 2013). A ação anti-*T. cruzi* dos compostos 5-nitrofuranos vêm sendo associada aos descritores hidrofóbicos em estudos prévios (ISHII *et al.*, 2011; JORGE *et al.*, 2012; PALACE-BERL *et al.*, 2018).

A superfície de acessibilidade ao solvente foi calculada com o programa *ViewerLite* 5.0, utilizando raio de 1,4 Å de uma molécula de água como sonda (Figura 47 B). O composto **40**, assim como os outros compostos de alta atividade, apresenta maiores valores dos descritores de ASAH e ClogP do que os demais compostos, o que corrobora com a tendência das propriedades ligadas ao volume e à hidrofobicidade dos compostos serem significantes para a atividade biológica, não só anti-*T. cruzi*, mas também anti-*Leishmania*.

Figura 47. Mapas de superfície de potencial eletrostático (A) e superfície acessível ao solvente (B) dos compostos **40**, **25** e nifuroxazida.



Os compostos estão representados na forma de bastão e coloração correspondente a átomos de carbono em cinza, oxigênio em vermelho, hidrogênio em branco e nitrogênio em azul. (A) Momento dipolar total (μT), gap , carga de potencial eletrostático (ESP) CHELPG do carbono 5 do anel furano, assim como as superfícies do mapa de potencial eletrostático geradas foram calculados a partir de cálculos DFT B3LYP/3611G ++ (d, p) no GAUSSIAN 03W. A isosuperfície de densidade eletrônica foi determinada para 0,0004 a.u. Diferentes valores de distribuição de densidade eletrônica estão representados por cores diferentes: vermelho representa regiões mais eletronegativas do potencial eletrostático, azul representa regiões positivas e verde representa regiões de potencial eletrostático próximo ao zero (ou nulos). Potencial eletrostático aumenta na seguinte ordem vermelho>laranja>amarelo>verde>azul. (B) A superfície acessível ao solvente (ASA) foi visualizada com o programa ViewerLite 5.0 (raio de 1,4 Å, água).

5.11.3 Activity Cliff

Para as análises das redes de *Activity Cliff* (AC), foram considerados os compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com atividade anti-*Leishmania* contra as formas promastigotas de *L. (L.) infantum*. O índice SALI (*structure activity landscape*), utilizado para construir a rede de *activity cliffs*, foi calculado utilizando o coeficiente de similaridade de Tanimoto (BAJUSZ; RÁCZ; HÉBERGER, 2015), para cada par de moléculas do conjunto de dados. O coeficiente de Tanimoto foi calculado de modo que não houvesse repetição entre os pares de moléculas com auxílio de um *shell script* (ANEXO 12 – Script utilizado para cálculo do coeficiente de Tanimoto). Os valores de SALI para cada par de compostos foram obtidos através da Equação 11 (vide tópico 4.10.4 “Identificação dos *activity cliffs* dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com atividade contra a *L. (L.) infantum*”).

Inicialmente, um mapa de similaridade estrutura-atividade (SAS – *structure-activity similarity maps*) foi construído, a fim de permitir a rápida visualização gráfica da integração da representação das relações de similaridade estrutural com a potência biológica do conjunto de compostos. O mapa baseia-se na comparação, em pares, de todas as moléculas do conjunto de dados, plotando os valores da diferença das potências biológicas de cada par de moléculas *versus* os respectivos valores de similaridades de Tanimoto.

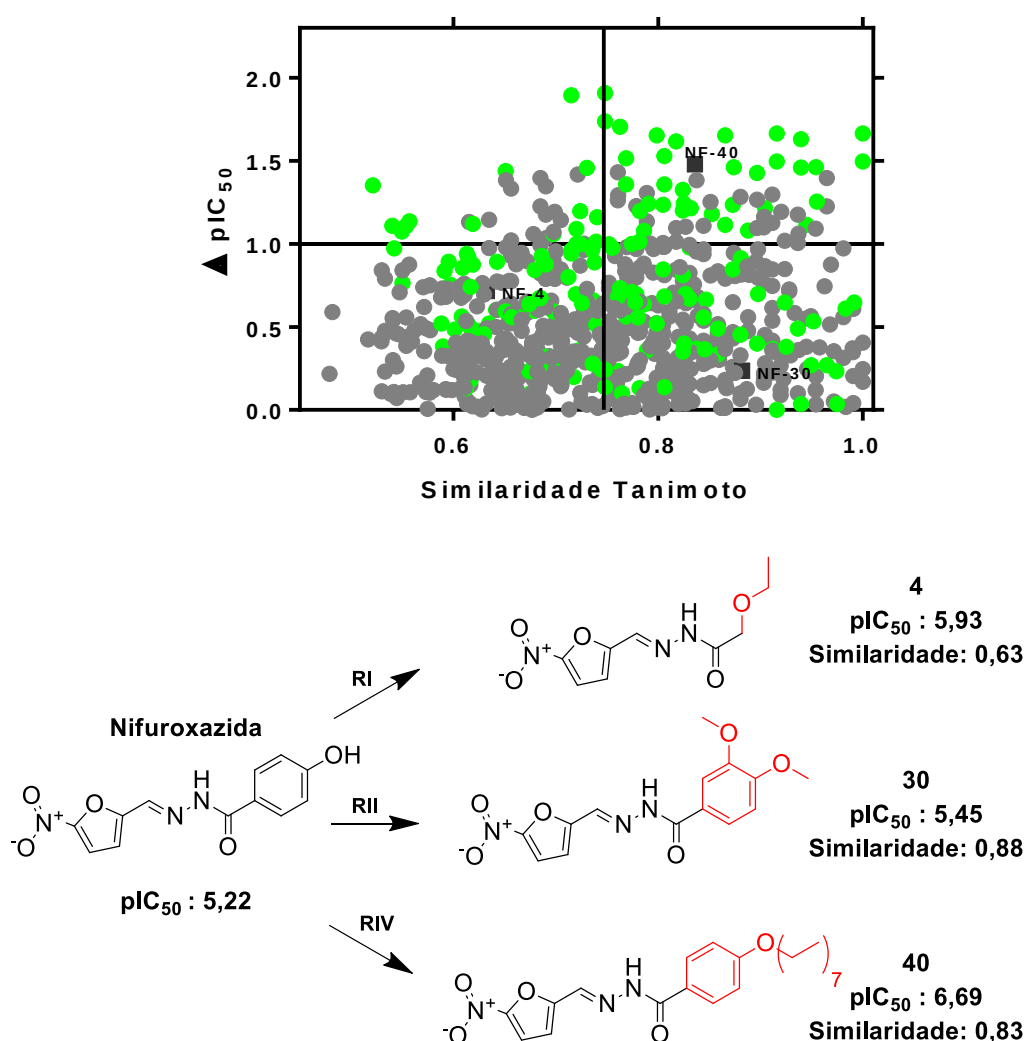
Os valores correspondentes à diferença das potências biológicas (ΔpIC_{50}) foram calculadas como a diferença absoluta entre os valores de atividade biológica entre cada par de compostos analisados pela seguinte equação: $|\Delta pIC_{50_{i,j}}| = pIC_{50_i} - pIC_{50_j}$, em que pIC_{50_i} e pIC_{50_j} são os valores de atividade biológica em potência de log ($-\log IC_{50}$) correspondente às i-ésimas e j-ésimas moléculas ($i > j$) do conjunto de compostos.

A Figura 48 ilustra o mapa SAS gerado para o conjunto de 39 compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com atividade contra *L. (L.) infantum*, em que os valores de similaridade de Tanimoto e diferença da atividade biológica estão representadas nos eixos x e y, respectivamente. Cada ponto demonstrado no gráfico representa um par de moléculas, totalizando 741 pares analisados. Adicionalmente, foram considerados como mais relevantes para a análise de SAR os compostos que demonstraram perfil de atividade biológica alta em relação à atividade anti-*Leishmania* contra as formas promastigotas da *L. (L.) infantum*. Dessa forma, foram considerados os pares que incluem os compostos que apresentaram valores de pIC_{50} entre 6,70 e 6,22, isto é, os compostos **40** [$-C_6H_4-4-OC_7H_{15}$] (IC_{50} : $0,2 \pm 0,019 \mu M$ / pIC_{50} : 6,69), **39** [$-C_6H_4-4-C_7H_{15}$] (IC_{50} : $0,35 \pm 0,008 \mu M$ /

pIC_{50} : 6,45), **28** (IC_{50} : $0,35 \pm 0,04 \mu M$ / pIC_{50} : 6,42) e **27** [$C_6H_4-4-C_4H_9$] (IC_{50} : $0,38 \pm 0,012 \mu M$ / pIC_{50} : 6,42).

Para a interpretação do mapa SAS, foram delimitados limites (*thresholds*) ao longo dos eixos x e y. Dessa forma, o limite no eixo x foi definido a partir da média dos valores de similaridade do conjunto de dados e para o eixo y um limite de diferença de potência de uma unidade de log foi escolhida (GONZÁLEZ-MEDINA; MÉNDEZ-LUCIO; MEDINA-FRANCO, 2017; MEDINA-FRANCO et al., 2009; PÉREZ-VILLANUEVA et al., 2015).

Figura 48. Mapa de similaridade estrutura-atividade do conjunto de compostos ativos contra a forma promastigota de *L. (L.) infantum*.



Cada ponto corresponde à análise de um par do total de moléculas analisadas, totalizando 741 pares. Os pontos em verde correspondem aos pares com compostos de alta atividade biológica (141 pontos). Em destaque (preto), os pares de compostos NF-40; NF-4 e NF-30. As estruturas químicas, valores de atividade biológicas (pIC_{50}) e similaridade de Tanimoto estão mostrados.

A figura 48 demonstra, ainda, três pares de compostos selecionados de cada região de interesse do mapa SAS, a fim da realização de uma interpretação qualitativa do mapa. A região III se apresenta como de menor interessante para explorar o SAR de um conjunto de dados porque os pares encontrados nessa área correspondem a moléculas com grande diferença estrutural e alta diferença de atividade, e por isso não foi explorada (MEDINA-FRANCO, 2012; PÉREZ-VILLANUEVA et al., 2015).

Para as demais regiões de interesse, foram selecionados pares de moléculas a fim de visualizar os fenômenos descritos pelo mapa SAS. Inicialmente, deve-se notar que para o conjunto de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos estudados, as diferenças estruturais são observadas somente relacionadas aos diferentes substituintes. Dessa forma, pode-se observar, por exemplo, a presença de AC nos pares encontrados na região III, como o par formado pela nifuroxazida [-C₆H₄-4-OH]) (pIC₅₀: 5,22) e composto **40** [-C₆H₄-4-OC₇H₁₅]) (pIC₅₀: 6,69), que demonstram alta diferença de atividade biológica e grande similaridade estrutural. O par composto pela NF e composto **30** [-C₆H₄-3,4-OH]) (pIC₅₀: 5,45) é encontrado na região II, em que as moléculas são similares e apresentam pequena diferença de valores de potência biológica. E por fim, o par NF e composto **4** [-OC₂H₅]) (pIC₅₀: 5,93), encontrado na região I em que moléculas com baixa similaridade apresentam pequena diferença na atividade biológica (*scaffold/ R hopping*).

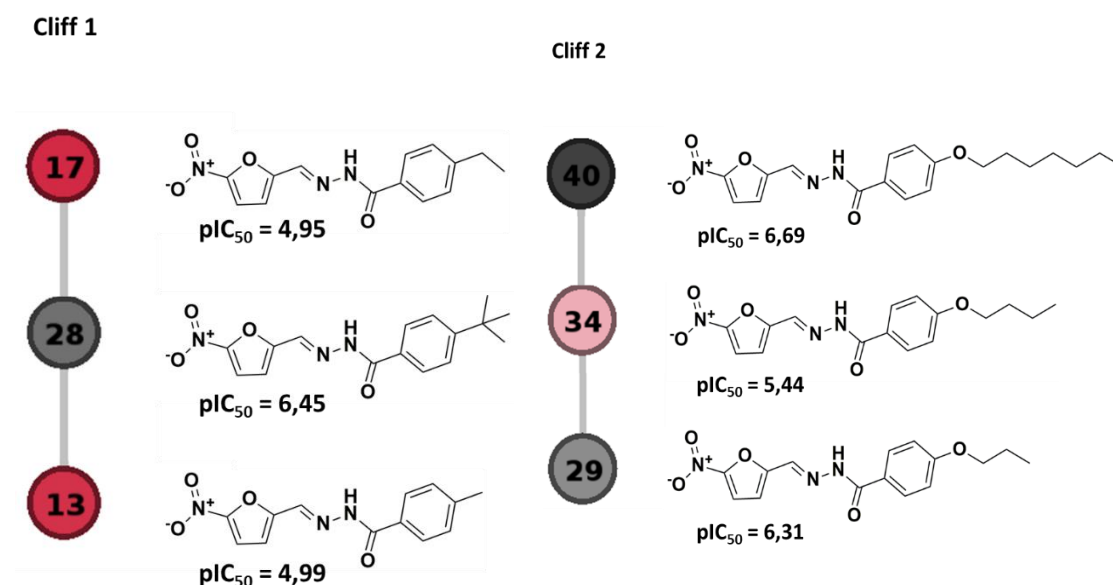
Além disso, os AC's mais relevantes dentro do conjunto de compostos estudados foram também analisados. Para tal, o conjunto de compostos e os respectivos índices SALI foram representados em forma de gráficos de similaridade em rede (*network similarity graph*) (WAWER et al., 2008), a partir do algoritmo de agrupamento linear *Force Atlas 2* (JACOMY et al., 2014) embutido no programa Gephi (BASTIAN; HEYMANN; JACOMY, 2009). O programa utiliza as informações calculadas e as traduz em informação gráfica. O gráfico resultante está representado de forma que cada “nó” corresponde a uma molécula e cada aresta corresponde à relação de similaridade (SALI) entre as moléculas.

A partir da similaridade 2D, foram identificados dois grupos de *activity cliff* dentro do conjunto de compostos, demonstrados na Figura 49. Os grupos encontrados foram o *cliff 1*, formado pelos compostos **17**, **18** e **13** e o *cliff 2*, formado pelos compostos **40**, **34** e **39**. Os *cliffs* foram identificados a partir de um corte aplicado aos pesos das arestas (“*Edge Weight Filters*”) em relação ao valor máximo, de modo a auxiliar a visualização

dos AC mais significantes (30% e 50%). As moléculas representadas em preto representam maior valor de pIC_{50} e as em vermelho, menor atividade.

Os AC permitem a observação de modificações estruturais presentes nas moléculas que resultaram em grande diferença no efeito biológico, auxiliando, também, a interpretação geral das relações estrutura-atividade (SAR), a partir da observação dos pares de compostos que foram relacionados entre si com base na similaridade. Os compostos 4-benzeno substituídos, **28** (tert-butil) de alta atividade biológica e compostos **13** [$C_6H_4-4-CH_3$] e **17** [$C_6H_4-4-C_2H_5$] de baixa atividade, formaram o *cliff* 1. É possível constatar que o substituinte alifático de cadeia aberta, a partir de 4 carbonos, contribui significativamente para a atividade biológica. O *cliff* 2 mostrou a influência dos substituintes oxi à cadeia alifática, em que o grupamento heptoxi (**40**) e propoxi (**29**) conferem aumento na atividade, ao contrário do grupo butoxi.

Figura 49. Grupos dos principais *activity cliffs* formados a partir da similaridade 2D para o conjunto de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.



Cada nó corresponde a uma molécula e cada aresta a um AC. As moléculas mais ativas estão em preto, enquanto as menos ativas estão em vermelho.

Os compostos **28** [$C_6H_4-4-tert-C_4H_9$] e **27** [$C_6H_4-4-C_4H_9$] apresentam alto grau de similaridade (0,9) por serem isômeros constitucionais, com alteração de cadeia, e exibirem valores de atividade biológica aproximados, $pIC_{50} = 6,42$ e $6,45$, respectivamente. De acordo com o coeficiente de Tanimoto, os compostos que apresentaram similaridade máxima entre si, isto é, todas as subestruturas de um composto estavam presentes em outro composto relacionado, foram entre os pares **4** [OC_2H_5] / **20**

[C₈H₁₇]; **17** [C₆H₄-4-C₂H₅] / **21** [C₆H₄-4-C₃H₇]; **17**[C₆H₄-4-C₂H₅] / **28** [C₆H₄-4-tert-C₄H₉] e **21**[C₆H₄-4-C₃H₇] / **28** [C₆H₄-4-tert-C₄H₉].

Outros AC menos significantes também podem ser observados entre os compostos **4** [C₂H₅] e **7** [O-tert-C₄H₉], em que ambos apresentaram atividade moderada e possuem substituinte alquila. O composto **4** (pIC₅₀ = 5,93) apresentou potencial inibitório superior ao composto **7** (pIC₅₀ = 2,73), inferindo-se que, para a estrutura protótipo, substituintes pouco volumosos em cadeia não ramifica são mais favoráveis para atividade biológica. Apesar de não apresentar AC, o mesmo fenômeno é observado para o composto **2** [-CH₂CN] (pIC₅₀ = 6,09), em que o substituinte ciano favorece o efeito biológico estudado.

Para o conjunto de compostos que formam a quimioteca de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos estudados pelo grupo, os estudos de relações estrutura-atividade se basearam em métodos que estudam funções lineares (ISHII *et al.*, 2011; MASUNARI *et al.*, 2009; PALACE-BERL *et al.*, 2018; TAVARES; DO AMARAL, 2004). Para a atividade biológica dos compostos estudados contra formas promastigotas de *L. (L.) infantum*, os resultados sugerem que outros tipos de função, ou o cálculo de descritores não explorados, ou ainda outras abordagens, poderiam relacionar de forma mais abrangente os arcabouços químicos com a atividade biológica. O mesmo comportamento foi encontrado por Rando e colaboradores (2010), ao realizar estudos de análise exploratória de dados em conjunto de derivados 5-nitrofurânicos e 5-nitrotiofênicos contra as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) donovani* (RANDO *et al.*, 2010).

A existência de AC ajudaram a concentrar os esforços de otimização química em regiões nas moléculas que são cruciais para a atividade biológica e identificar os SAR dominantes, além de auxiliar na calibração de métodos não lineares aplicados à previsão de bioatividade (BAJORATH, 2017).

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A quimioteca de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos foi avaliada quanto à sua capacidade de inibir o crescimento dos parasitas Kinetoplastideos. Consagrando o arcabouço químico da nifuroxazida, o grupamento 5-nitro-2-furfurilidênico, se mostrou como estrutura de interesse para o desenvolvimento de potenciais candidatos a fármaco com ação antiparasitária, com ampla ação contra os principais parasitas tripanossomatídeos de interesse clínico para os seres humanos (*T. cruzi*, *Leishmania* spp. e *T. brucei*). De fato, a quimioteca demonstrou ser eficaz contra as formas amastigotas e promastigotas de *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major* e das formas tripomastigotas de *T. brucei*. Os compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos também demonstraram perfis de citotoxicidade adequados em relação às células de macrófagos THP-1 diferenciados, reforçando o seu potencial como promissores candidatos a fármacos com ação antiparasitária.

Vale ressaltar que o composto **40** (4-heptoxi-N'-((5nitrofurano-2-il) metileno) benzidrazida apresentou potencial inibitório altamente promissor em relação a todos os parasitas testados, principalmente apresentando alto desempenho em relação às formas amastigotas intracelulares dos parasitas, além de não apresentar citotoxicidade em relação às células THP-1 nas condições dos ensaios ($CC_{50} > 100 \mu M$), isto é, o composto apresentou atividade com maior especificidade para os parasitas do que para os macrófagos.

Dessa forma, o derivado 5-nitro-2-furfurilidênico apresentou maior potencial inibitório do que todos os fármacos de referência testados. Em relação à *L. (L.) infantum*, foi mais ativo do que os fármacos miltefosina ($IC_{50} = 8,28 \pm 0,33 \mu M$) e anfotericina B ($IC_{50} = 0,02 \pm 0,002 \mu M$) contra a forma promastigota do parasita e demonstrou capacidade de diminuição da carga parasitária das formas intracelulares de maneira similar à anfotericina B.

Apesar de os achados morfológicos obtidos pela microscopia eletrônica de transmissão indicarem que, para as condições de concentração e tempo de exposição do composto **40**, foram encontrados mais amastigotas intracelulares nas amostras celulares tratadas com o composto do que com os fármacos de referências, o quadro de alto estresse oxidativo que as formas intracelulares do parasita apresentavam quando expostas ao composto indicam o impacto da exposição ao composto para a viabilidade do parasita. Desse modo, como demonstrados pelos achados do MET, o composto induz efeito aos parasitas de maneira menos tóxica às células.

O potencial de inibição das formas amastigotas intracelular do composto **40** e demais compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos é reforçado quando se observa os achados dos ensaios de suscetibilidade contra as formas amastigotas de *L. (L.) major* capazes de expressar luciferase. Todos os compostos testados: **2** ($IC_{50} = 2,05 \pm 0,14 \mu M$), **8** ($IC_{50} = 0,32 \pm 0,027 \mu M$), **10**, ($IC_{50} = 0,14 \pm 0,009 \mu M$), **15** ($IC_{50} = 0,59 \pm 0,08 \mu M$), **20** ($IC_{50} = 0,46 \pm 0,0029 \mu M$), **28** ($IC_{50} = 0,45 \pm 0,02 \mu M$), **33** ($IC_{50} = 0,84 \pm 0,05 \mu M$), **34** ($IC_{50} = 1,84 \pm 0,09 \mu M$) e **40** ($IC_{50} = 0,006 \pm 0,0003 \mu M$); apresentaram maior capacidade de inibição da forma intracelular do parasita do que o fármaco de referência utilizado no ensaio, o nifurtimox ($IC_{50} = 2,15 \pm 0,01 \mu M$).

Trabalhos anteriores do grupo (PALACE-BERL et al., 2018) sugeriram que esses compostos apresentavam atividade anti-*T. cruzi*, inclusive em cepas indicativas de resistência ao benzonidazol. Uma vez que a literatura indica que a resistência aos fármacos nitrofurânicos apresentados em algumas cepas *T. cruzi* está associada à inativação da enzima nitrorredutase, responsável pela ativação de estruturas com grupamento nitro presente no parasita, foi, então, levantada a hipótese de investigação da ação dessa enzima na ativação dos compostos nitrofurânicos estudados.

Quanto à investigação do envolvimento das enzimas nitrorredutases no metabolismo dos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos, os resultados angariados sugerem que a maioria dos compostos são metabolizados pela nitrorredutase do tipo 1 em *T. brucei*. De maneira similar a nifurtimox, benzonidazol e feznidazol, fármacos nitro derivados utilizados na terapia contra doença de Chagas e Tripanossomíase Humana Africana (PATTERSON; FAIRLAMB, 2018; PATTERSON; WYLLIE, 2014). Isso sugere que o arcabouço químico 5-nitro-2-furfurilideno, nos parasitas tripanossomatídeos, é capaz de ser metabolizado por essa família de enzimas.

Sabe-se que o mecanismo de ação de um composto é dependente de sua estrutura, dessa forma, a variedade estrutural da quimioteca de derivados 5-nitrofuranos relevou diferentes respostas quanto à atividade da enzima nitrorredutase estudada. Esses achados sugerem que, apesar de alguns compostos mostrarem alto potencial inibitório contra o parasita, eles não são metabolizados pela NTR-1, o que explica, então, porque os compostos apresentavam, no passado, ação em cepas de *T. cruzi* resistentes ao benzonidazol (PALACE-BERL et al., 2018).

Tais resultados são ainda promissores, uma vez que a inativação da NTR-1 foi associada a um dos mecanismos de resistência dos parasitas tripanossomatídeos ao atual tratamento disponível, porque indicam que os derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos podem

ser estudados como candidatos a fármacos com ação antiparasitária, mesmo em casos de cepas resistentes.

Por exemplo, considerando-se cepas de *T. brucei* capazes de super expressar a TbNTR-1 (*TbNTR*(+)) em relação a sua expressão normal (*TbNTR*(-)), o nifurtimox, sabidamente metabolizados pela enzima, apresentou diferença de atividade até 6 vezes maior em relação à cepa *TbNTR*(+) [*TbNTR*(+): $IC_{50} = 0,69 \pm 0,04 \mu M$ / *TbNTR*(-): $IC_{50} = 3,04 \pm 0,06 \mu M$], enquanto alguns compostos estudados apresentaram clara diferença de atividade biológica. Isso indica que as estruturas são metabolizadas pela enzima, como o composto **15** [*TbNTR*(+): $IC_{50} = 0,1 \pm 0,005 \mu M$ / *TbNTR*(-): $IC_{50} = 4,95 \pm 0,49 \mu M$], mas outros compostos não demonstraram diferença significativa entre os valores de atividade biológica, como o composto **40** [*TbNTR*(+): $IC_{50} = 0,046 \pm 0,001 \mu M$ / *TbNTR*(-): $IC_{50} = 0,046 \pm 0,001 \mu M$] e **31** [*TbNTR*(+): $IC_{50} = 0,015 \pm 0,001 \mu M$ / *TbNTR*(-): $IC_{50} = 0,0146 \pm 0,009 \mu M$]. Assim, pode-se inferir que, apesar de esses compostos apresentarem alta atividade contra as formas tripomastigotas do *T. brucei*, a natureza química dos substituintes 4-benzenos substituídos heptoxi e sulfamoil promovem a ação antiparasitária por outros mecanismos de bioativação. De qualquer forma, a natureza de pró-fármacos dos compostos estudados foi reforçada por esses ensaios preliminares de investigação do mecanismo de ação.

A fim de se identificar as propriedades moleculares que mais influenciaram a atividade anti-*Leishmania*, foram realizados estudos de análise exploratória dos dados que possibilitaram o reconhecimento de padrões do conjunto de dados. Tal análise foi capaz de, apesar das limitações do método, separar os compostos em subconjuntos, em que foram considerados a natureza lipofílica e o volume dos substituintes químicos, reforçando achados anteriores de análise exploratória de dados focados para a ação antiparasitária desses compostos (PALACE-BERL et al., 2015, 2018), em que foram identificadas como as propriedades mais relevantes para a ação anti-*Leishmania* as propriedades relacionadas com o equilíbrio hidrófilo-lipófilo, como o coeficiente de partição (log P) e os descritores topológicos e estereoquímicos/geométricos.

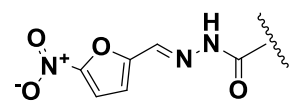
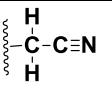
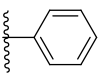
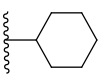
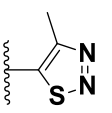
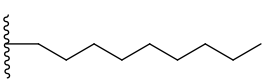
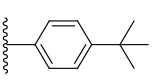
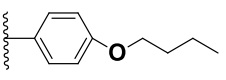
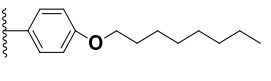
É de grande importância que os derivados sejam considerados para estudos subsequentes de investigação de mecanismo de ação, como ensaios de ancoragem (*docking*) virtual. Tais estudos podem ser realizados a fim de inferir como os compostos nitrofurânicos interagem com o sítio ativo da enzima, além de observar as diferenças entre as enzimas NTR para *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania*. Ensaios *in vitro* com a enzima

isolada de cada parasita também podem ser realizados, a fim de obter resultados conclusivos se esses compostos se comportam como substrato dessas enzimas.

Ademais, ensaios pertinentes às próximas etapas do processo de descobrimento de novos fármacos, como ensaios em modelos animais e estudos farmacocinéticos, são importantes para avaliar se a estrutura química dos compostos que apresentam atividade promissora nos ensaios *in vitro* preliminares se transfere para estudos *in vivo*. Para isso, ensaios devem ser realizados no tocante à identificação da toxicidade dos compostos em diferentes tecidos; avaliar a toxicidade aguda; determinar dose eficaz; avaliar o efeito farmacológico dos compostos a nível tópico ou sistêmico e avaliar a eficácia dos compostos nas fases agudas e crônicas da doença. Além disso, a partir dos dados angariados, pode ser realizada a proposição de novas estruturas com perfil farmacológico e farmacocinético otimizado.

Todos os achados relacionados aos ensaios de atividade para todos os parasitas e formas morfológicas estudadas contra os compostos 5-nitrofurânicos que apresentam substituintes químicos representativos estão ilustrados na Tabela Final.

Resumo dos resultados obtidos referente aos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos selecionados contra cepas de *Leishmania* spp e *T. brucei* obtidos neste trabalho.

		<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) major</i>		<i>T. brucei</i>		<i>THP-1</i>
		IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)		IC ₅₀ (μM)		
		Promastigota (média ± dp)	Promastigota (média ± dp)	Amastigota (média ± dp)	<i>TbNTR</i> (-) (média±dp)	<i>TbNTR</i> (+) (média±dp)	CC ₅₀ (μM) (média ± dp)
2		0,6 ± 0,07	3,03 ± 0, 05	2,05 ± 0,14	0,45 ± 0,02	0,15 ± 0,004	> 100
8		4,56 ± 0,32	0,6 ± 0,02	0,32 ± 0,027	1,36 ± 0,03	0,16 ± 0,012	33,26 ± 1,6
10		0,65 ± 0,005	1,71 ± 0,09	0,14 ± 0,009	1,33 ± 0,027	0,10 ± 0,005	> 100
15		4,5 ± 0,32	0,81 ± 0,03	0,59 ± 0,08	4,95 ± 0,49	0,1 ± 0,005	61,68 ± 5,8
20		2,64 ± 0,14	1,74 ± 0,089	0,46 ± 0,0029	2,18 ± ,15	0,53 ± 0,031	> 100
28		0,35 ± 0,04	2,71 ± 0,12	0,45 ± 0,02	0,3 ± 0,006	0,04 ± 0,005	81,69 ± 1,4
34		3,6 ± 0,064	0,188 ± 0,008	1,84 ± 0,09	0,16 ± 0,004	0,01 ± 0,001	29,55 ± 2,5
40		0,2 ± 0,019	0,087 ± 0,001	0,006 ± 0,0003	0,015 ± 0,01	0,0146 ± 0,009	> 100

REFERÊNCIAS

- ABET, V. *et al.* Prodrug approach: An overview of recent cases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 127, p. 810–827, fev. 2017.
- ABRAHAM, D. J. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. [s.l.] Wiley & Sons, Inc., 2003. v. 1.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 10, n. 3, p. e0004349, mar. 2016.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Health Science Journal*, v. 11, n. 4, 2017.
- ALLINGER, N. L. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *Journal of the American Chemical Society*, v. 99, n. 25, p. 8127–8134, dez. 1977.
- ALVES, M. S. D. *et al.* Antiparasitic activity of furanyl N-acylhydrazone derivatives against *Trichomonas vaginalis*: in vitro and in silico analyses. *Parasites & Vectors*, v. 13, n. 1, p. 59, 11 dez. 2020.
- ALVES, V. *et al.* QUIMIOINFORMÁTICA: UMA INTRODUÇÃO. *Química Nova*, n. November 2017, 2017.
- AMARAL, G. *et al.* What is Chemometrics? In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). *Chemometrics*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016. v. 369p. 1–13.
- AMINPOUR, M.; MONTEMAGNO, C.; TUSZYNSKI, J. A. An Overview of Molecular Modeling for Drug Discovery with Specific Illustrative Examples of Applications. *Molecules*, v. 24, n. 9, p. 1693, 30 abr. 2019.
- ANDRADE, L. F. DE *et al.* Chitosan nanoparticles for the delivery of a new compound active against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 55, p. 101363, fev. 2020.
- ANVERSA, L. S. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Revista da Associacao Medica Brasileira*, v. 64, n. 3, p. 281–289, mar. 2018.
- AZEREDO-COUTINHO, R. B. DE; MENDONÇA, S. C. F. Formas clínicas das Leishmanioeses Tegumentares nas Américas. In: *Leishmanioses do continente americano*. Rio de Janeiro: Editora Fio Cruz, 2014. p. 311.
- BAEK, K.-H. *et al.* Infectivity and Drug Susceptibility Profiling of Different *Leishmania*-Host Cell Combinations. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, v. 9, n. 5, 20 maio 2020.
- BAHIA, M. T. *et al.* Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 58, n. 8, p. 4362–70, ago. 2014.
- BAILLY, C. Toward a repositioning of the antibacterial drug nifuroxazide for cancer treatment. *Drug Discovery Today*, v. 24, n. 9, p. 1930–1936, 2019.
- BAJORATH, J. Representation and identification of activity cliffs. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 12, n. 9, p. 879–883, 2017.
- BAJUSZ, D.; RÁCZ, A.; HÉBERGER, K. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *Journal of Cheminformatics*, v. 7, n. 1, p. 20, 20 dez. 2015.

BAKER, J. R. THE EFFECT OF NITROFURAZONE ON TRYPANOSOMA RHODESIENSE INFECTIONS IN MICE. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, v. 14, n. 3, p. 408–410, set. 1959.

BALABAN, A. T. Highly discriminating distance-based topological index. *Chemical Physics Letters*, v. 89, n. 5, p. 399–404, 1982.

BALASEGARAM, M. *et al.* Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. *Expert opinion on emerging drugs*, v. 17, n. 4, p. 493–510, dez. 2012.

BARREIRO, E. J. Medicinal Chemistry and the paradigm of the lead compound. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 1, p. 26–34, 2009.

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *British Medical Bulletin*, v. 104, n. 1, p. 175–196, 2012.

BARRIENTOS-SALCEDO, C.; ESPINOZA, B.; SORIANO-CORREA, C. Computational study of substituent effects on the physicochemical properties and chemical reactivity of selected antiparasitic 5-nitrofurans. *Journal of Molecular Structure*, v. 1173, p. 92–99, dez. 2018.

BASTIAN, M.; HEYMANN, S.; JACOMY, M. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. *Third International AAAI Conference on Weblogs and Social Media*, p. 361–362, 2009.

BATES, P. A; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current molecular medicine*, v. 4, n. 6, p. 601–609, 2004.

BEGOVIĆ, B. *et al.* Open Clinical Trial on Using Nifuroxazide Compared to Probiotics in Treating Acute Diarrhoeas in Adults. *Materia Socio Medica*, v. 28, n. 6, p. 454, 2016.

BENCHIMOL, J. L. Leishmaniasis of the New World from a historical and global perspective, from the 1930s to the 1960s. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, v. 27, n. suppl 1, p. 95–122, set. 2020.

BIANCOLILLO, A.; MARINI, F. Chemometric Methods for Spectroscopy-Based Pharmaceutical Analysis. *Frontiers in Chemistry*, v. 6, p. 576, 21 nov. 2018.

BLUMENSTIEL, K. *et al.* Nitrofurans as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase. *Biochemical Pharmacology*, v. 58, n. 11, p. 1791–1799, dez. 1999.

BODDU, R. S.; PERUMAL, O.; K, D. Microbial nitroreductases: A versatile tool for biomedical and environmental applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, p. bab.2073, 23 nov. 2020.

BOT, C. *et al.* Trypanocidal Activity of Aziridinyl Nitrobenzamide Prodrugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 10, p. 4246–4252, 1 out. 2010.

BOT, C. *et al.* Evaluating 5-nitrofurans as trypanocidal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 4, p. 1638–1647, 2013.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1. ed. Brasília-DF, 2014.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar. Brasília-DF, 2016.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar. 2. ed. Brasília-DF, 2017.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose visceral Situação Epidemiológica da. 10/2017, p. 25, 2017b.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria no 264, de 17 de fevereiro de 2020 Brasília Diário Oficial da União, 2020.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico - O que há de novo hoje sobre o controle da leishmaniose visceral americana no Brasil? Experiência recente do Instituto Evandro Chagas. *Boletim Epidemiológico*, v. 51, n. 24, p. 1–13, 2020.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. DA. Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2019. *Boletim Epidemiológico*, v. 50, p. 1–154, 2019.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cenário atual do abastecimento dos medicamentos antileishmania no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). *Boletim Epidemiológico Arboviroses*, v. 51, n. 24, p. 1–13, 2020.

CAESAR, L. K.; KVALHEIM, O. M.; CECH, N. B. Hierarchical cluster analysis of technical replicates to identify interferents in untargeted mass spectrometry metabolomics. *Analytica Chimica Acta*, v. 1021, p. 69–77, ago. 2018.

CAMPOS, M. P. DE *et al.* Can vaccines against canine visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health? *Ciência Rural*, v. 47, n. 4, 2017.

CAPPEL, D. *et al.* Exploring conformational search protocols for ligand-based virtual screening and 3-D QSAR modeling. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 29, n. 2, p. 165–182, 2015.

CARNIELLI, J. B. T. *et al.* Natural resistance of leishmania infantum to miltefosine contributes to the low efficacy in the treatment of visceral leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 101, n. 4, p. 789–794, 2019.

CASTANYS-MUÑOZ, E. *et al.* Characterization of an ABCG-Like Transporter from the Protozoan Parasite Leishmania with a Role in Drug Resistance and Transbilayer Lipid Movement. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 10, p. 3573–3579, out. 2008.

CATALDO, N. *et al.* Inhibition of LDL oxidation and inflammasome assembly by nitroaliphatic derivatives. Potential use as anti-inflammatory and anti-atherogenic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 159, p. 178–186, nov. 2018.

CAVALCANTI, D. P.; DE SOUZA, W. The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. *Scanning*, v. 2018, p. 9603051, 2018.

CDC. LeishmaniasisAtlanta, 2015.

CDC. CDC - Leishmaniasis - Biology. 2020.

CECÍLIO, P.; OLIVEIRA, F.; SILVA, A. C. DA. Vaccines for Human Leishmaniasis: Where Do We Stand and What Is Still Missing? In: Leishmaniasis as Re-emerging Diseases. [s.l.] InTech, 2018.

CERECETTO, H. *et al.* Synthesis and anti-trypanosomal activity of novel 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives. *Il Farmaco*, v. 53, n. 2, p. 89–94, 1998.

CHAKRAVARTY, J. *et al.* Determinants for progression from asymptomatic infection to symptomatic visceral leishmaniasis: A cohort study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 3, p. e0007216, 27 mar. 2019.

CLAYDEN, J.; NICK, G.; STUART, W. What is organic chemistry? v. 2, p. 1200–1205, 2012.

COELHO, A. C. *et al.* In Vitro and In Vivo Miltefosine Susceptibility of a Leishmania amazonensis Isolate from a Patient with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 7, p. 1–11, 2014.

COHEN, N. C. Guidebook on molecular modelling in drug design. San Diego: Press, Academic, 1996.

COIMBRA, E. S. *et al.* Synthesis, Biological Activity, and Mechanism of Action of 2-Pyrazyl and Pyridylhydrazones Derivatives, New Classes of Antileishmanial Agents. *ChemMedChem*, v. 13, n. 14, p. 1387–1394, 18 jul. 2018.

CONCEIÇÃO-SILVA.; FÁTIMA CONCEIÇÃO-SILVA. Leishmanioses do continente americano. 22. ed. Rio de Janeiro: Editora Fio Cruz, 2014.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; LEITE-SILVA, J.; MORGADO, F. N. The Binomial Parasite-Host Immunity in the Healing Process and in Reactivation of Human Tegumentary Leishmaniasis. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1308, 2018.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F. N. Leishmania Spp-Host Interaction: There Is Always an Onset, but Is There an End? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, n. September, p. 1–14, 19 set. 2019.

COPELAND, N. K.; ARONSON, N. E.; CDC. Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 28, n. 5, p. 426–437, 2015.

CORDEIRO, N. DE M. *et al.* New 2-amino-pyridinyl-N-acylhydrazones: Synthesis and identification of their mechanism of anti-inflammatory action. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 123, p. 109739, mar. 2020.

CORRAL, M. J. *et al.* Improvement of 96-well microplate assay for estimation of cell growth and inhibition of Leishmania with Alamar Blue. *Journal of Microbiological Methods*, v. 94, n. 2, p. 111–116, ago. 2013.

COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Leishmaniose Visceral. In: CRUZ, E. F. (Ed.). Leishmanioses do continente americano. Rio de Janeiro: [s.n.]. p. 327–353.

COUTO, M. *et al.* Carboranylanylinoquinazoline EGFR-inhibitors: toward ‘lead-to-candidate’ stage in the drug-development pipeline. *Future Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 17, p. 2273–2285, set. 2019.

CRAMER, R. D.; PATTERSON, D. E.; BUNCE, J. D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *Journal of the American Chemical Society*, v. 110, n. 18, p. 5.959–67, 1º ago. 1988.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Society*, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

CUNHA, A.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero Leishmania patogênico para o homem. *Leishmania chagasi. Nota prévia*, v. 11, p. 3–9, 1937.

DA COSTA, C. F. *et al.* Synthesis and Antitubercular Activity of Novel Amino Acid Derivatives. *Chemical Biology and Drug Design*, v. 79, n. 2, p. 216–222, 2012.

DAN, N.; BHAKAT, S. New paradigm of an old target: An update on structural biology and current progress in drug design towards plasmepsin II. *European journal of medicinal chemistry*, v. 95, p. 324–348, 2015.

DE PAZ, J. G.; CILLER, J. On the Use of AM1 and PM3 Methods on Energetic Compounds. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*, v. 18, n. 1, p. 33–40, 1993.

DENNINGTON, R.; KEITH, T. A.; MILLAM, J. M. GaussviewShawnee Mission, KSSemichem Inc., 2007.

DIMOVA, D.; BAJORATH, J. Advances in activity cliff research. *Molecular Informatics*, v. 35, n. 5, p. 181–191, maio 2016.

DNDI. Tailored Approaches to Regional Differences. *DNDI Annual Report 2014*, p. 24–25, 2014.

DNDI. New hope for novel drugs for leishmaniasis: Update of DNDi's leishmaniasis R&D pipeline. p. 1–10, 2017.

DOAK, B. C.; KIHLEBERG, J. Drug discovery beyond the rule of 5 - Opportunities and challenges. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 12, n. 2, p. 115–119, 8 fev. 2017.

DODD, M. C. *et al.* The in vitro bacteriostatic action of some furan derivatives. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 82, n. 1, p. 11–18, 1944.

DODD, M. C. The Chemotherapeutic Properties of 5-nitro-2-furaldehyde Semicarbazone (Furacin). *J Pharmacol Exp Ther*, v. 86, p. 311–323, 1946.

DUBE, A.; GUPTA, R.; SINGH, N. Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. *Trends in Parasitology*, v. 25, n. 9, p. 432–439, 2009.

DUTTA, A. *et al.* Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. v. 54, p. 119–122, 2005.

DUTTA, S. *et al.* Application of QSAR in Drug Design and Drug Discovery. v. 1, n. May, p. 27–31, 2015.

EBEJER, J. P.; MORRIS, G. M.; DEANE, C. M. Freely available conformer generation methods: How good are they? *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 52, n. 5, p. 1.146–1.158, 2012.

EICHENBERGER, A. *et al.* A severe case of visceral leishmaniasis and liposomal amphotericin B treatment failure in an immunosuppressed patient 15 years after exposure. *BMC Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, p. 81, 17 dez. 2017.

ELEBRING, T.; GILL, A.; PLOWRIGHT, A. T. What is the most important approach in current drug discovery: doing the right things or doing things right? *Drug Discovery Today*, v. 17, n. 21–22, p. 1.166–1.169, 2012.

FERNANDES, Í. A. *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel piperidine-benzodioxole derivatives designed as potential leishmanicidal drug candidates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 25, n. 16, p. 3.346–3.349, 2015.

FERREIRA, L. G. *et al.* Molecular docking and structure-based drug design strategies. [s.l.: s.n.]. v. 20

FERREIRA, M. M. C. Quimiometria- Conceitos, Métodos e Aplicações. 1. ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015.

FERREIRA, M. M. C. C. Multivariate QSAR. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 13, n. 6, p. 742–753, nov. 2002.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ADRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. *Química Nova*, v. 34, n. 10, p. 1770–1778, 2011.

Fexinidazole for Chagas | DNDi. Disponível em: <<https://dndi.org/research-development/portfolio/fexinidazole-chagas/>>. Acesso em: 24 jul. 2020.

FIELD, M. C. *et al.* Anti-trypanosomatid drug discovery: An ongoing challenge and a continuing need. *Nature Reviews Microbiology*, v. 15, n. 4, p. 217–231, 2017.

FREE, S. M.; WILSON, J. W. A Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 7, n. 4, p. 395–399, jul. 1964.

GEBRE-HIWOT, A. *et al.* An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocytic cell line, THP-1. *Acta Tropica*, v. 51, n. 3–4, p. 237–245, 1992.

- GINOUVES, M. *et al.* Comparison of tetrazolium salt assays for evaluation of drug activity against leishmania spp. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 6, p. 2.131–2.138, 2014.
- GONZÁLEZ, A. *et al.* In vitro and in silico evaluations of new aryloxy-1,4-naphthoquinones as anti-Trypanosoma cruzi agents. *Medicinal Chemistry Research*, v. 29, n. 4, p. 665–674, 25 abr. 2020.
- GORE, M.; JAGTAP, U. B. Computational Drug Discovery and Design. New York, NY: Springer New York, 2018. v. 1762.
- GROOM, C. R. *et al.* The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallographica Section B Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, v. 72, n. 2, p. 171–179, 1 abr. 2016.
- GUHA, R. *et al.* Structure - Activity landscape index: Identifying and quantifying activity cliffs. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 48, n. 3, p. 646–658, 2008.
- GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Modern Drug Discovery Technologies: Opportunities and Challenges in Lead Discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, v. 14, n. 10, p. 830–839, 2011.
- GUIMARÃES-E-SILVA, A. S. *et al.* Leishmania infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. *PLOS ONE*, v. 12, n. 8, p. e0179052, 24 ago. 2017.
- GUIMARÃES, D. G. *et al.* Investigação do Potencial Biológico de Hidrazonas Obtidas Sinteticamente na Última Década (2006-2016): Uma Revisão Sistemática. *Rev. Virtual Quim*, v. 9, n. 6, p. 2551–2592, 2017.
- GUO, L. *et al.* Molecular hybrid design, synthesis, in vitro and in vivo anticancer evaluation, and mechanism of action of N-acylhydrazone linked, heterobivalent β -carboline. *Bioorganic Chemistry*, v. 96, p. 103612, mar. 2020.
- HALL, B. S. *et al.* Exploiting the drug-activating properties of a novel trypanosomal nitroreductase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 3, p. 1.193–1.199, 2010.
- HALL, B. S.; BOT, C.; WILKINSON, S. R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 15, p. 13088–13095, 2011.
- HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 1, p. 115–123, jan. 2012.
- HANDLER, M. Z. *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 73, n. 6, p. 911–926, 2015.
- HANSCH, C.; FUJITA, T. ρ - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *Journal of the American Chemical Society*, v. 86, n. 8, p. 1616–1626, abr. 1964.
- HASHIGUCHI, Y. *et al.* Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Tropical Medicine and Health*, v. 44, 2016.
- HEFNAWY, A. *et al.* Importance of secondary screening with clinical isolates for anti-leishmania drug discovery. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 11765, 6 dez. 2018.
- HENDRICKX, S. *et al.* In Vivo Selection of Paromomycin and Miltefosine Resistance in Leishmania donovani and L. infantum in a Syrian Hamster Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 8, p. 4.714–4.718, 1 ago. 2015.
- HENDRICKX, S. *et al.* In-depth comparison of cell-based methodological approaches to determine drug susceptibility of visceral Leishmania isolates. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 12, p. e0007885, 2 dez. 2019.

- HERNÁNDEZ, P. *et al.* Hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 59, p. 64–74, 2013.
- HIMMAT, M. *et al.* Adapting Document Similarity Measures for Ligand-Based Virtual Screening. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 21, n. 4, p. 476, 2016.
- HOPFINGER, A. J. *et al.* Construction of 3D-QSAR Models Using the 4D-QSAR Analysis Formalism. *Journal of the American Chemical Society*, v. 119, n. 43, p. 10.509–10.524, out. 1997.
- HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*, v. 24, n. 6, p. 417–441, 1933.
- HOTEZ, P. J. *et al.* Eliminating the Neglected Tropical Diseases: Translational Science and New Technologies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 3, p. 1–14, 2016.
- HRISTOVA-AVAKUMOVA, N. *et al.* 3-methoxy aroylhydrazones – free radicals scavenging, anticancer and cytoprotective potency. *Redox Report*, v. 22, n. 6, p. 408–417, 2 nov. 2017.
- HUANG, Y. *et al.* Evaluating frontier orbital energy and HOMO/LUMO gap with descriptors from density functional reactivity theory. *Journal of Molecular Modeling*, v. 23, n. 1, 2017.
- HYPERCUBE. HYPERCHEM Program for Windows Gainesville, FL, 2008.
- IMAMURA, H. *et al.* Evolutionary genomics of epidemic visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *eLife*, v. 5, 22 mar. 2016.
- ISHII, M. *et al.* Synthesis, molecular modeling and preliminary biological evaluation of a set of 3-acetyl-2,5-disubstituted-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazole as potential antibacterial, anti-Trypanosoma cruzi and antifungal agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 21, p. 6.293–6.301, 2011.
- JACOMY, M. *et al.* ForceAtlas2, a continuous graph layout algorithm for handy network visualization designed for the Gephi software. *PLoS ONE*, v. 9, n. 6, p. 1–12, 2014.
- JAIN, S. K. *et al.* A parasite rescue and transformation assay for antileishmanial screening against intracellular Leishmania donovani amastigotes in THP1 human acute monocytic leukemia cell line. *Journal of visualized experiments : JoVE*, n. December, p. 1–14, 2012.
- JHINGRAN, A. *et al.* Paromomycin: uptake and resistance in Leishmania donovani. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 164, n. 2, p. 111, 2009.
- JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, v. 374, n. 2.065, p. 20150202, 13 abr. 2016.
- JORGE, S. D. *et al.* Novel benzofuroxan derivatives against multidrug-resistant Staphylococcus aureus strains: Design using Topliss' decision tree, synthesis and biological assay. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 16, p. 5.031–5.038, 2011.
- JORGE, S. D. *et al.* Preliminary in vitro evaluation of N'-(benzofuroxan-5-yl)methylene benzohydrazide derivatives as potential anti-Trypanosoma cruzi agents. *MedChemComm*, v. 3, n. 7, p. 824, 2012.
- JORGE, S. D. *et al.* Ligand-based design, synthesis, and experimental evaluation of novel benzofuroxan derivatives as anti-Trypanosoma cruzi agents. [s.l.] Elsevier Masson SAS, 2013.
- KAISER, M. *et al.* Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. *PLOS ONE*, v. 10, n. 8, p. e0135556, 13 ago. 2015.
- KANAKAVETI, V. *et al.* Quantitative structure–activity relationship in ligand-based drug design: Concepts and applications. In: Protein Interactions. [s.l.] WORLD SCIENTIFIC, 2020. p. 333–349.

- KASKOVA, Z. M.; TSARKOVA, A. S.; YAMPOLSKY, I. V. 1001 lights: Luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chemical Society Reviews*, v. 45, n. 21, p. 6048–6077, 2016.
- KATSUNO, K. *et al.* Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 14, n. 11, p. 751–8, 2015.
- KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 10. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- KIDERLEN, A. F.; KAYE, P. M. A modified colorimetric assay of macrophage activation for intracellular cytotoxicity against *Leishmania* parasites. *Journal of Immunological Methods*, v. 127, n. 1, p. 11–18, 1990.
- KIP, A. E. *et al.* Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 57, n. 2, p. 151–176, fev. 2018.
- KIRALJ, R.; FERREIRA, M. M. C. Is your QSAR/QSPR descriptor real or trash? *Journal of Chemometrics*, v. 24, n. 11–12, p. 681–693, 21 nov. 2010.
- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. . *Química Farmacêutica*. ABDR ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- KRISTENSEN, T. G.; NIELSEN, J.; PEDERSEN, C. N. S. Methods for Similarity-based Virtual Screening. *Computational and structural biotechnology journal*, v. 5, n. February, p. e201302009, 2013.
- KUMAR, A.; ZHANG, K. Y. J. Advances in the Development of Shape Similarity Methods and Their Application in Drug Discovery. *Frontiers in Chemistry*, v. 6, 25 jul. 2018.
- LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1, n. 2, p. 13–32, jun. 2010.
- LAMOTTE, S. *et al.* Discovery of novel hit compounds with broad activity against visceral and cutaneous *Leishmania* species by comparative phenotypic screening. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 438, 24 dez. 2019.
- LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 26, n. 4, p. 223–227, 2009.
- LAULETTA, J. A.; CUNHA, M. A.; QUEIROZ, I. T. Leishmaniasis – HIV coinfection : current challenges. p. 147–156, 2016.
- LE, V. V. H. *et al.* Novel 5-Nitrofurantoin-Activating Reductase in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 63, n. 11, 3 set. 2019.
- LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. . *Foye's Principle of Medicinal Chemistry*. 6. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2008.
- LIN, X.; LI, X.; LIN, X. A review on applications of computational methods in drug screening and design. *Molecules*, v. 25, n. 6, p. 1–17, 2020.
- LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 23, p. 3–25, mar. 1997.
- LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 1, n. 4, p. 337–341, 1 dez. 2004.
- MADALOSSO, G. *et al.* American Visceral Leishmaniasis: Factors Associated with Lethality in the State of São Paulo, Brazil. *Journal of Tropical Medicine*, v. 2012, p. 1–7, 2012.
- MAIA, C. *et al.* Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, v. 103, n. 2, p. 150–155, 2007.

- MAMY, L. *et al.* Prediction of the Fate of Organic Compounds in the Environment From Their Molecular Properties: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 45, n. 12, p. 1.277–1.377, 2015.
- MANSOUR, A. M. Synthesis, spectroscopic, electrochemical, DFT and SAR studies of nifuroxazide complexes with Pd(II), Pt(II) and Ru(II). *Polyhedron*, v. 78, p. 10–17, 2014.
- MARCH, J. Aromatic Electrophilic Substitution. [s.l.: s.n.]. v. 1.
- MARCH, J. Advanced Organical Chemistry: reactions, mechanisms and structures. 4. ed. New York: John Wiley, 2001.
- MARIANE PEREIRA BRITO. Análise in vitro do efeito da associação da pentamidina com verapamil, anfotericina B e miltefosina contra linhagens suscetíveis e resistentes de Leishmania (Leishmania) amazonensis. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2019.
- MARTIN, J.; CANTIZANI, J.; PEÑA, I. Chapter 5. The Pursuit of Novel Anti-leishmanial Agents by High-throughput Screening (HTS) of Chemical Libraries. In: *Drug Discovery for Leishmaniasis*. [s.l.: s.n.]. p. 77–100.
- MASUNARI, A. *et al.* Generation and analysis of interaction energy maps of p-substituted benzoic acid [(5-nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazides active against MRSA. *QSAR and Combinatorial Science*, v. 28, n. 11–12, p. 1546–1550, 2009.
- MASUNARI, A.; TAVARES, L. C. Aplicação de estudos de QSAR-2D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade antimicrobiana frente a Staphylococcus aureus multi- resistente (MRSA). v. 42, 2006.
- MASUNARI, A.; TAVARES, L. C. A new class of nifuroxazide analogues: Synthesis of 5-nitrothiophene derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant Staphylococcus aureus. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 12, p. 4.229–4.236, 2007.
- MAURICIO, I. L. *et al.* Genomic diversity in the Leishmania donovani complex. *Parasitology*, v. 119 (Pt 3), p. 237–46, set. 1999.
- MCCONVILLE MJ, SCHNUR LF, JAFFE C, S. P. *et al.* Structure of Leishmania lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem*, v. 310, n. 3, p. 807–818, 1995.
- 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*, v. 7, n. 2, p. 248–249, ago. 2017.
- MEDINA-FRANCO, J. L. *et al.* Characterization of activity landscapes using 2D and 3D similarity methods: Consensus activity cliffs. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 49, n. 2, p. 477–491, 2009.
- MEJÍA-JARAMILLO, A. M. *et al.* Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in Trypanosoma cruzi. *Parasites & Vectors*, v. 4, n. 1, p. 169, 5 set. 2011.
- MEJIA, A. M. *et al.* Benznidazole-Resistance in Trypanosoma cruzi Is a Readily Acquired Trait That Can Arise Independently in a Single Population. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 206, n. 2, p. 220, 2012.
- MENDONÇA, D. B. D. *et al.* Nitro-Heterocyclic compounds induce apoptosis-like effects in Leishmania (L). amazonensis promastigotes. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 25, n. 0, p. 1–9, 2019.
- MENDONÇA, S. C. F. Differences in immune responses against Leishmania induced by infection and by immunization with killed parasite antigen: implications for vaccine discovery. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 492, 6 dez. 2016.

- MEREDITH, E. L. *et al.* Distinct activation mechanisms trigger the trypanocidal activity of DNA damaging prodrugs. *Molecular Microbiology*, v. 106, n. 2, p. 207–222, out. 2017.
- MEYMANDI, S. *et al.* Treatment of Chagas Disease in the United States. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, v. 10, n. 3, p. 373–388, 26 set. 2018.
- MIKUS, J.; STEVERDING, D.; U, D. S. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. *Parasitology International*, v. 48, n. 3, p. 265–269, 2000.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de vigilância em saúde. [s.l.: s.n.].
- MOFFAT, J. G. *et al.* Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 16, n. 8, p. 531–543, 7 ago. 2017.
- MOLLINEDO, F. Alkylphospholipids and Leishmaniasis. In: *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. [s.l.] InTech, 2014.
- MONCAYO, S. *et al.* Evaluation of supervised chemometric methods for sample classification by Laser Induced Breakdown Spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 146, p. 354–364, ago. 2015.
- MONDELAERS, A. *et al.* Genomic and Molecular Characterization of Miltefosine Resistance in *Leishmania infantum* Strains with Either Natural or Acquired Resistance through Experimental Selection of Intracellular Amastigotes. *PLOS ONE*, v. 11, n. 4, p. e0154101, 28 abr. 2016.
- MONTANARI, C. A.; GAUDIO, A. C. Estratégias e princípios do planejamento molecular de fármacos. In: *Química Medicinal. Métodos e Planejamentos em Descobrimento de Fármacos*. São Paulo: Edusp, 2011. p. 200.
- MONTENEGRO, M. *et al.* Identification of a type I nitroreductase gene in non-virulent *Trypanosoma rangeli*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 7, p. 504–509, jul. 2017.
- MORAES CALVALCANTE, P. M. *et al.* Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. *Educación Química*, v. 26, n. 4, p. 319–329, 1 out. 2015.
- MORIZOT, G. *et al.* Antimony to Cure Visceral Leishmaniasis Unresponsive to Liposomal Amphotericin B. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, p. e0004304, jan. 2016.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MULLARD, A. New drugs cost US\$2.6 billion to develop. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 13, n. 12, p. 877–877, 1 dez. 2014.
- MUYLDER, G. DE *et al.* A screen against *leishmania* intracellular amastigotes: Comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 7, 2011.
- NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites. *Essays in Biochemistry*, v. 51, p. 81–95, 24 out. 2011.
- O'BOYLE, N. M. *et al.* Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, v. 3, n. 1, p. 33, 2011.
- OLIVEIRA, L. F. *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica*, v. 118, n. 2, p. 87–96, 2011.
- P, W.; WILLETT, P. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. *Drug Discovery Today*, v. 11, n. 23–24, p. 1.046–1.053, dez. 2006.

- PALACE-BERL, F. *et al.* 5-Nitro-2-furfuriliden derivatives as potential anti-Trypanosoma cruzi agents: Design, synthesis, bioactivity evaluation, cytotoxicity and exploratory data analysis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 17, p. 5395–5406, 2013.
- PALACE-BERL, F. *et al.* Designing and exploring active N'-[(5-nitrofuranyl) methylene] substituted hydrazides against three Trypanosoma cruzi strains more prevalent in Chagas disease patients. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 96, p. 330–339, 2015.
- PALACE-BERL, F. Planejamento de fármacos anti- *T. cruzi*: Síntese de compostos nitrofurânicos, avaliação da atividade biológica in vitro e estudos de relações estrutura-atividade. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.
- PALACE-BERL, F. *et al.* Investigating the structure-activity relationships of N'-[(5-nitrofuranyl) methylene] substituted hydrazides against Trypanosoma cruzi to design novel active compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 144, p. 29–40, 2018.
- PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION; ORGANIZATION, W. H. Epidemiological Report of the Americas. *Report Leishmaniases*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2019.
- PAPADOPOULOU, M. V. *et al.* Antitrypanosomal activity of 5-nitro-2-aminothiazole-based compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 117, p. 179–186, 2016.
- PATRICK, G. L. An introduction to Medicinal Chemistry. 5. ed. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 2013.
- PATTERSON, S.; FAIRLAMB, A. H. Current and Future Prospects of Nitro-compounds as Drugs for Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Current Medicinal Chemistry*, v. 26, n. 23, p. 4454–4475, 2018.
- PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: Past, present, and future prospects. *Trends in Parasitology*, v. 30, n. 6, p. 289–298, 2014.
- PAUL, S. M. *et al.* How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 9, n. 3, p. 203–14, 2010.
- PAULA, F. R. *et al.* Molecular modeling studies and in vitro bioactivity evaluation of a set of novel 5-nitro-heterocyclic derivatives as anti-T. cruzi agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 7, p. 2673–2679, 2009.
- PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecânicos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 1013–1020, 2009.
- PEARSON, K. LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, v. 2, n. 11, p. 559–572, 8 nov. 1901.
- PELISSARI, D. M. *et al.* Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 20, n. 1, p. 107–110, 2011.
- PÉREZ-VICTORIA, F. J. *et al.* Phospholipid Translocation and Miltefosine Potency Require Both L. donovani Miltefosine Transporter and the New Protein LdRos3 in Leishmania Parasites. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 33, p. 23766–23775, 18 ago. 2006.
- PÉREZ-VICTORIA, F. J.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Leishmania donovani resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 8, p. 2397–2403, 2003.
- PÉREZ-VILLANUEVA, J. *et al.* Activity cliffs and activity cliff generators based on chemotype-related activity landscapes. *Molecular Diversity*, v. 19, n. 4, p. 1021–1035, 2015.
- PETERSON, F. J. *et al.* Oxygen-sensitive and -Insensitive Nitroreduction by Escherichia Coli and Rat Hepatic Microsomes. *J Bio Chem*, v. 254, n. 10, p. 4009–14, 1979.

PETERSSON, G. A. *et al.* A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements. *The Journal of Chemical Physics*, v. 89, n. 4, p. 2.193–2.218, 15 ago. 1988.

PETERSSON, G. A.; AL-LAHAM, M. A. A complete basis set model chemistry. II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms. *The Journal of Chemical Physics*, v. 94, n. 9, p. 6081–6090, 31 maio 1991.

PHRMA. Biopharmaceutical Research Industry Profile. p. 86, 2016.

PICCIRILLO, E.; DO AMARAL, A. T. Virtual screening of bioactive compounds: Concepts and applications. *Quimica Nova*, v. 41, n. 6, p. 662–677, 2018.

PITSAWONG, W.; HOBEN, J. P.; MILLER, A.-F. Understanding the Broad Substrate Repertoire of Nitroreductase Based on Its Kinetic Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 22, p. 15203–15214, 30 maio 2014.

PNIEWSKA, B.; JANUCHOWSKI, M. Structural investigations of nifuroxazide, p-hydroxy-N'-(5-nitrofurfurylidene)benzhydrazide. v. 72, n. 12, p. 2629–2634, dez. 1998.

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

PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 12, p. e0006052, 14 dez. 2017.

POORRAJAB, F. *et al.* Selective leishmanicidal effect of 1,3,4-thiadiazole derivatives and possible mechanism of action against Leishmania species. *Experimental Parasitology*, v. 121, n. 4, p. 323–330, 1 abr. 2009.

PURKAIT, B. *et al.* Mechanism of Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates of Leishmania donovani. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 2, p. 1031–1041, 1 fev. 2012.

RAKOTOMANGA, M. *et al.* Miltefosine Affects Lipid Metabolism in Leishmania donovani Promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 4, p. 1425–1430, abr. 2007.

RANDO, D. G. *et al.* Antileishmanial activity screening of 5-nitro-2-heterocyclic benzylidene hydrazides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 14, p. 6724–6731, jul. 2008.

RANDO, D. G. *et al.* Chalcones and N -acylhydrazones : direct analogues ? Exploratory data analysis applied to potential novel antileishmanial agents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 46, 2010.

RANGEL, E. F. *et al.* Brazilian Sand Flies. Cham: Springer International Publishing, 2018.

REGUERA, R. M. *et al.* Drugs and Drug Resistance Target-based vs . phenotypic screenings in Leishmania drug discovery: A marriage of convenience or a dialogue of the deaf? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 4, n. 3, p. 355–357, 2014.

REY, L. Leishmania e Leishmaníases: Os parasitos. In: KOOBAN, G. (Ed.). *Parasitologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: [s.n.]. p. 359–371.

RISS, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual [Internet], v. 114, n. 8, p. 785–796, 2013.

RIVAS, L.; GIL, C. Drug discovery for Leishmaniasis. [s.l: s.n.].

RODRIGUEZ, A. E. *et al.* Leishmania. In: FLORIN-CHRISTENSEN, M.; SCHNITTGER, L. (Eds.). *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 1–438.

- ROLDÁN, M. D. *et al.* Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 32, n. 3, p. 474–500, 1 maio 2008.
- ROMA, C. *et al.* Vulnerabilidade à transmissão da leishmaniose visceral humana em área urbana brasileira. *Revista de Saúde Pública*, v. 51, p. 1–11, 2017.
- ROMERO, G. A. S. *et al.* Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 6, p. 1–25, 2017.
- ROZADA, A. M. F. *et al.* Synthesis and antifungal activity of new hybrids pyrimido[4,5-d]pyridazinone-N-acylhydrazones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 30, n. 14, p. 127244, jul. 2020.
- RUGANI, J. N. *et al.* Intraspecies susceptibility of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* to antileishmanial drugs: Antimony resistance in human isolates from atypical lesions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 108, p. 1170–1180, 1 dez. 2018.
- SAINANI, K. L. Introduction to principal components analysis. *PM and R*, v. 6, n. 3, p. 275–278, 2014.
- SAINI, D.; GUPTA, M. Hydrazones as potential anticancer agents: An update. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 4, n. 2, p. 116–122, 2018.
- SANGSHETTI, J. N. *et al.* Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. *RSC Advances*, v. 5, n. 41, p. 32376–32415, 2015.
- SANTOS, W. S. *et al.* Flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae) de área endêmica para leishmaniose cutânea e visceral no nordeste do estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 10, n. 0, nov. 2019.
- SCHUBACH, A. D.; SILVA, F. C. Estado da arte no Tratamento da Leishmaniose Tegumentar America no Brasil. In: *Leishmanioses do continente americano*. Rio de Janeiro: Editora Fio Cruz, 2014. p. 391.
- SERAFIM, R. A. M.; PERNICHELLE, F. G.; FERREIRA, E. I. The latest advances in the discovery of nitric oxide hybrid drug compounds. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 12, n. 9, p. 941–953, 2017.
- SERAFIM, T. D.; INIGUEZ, E.; OLIVEIRA, F. *Leishmania infantum*. *Trends in Parasitology*, v. 36, n. 1, p. 80–81, jan. 2020.
- SESSO, A. *et al.* Bacteria arise at the border of mycoplasma-infected HeLa cells, containing cytoplasm with either malformed cytosol, mitochondria and endoplasmic reticulum or tightly adjoined smooth vacuoles. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 59, n. 1, p. 49–54, 21 dez. 2017.
- SHAW, C. D. *et al.* In vitro selection of miltefosine resistance in promastigotes of *Leishmania donovani* from Nepal: genomic and metabolomic characterization. *Molecular Microbiology*, v. 99, n. 6, p. 1134–1148, mar. 2016.
- SHAW, J. J.; RANGEL, E. F. Brazilian sand flies: Biology, taxonomy, medical importance and control. [s.l.: s.n.].
- SILVA, C. G. *et al.* Ultraestrutura de parasitos do genero *Leishmania*. In: *Leishmanioses do continente americano*. Rio de Janeiro: Editora Fio Cruz, 2014. p. 53.
- SILVA, D. Estudo das formas anômalas da leishmaniose tegumentar. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 7, n. 1, p. 11, 1970.
- SILVA, S. C. S. P. *et al.* Effects of nitro-heterocyclic derivatives against *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* promastigotes and intracellular amastigotes. *Experimental Parasitology*, v. 163, p. 68–75, 2016.
- SIQUEIRA-NETO, J. L. *et al.* An image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular *leishmania donovani* amastigotes in human macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 6, 2012.

- SLAVOV, S. H. *et al.* Computational identification of structural factors affecting the mutagenic potential of aromatic amines: study design and experimental validation. *Archives of Toxicology*, v. 92, n. 7, p. 2.369–2.384, 19 jul. 2018.
- SMIRNOVA, D. V.; UGAROVA, N. N. Firefly Luciferase-based Fusion Proteins and their Applications in Bioanalysis. *Photochemistry and Photobiology*, v. 93, n. 2, p. 436–447, mar. 2017.
- SOLOMONS, G., F. *Organic Chemistry*. 7. ed. New York: [s.n.].
- SQUADRITO, F. J.; PORTAL, D. DEL. Nitrofurantoin. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470526>>. Acesso em: 1 jan. 2021.
- SRINIVAS REDDY, A. *et al.* Virtual Screening in Drug Discovery - A Computational Perspective. *Current Protein & Peptide Science*, v. 8, n. 4, p. 329–351, 1 ago. 2007.
- SRIVASTAVA, P. *et al.* Unusual Case of Resistance to Amphotericin B in Visceral Leishmaniasis in a Region in India Where Leishmaniasis Is Not Endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 8, p. 3.088, ago. 2011.
- SRIVASTAVA, S. *et al.* Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasites & Vectors*, v. 10, n. 1, p. 49, 2017.
- STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, v. 10, n. 1, 2017.
- STUART, K. *et al.* Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. *Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 2008.
- STUMPFE, D.; BAJORATH, J. Exploring activity cliffs in medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, n. 7, p. 2.932–2.942, 12 abr. 2012.
- SUNDAR, S. *et al.* Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, v. 347, n. 22, p. 1.739–1.746, 28 nov. 2002.
- SUNDAR, S. *et al.* Efficacy of Miltefosine in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in India After a Decade of Use. *Clinical Infectious Diseases*, v. 55, n. 4, p. 543–550, 15 ago. 2012.
- SUNDAR, S. *et al.* Single-Dose Indigenous Liposomal Amphotericin B in the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis: A Phase 2 Study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 92, n. 3, p. 513, 2015.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Cham: Springer International Publishing*, 2017.
- SUNDAR, S.; SINGH, A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, v. 3, n. 3–4, p. 98–109, jun. 2016.
- TABBABI, A. Review of leishmaniasis in the middle east and North Africa. *African Health Sciences*, v. 19, n. 1, p. 1329–1337, 2019.
- TADA, H. *et al.* An improved colorimetric assay for interleukin 2. *Journal of Immunological Methods*, v. 93, n. 2, p. 157–165, 1986.
- TAHGHI, A. *et al.* Synthesis and anti-leishmanial activity of 5-(5-nitrofuran-2-yl)-1,3,4- thiadiazol-2- amines containing N-[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl] moieties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, p. 124–128, 2012.
- TANIMOTO, T. *IBM Internal Report*. 1957.

- TAVARES, L. C.; DO AMARAL, A. T. QSPR/QSAR in N-[(dimethylamine)methyl] benzamides substituents groups influence upon electronic distribution and local anesthetics activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 6, p. 1377–1381, 2004.
- TAVARES, L. C.; PENNA, T. C.; AMARAL, A. T. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. *Bollettino chimico farmaceutico*, v. 136, n. 3, p. 244–9, mar. 1997.
- THOTA, S. *et al.* N-Acylhydrazones as drugs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 28, n. 17, p. 2.797–2.806, 2018.
- TODESCHINI, R.; CONSONNI, V. *Handbook of molecular descriptors*. [s.l.] Wiley-VCH, 2000.
- TORREELE, E. *et al.* Fexinidazole – A New Oral Nitroimidazole Drug Candidate Entering Clinical Development for the Treatment of Sleeping Sickness. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 12, 2010.
- Towards better patient care: Drugs to avoid in 2018. *Prescrire International*, v. 27, n. 192, p. 107–109, 2018.
- TROCHINE, A. *et al.* Benznidazole Biotransformation and Multiple Targets in Trypanosoma cruzi Revealed by Metabolomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 5, 2014.
- ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology*, n. May, p. 1–17, 2017.
- VAINIO, M. J.; JOHNSON, M. S. Generating conformer ensembles using a multiobjective genetic algorithm. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 47, n. 6, p. 2462–2474, 2007.
- VASIEVICH, M. P. *et al.* Got the Travel Bug? A Review of Common Infections, Infestations, Bites, and Stings Among Returning Travelers. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2016.
- VEBER, D. F. *et al.* Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 12, p. 2.615–2.623, jun. 2002.
- VEERASAMY, R. *et al.* Validation of QSAR Models - Strategies and Importance. *International Journal of Drug Design and Discovery*, v. 2, n. 3, p. 511–519, 2011.
- VILELA, M. L. *et al.* Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis: fatores associados ao processo de expansão e urbanização da leishmaniose visceral americana. In: *Leishmanioses do continente americano*. Rio de Janeiro: Editora Fio Cruz, 2014. p. 183.
- VIODÉ, C. E. *et al.* Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochemical Pharmacology*, v. 57, n. 5, p. 549–557, 1999.
- VOAK, A. A. *et al.* An Essential Type I Nitroreductase from Leishmania major Can Be Used to Activate Leishmanicidal Prodrugs. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 40, p. 28466–28476, 4 out. 2013.
- VOAK, A. A. *et al.* Evaluating Aziridiny Nitrobenzamide Compounds as Leishmanicidal Prodrugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 1, p. 370–377, jan. 2014.
- WALKER, J. M. *Drug Design and Discovery*. 1st. ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. v. 716
- WASSERMANN, A. M.; WAWER, M.; BAJORATH, J. Activity landscape representations for structure-activity relationship analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 23, p. 8209–8223, 2010.
- WAWER, M. *et al.* Structure–Activity Relationship Anatomy by Network-like Similarity Graphs and Local Structure–Activity Relationship Indices. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, n. 19, p. 6075–6084, 9 out. 2008.
- WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: Rationale and concerns related to reservoir control. *Revista de Saude Publica*, v. 48, n. 5, p. 851–856, 2014.

- WHO. Control of the leishmaniasis. *WHO Technical Report Series*, n. 949, p. 54–73, 2010.
- WHO. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. *World Health Organization technical report series*, n. 975, p. v–xii, 1–100, 2012.
- WHO. Weekly epidemiological record. v. 22, n. 91, p. 285–296, 2016a.
- WHO. Country General Information, Brazil. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Brazil_CP_2014.pdf?ua=1>.
- WHO. WHO | Brazil. WHO, 2018.
- WHO, W. H. O. Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2018., 2019. Disponível em: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/GHO_VL_2018.pdf?ua=1
- WHO, W. H. O. WHO | Leishmaniasis| Epidemiological situation. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 4 maio. 2020.
- WILKINSON, S. R. et al. Distinct Mitochondrial and Cytosolic Enzymes Mediate Trypanothione-dependent Peroxide Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 11, p. 8.220–8.225, 17 mar. 2000.
- WILKINSON, S. R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 13, p. 5.022–7, 2008.
- WOUTERS, O. J.; MCKEE, M.; LUYTEN, J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *JAMA*, v. 323, n. 9, p. 844, 3 mar. 2020.
- WYLLIE, S. et al. The Anti-Trypanosome Drug Fexinidazole Shows Potential for Treating Visceral Leishmaniasis. *Science Translational Medicine*, v. 4, n. 119, p. 119re1-119re1, 2012.
- WYLLIE, S. et al. Activation of Bicyclic Nitro-drugs by a Novel Nitroreductase (NTR2) in *Leishmania*. p. 1–22, 2016a.
- WYLLIE, S. et al. Nitroheterocyclic drug resistance mechanisms in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, n. 3, p. 625–634, 2016b.
- WYLLIE, S.; PATTERSON, S.; FAIRLAMB, A. H. Assessing the Essentiality of *Leishmania donovani* Nitroreductase and Its Role in Nitro Drug Activation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 2, p. 901–906, 1 fev. 2013.
- YOO, C.; SHAHLAEI, M. The applications of PCA in QSAR studies: A case study on CCR5 antagonists. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 91, n. 1, p. 137–152, jan. 2018.
- YU, W.; MACKERELL, A. D. Computer-Aided Drug Design Methods. In: *Methods in Molecular Biology*. [s.l: s.n.]. v. 1520p. 85–106.
- ZAULI-NASCIMENTO, R. C. et al. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Tropical Medicine and International Health*, v. 15, n. 1, p. 68–76, 2010.
- ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. *Drug Discovery Today*, v. 22, n. 10, p. 1.516–1.531, 1 out. 2017.
- ZUMA, N. H.; AUCAMP, J.; N'DA, D. D. An update on derivatisation and repurposing of clinical nitrofurans drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 140, n. September, p. 105.092, 2019.

ANEXO 1 – FAIXAS DE FUSÃO EXPERIMENTAIS E DA LITERATURA DA QUIMIOTECA DE COMPOSTOS 5-NITRO-2FURFURILIDÊNICOS

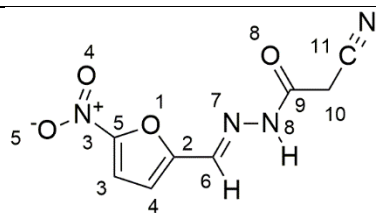
Composto	Faixa de fusão (°C)			Composto	Faixa de fusão (°C)		
	Exp	Lit	$\Delta(^{\circ}\text{C})$		Ex	Lit ¹	$\Delta(^{\circ}\text{C})$
1	247-249	249-250	2	21	265-267	268-269	2
2	195-196	201-202	1	22	243-245	244-245	2
3	152-154	152-154	2	23	257-259	255-257	2
4	175-176	183-185	1	24*	235-236	228-230	2
5	250-251	249-250	1	25	226-228	225-227	2
6	200-201	206-207	1	26	248-250	249-250	2
7	179-180	177-178	1	27*	203-204	203-204	1
8	211-212	211-212	1	28*	296-297	304-305	1

¹<https://www.reaxys.com>; Palace-Berl, 2016. * Faixa de fusão após recristalização.

Composto	Faixa de fusão (°C)			Composto	Faixa de fusão (°C)		
	Exp	Lit	$\Delta(^{\circ}\text{C})$		Exp	Lit	$\Delta(^{\circ}\text{C})$
9*	259-260	246-248	1	29*	206-207	204-205	1
10	202-203	202-203	1	30	204-206	206-207	1
11*	198-200	200-201	2	31	277-278	269-270	1
12	194-195	195-196	1	32	212-213	217-218	1
13	228-230	230-231	2	33	176-177	169-172	1
14*	282-283	280-282	1	34	203-204	204-205	1
15	247-248	245-248	1	35	236-238	239-240	2
16*	228-230	230-231	2	36	196-197	197-198	1
17*	246-247	249-250	1	37	201-202	198-199	1
18	243-244	246-247	1	38	200-201	200-201	1
19	225-226	228-229	1	39	177-178	178-179	1
20	143-144	140-141	1	40	173-174	172-173	1

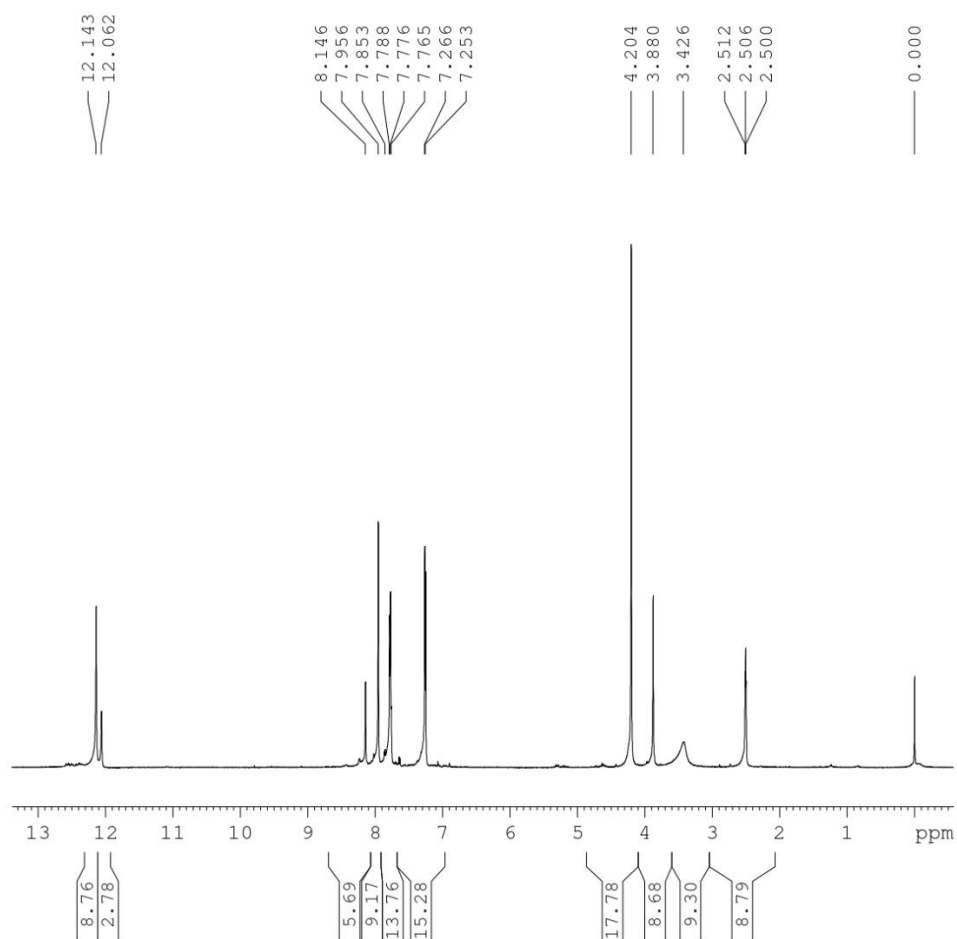
¹<https://www.reaxys.com>; Palace-Berl, 2016. * Faixa de fusão após recristalização.

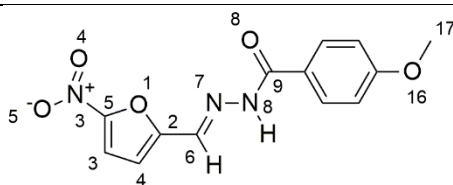
ANEXO 2 – ESPECTROS DE RMN ^1H DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS DA QUIMIOTECA DE COMPOSTOS 5-NITRO-2-FURFURILIDÊNICOS.



Composto 2

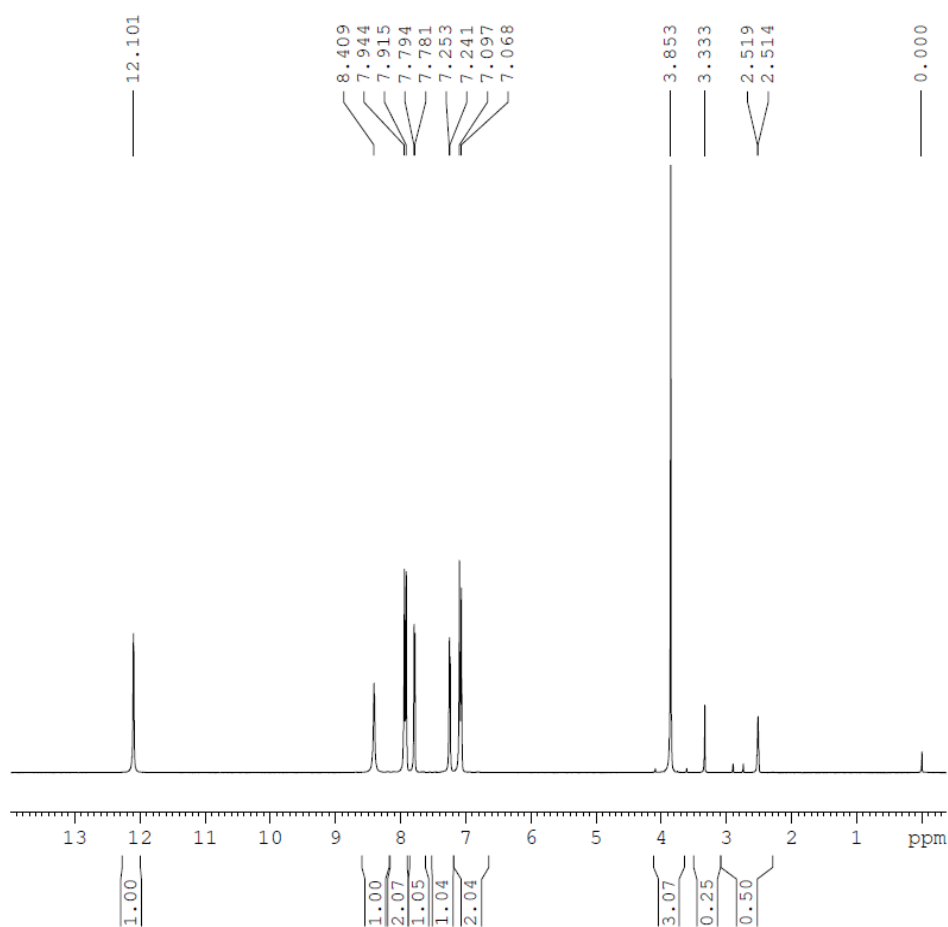
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) Sinais (ppm): amino (-NH): 12,14/12,062; grupo azo (-C=N): 8,14/7,95; e sinais de presença do furano (H3 = 7,25; H4 = 7,95) e H10: 4,2,

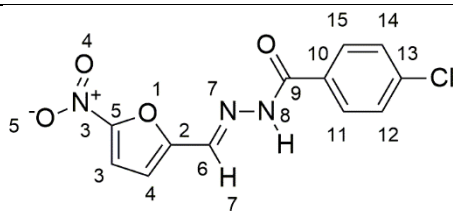




Composto 18

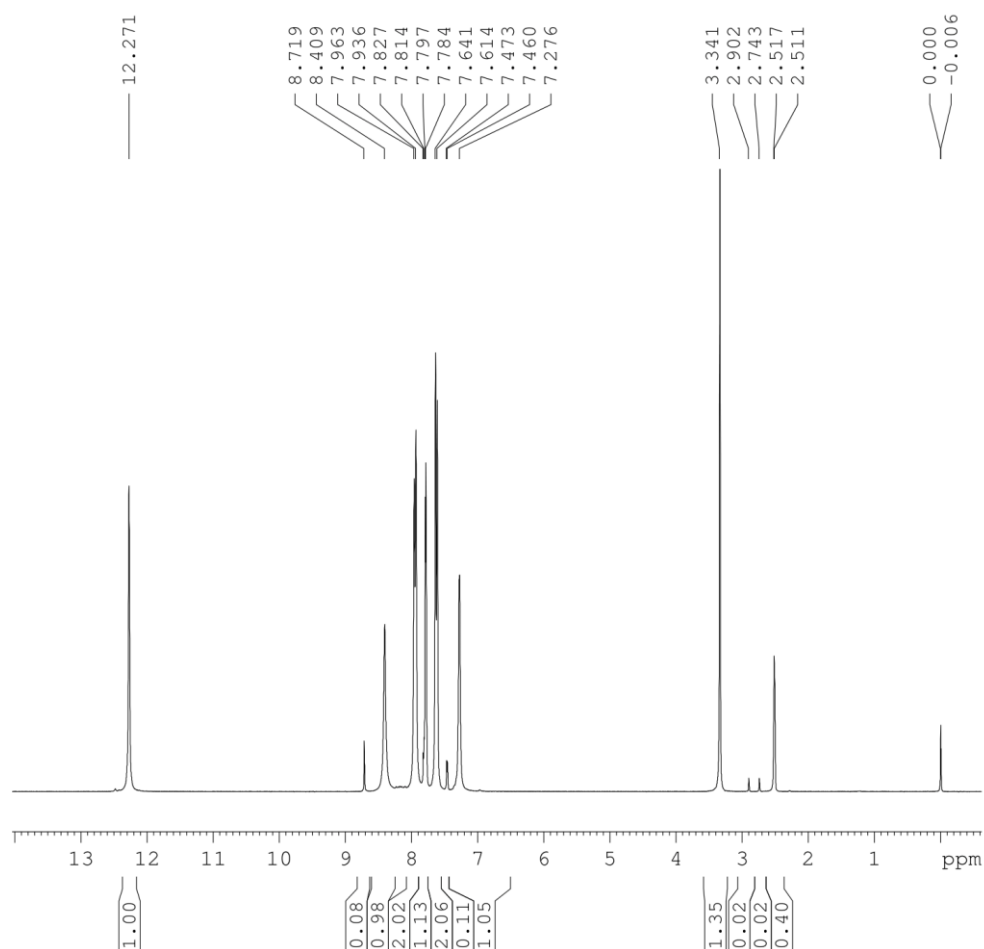
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) Sinais (ppm): amino (-NH): 12,101; grupo azo (-C=N): 8,409; e sinais de presença do anel aromático (H11/H15 = 7,94; H12/H14 = 7,09), furano (H3 = 7,94; H4 = 7,25) e metoxi (H17: 3,853).

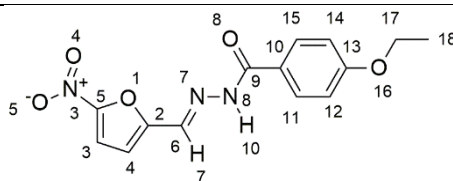




Composto 19

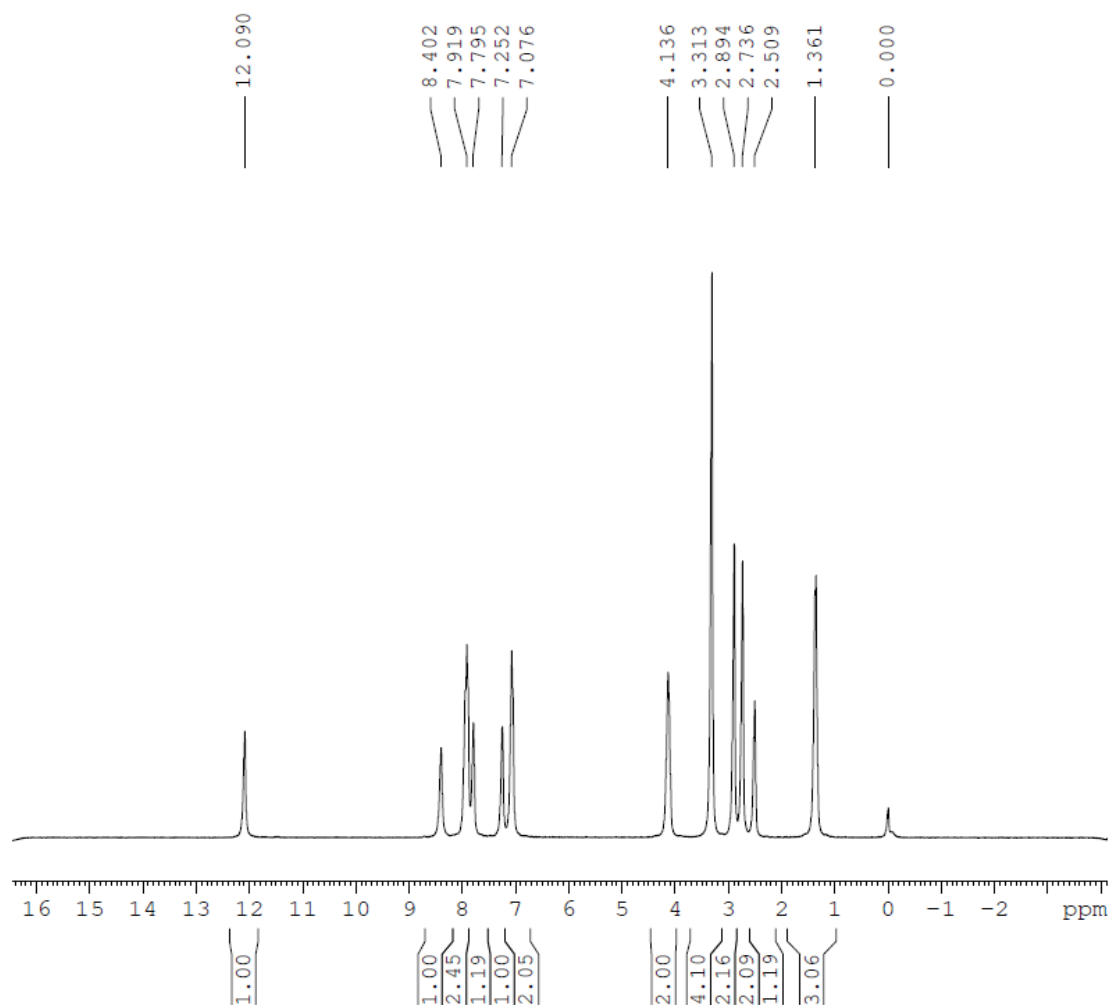
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) Sinais (ppm): amino (-NH): 12,27; grupo azo (-C=N): 8,40; e sinais de presença do anel aromático (H11/H15 = 7,96; H12/H14 = 7,82), furano (H3 = 7,27; H4 = 7,82).

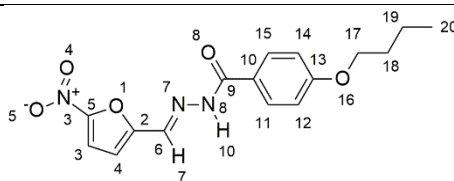




Composto 24

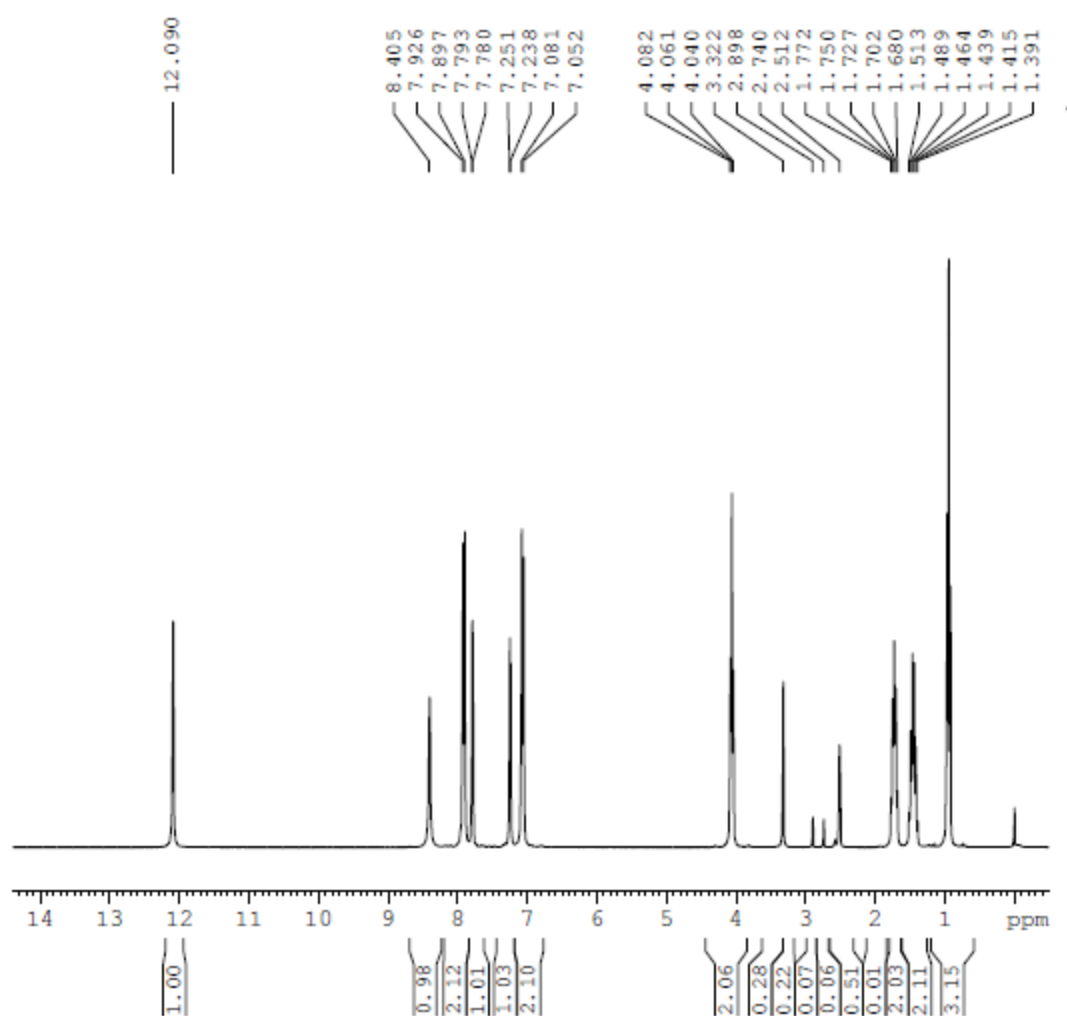
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) Sinais (ppm): amino (-NH): 12,09; grupo azo (-C=N): 8,40; e sinais de presença do anel aromático (H11/H15 = 7,91; H12/H14 = 7,07), furano (H3 = 7,79; H4 = 7,25) e etoxi (H16: 4,13; H17: 1,36),

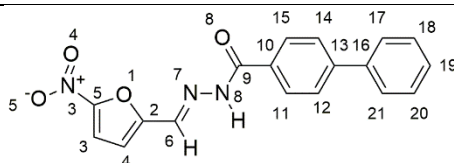




Composto 34

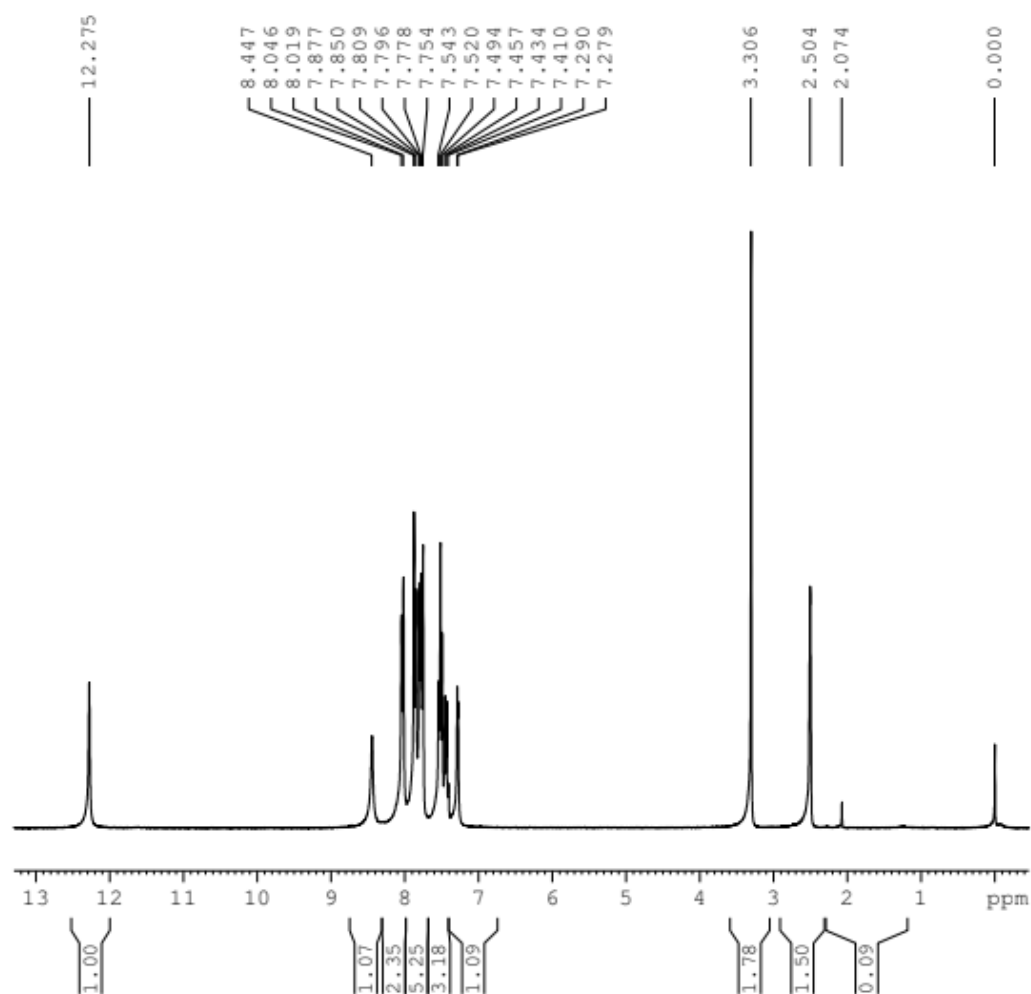
Sinais (ppm): amino (-NH): 12,90; grupo azo (-C=N): 8,405; e sinais de presença do anel aromático (H11/H15 = 7,92; H12/H14 = 7,052), furano (H3 = 7,79; H4 = 7,25) e butoxi (H17: 4,05; H18: 1,72-1,68; H19: 1,48; H20: 1,39),

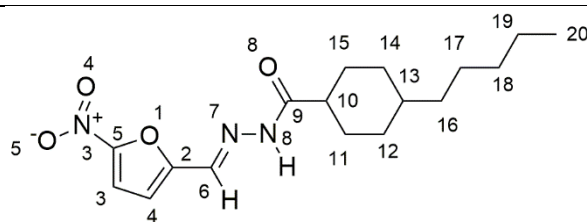




Composto 35

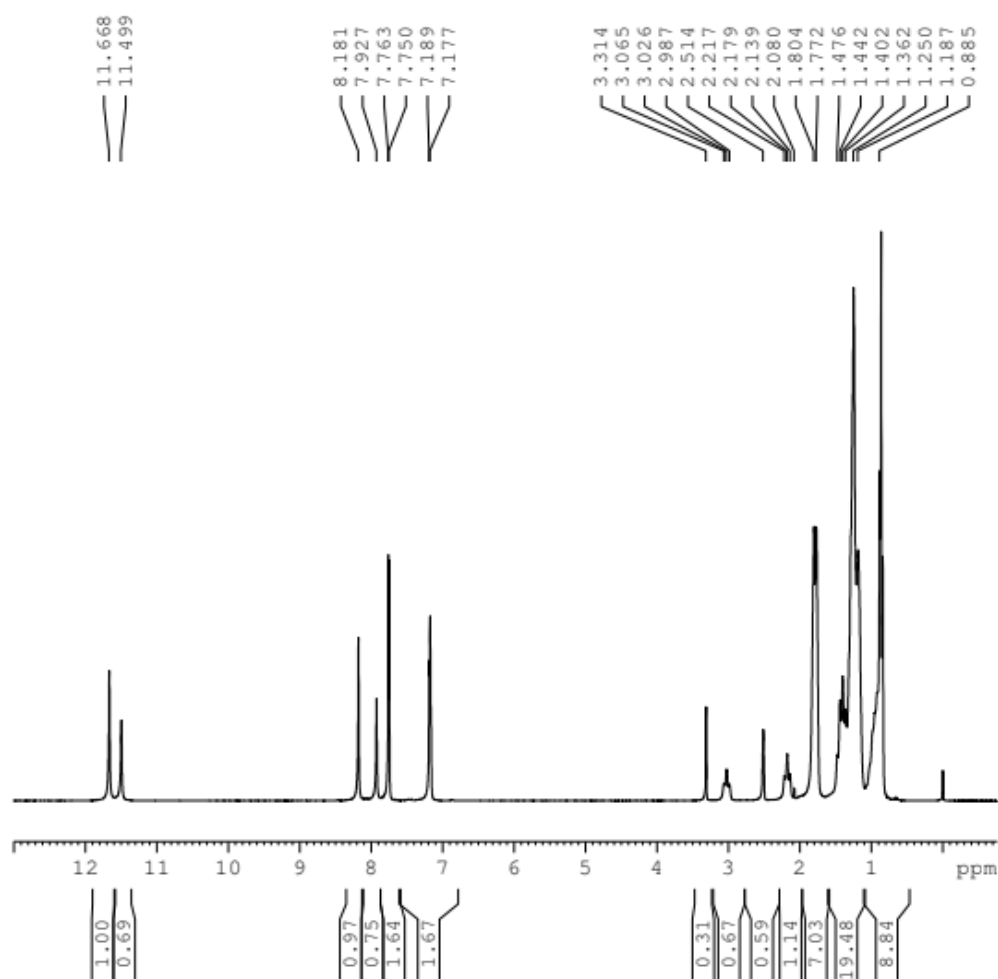
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) Sinais (ppm): amino (-NH): 12,27; grupo azo (-C=N): 8,44; e sinais de presença do anel aromático bifenil (H11/H15 = 8,04; H12/H14 = 7,817; H4, H14, H21: 7,85-7,75; H18,H19,H20:7,45-7,29) e furano (H3 = 7,8; H4 = 8,01)

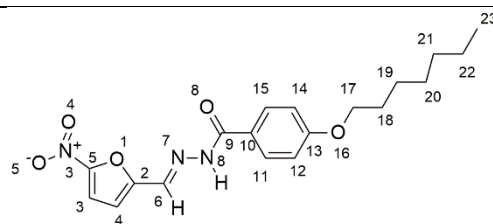




Composto 37

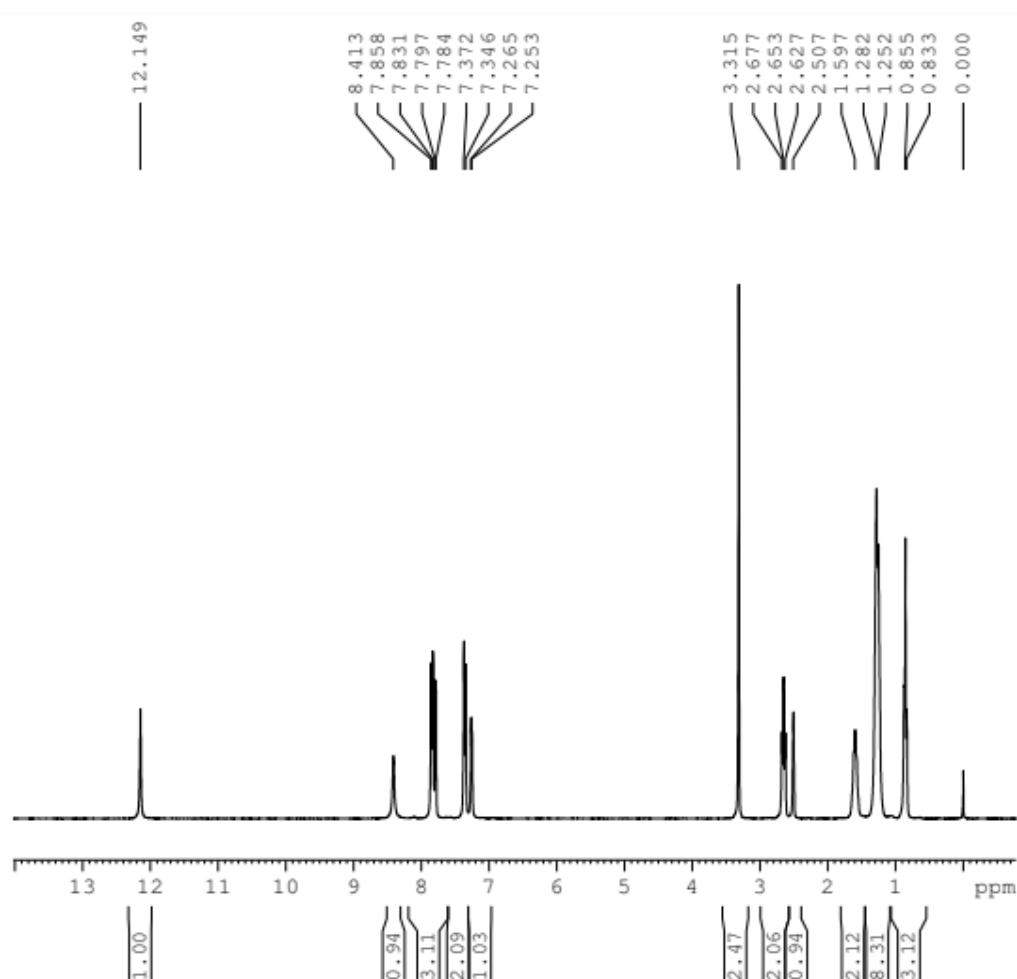
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) Sinais (ppm): amino (-NH):11,66/11,49; grupo azo (-C=N): ppm 8,18 e sinais de presença do furano (H3 = 7,18; H4 = 7,76),





Composto 40

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) Sinais (ppm): amino (-NH):12,149; grupo azo (-C=N): ppm 8,41 e sinais de presença do anel aromático (H11/H15 = 7,85; H12/H14 = 7,26), furano (H3 = 7,37; H4 = 7,79) e heptoxi (H17: 2,65; H18: 1,59; H19-H22: 1,28-1,25; H23: 0,85)



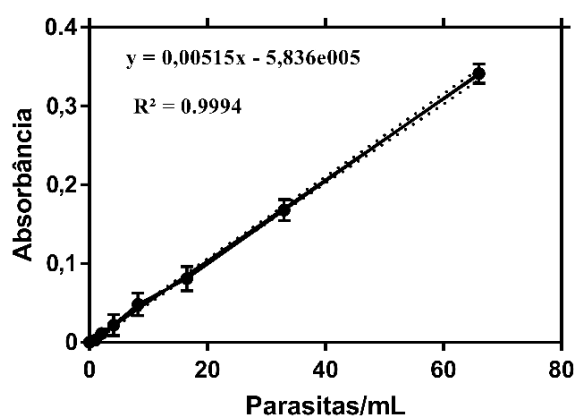
ANEXO 3 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA CULTURAS DE PROMASTIGOTAS DE *L. (L.) INFANTUM*

Valores de parasitas/mL e absorbância em comprimento de onda ajustado para 590 nm determinados por MTT utilizados para construção da curva de calibração para *L. (L.) infantum*.

Concentração	Absorbância
parasitas/mL (*10 ⁶)	(média±dp)
66	0,341 ± 0,012
33	0,168 ± 0,013
16,5	0,081 ± 0,015
8,25	0,048 ± 0,014
4,13	0,022 ± 0,013
2,06	0,011 ± 0,006
1,03	0,003 ± 0,007
0,00	0,00 ± 0,004

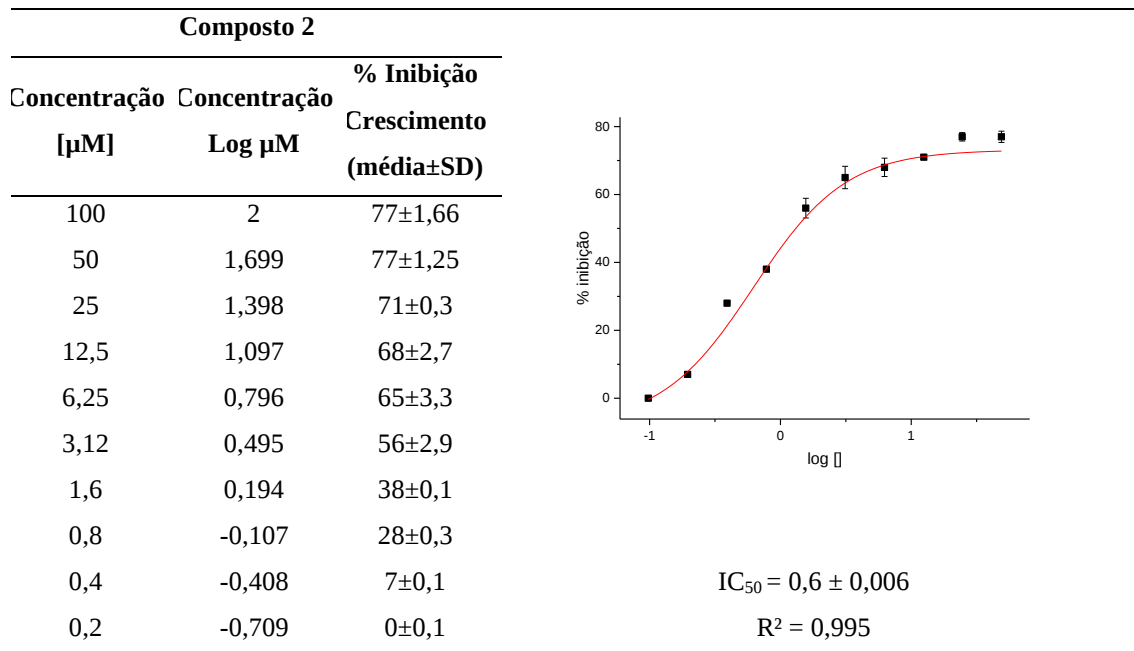
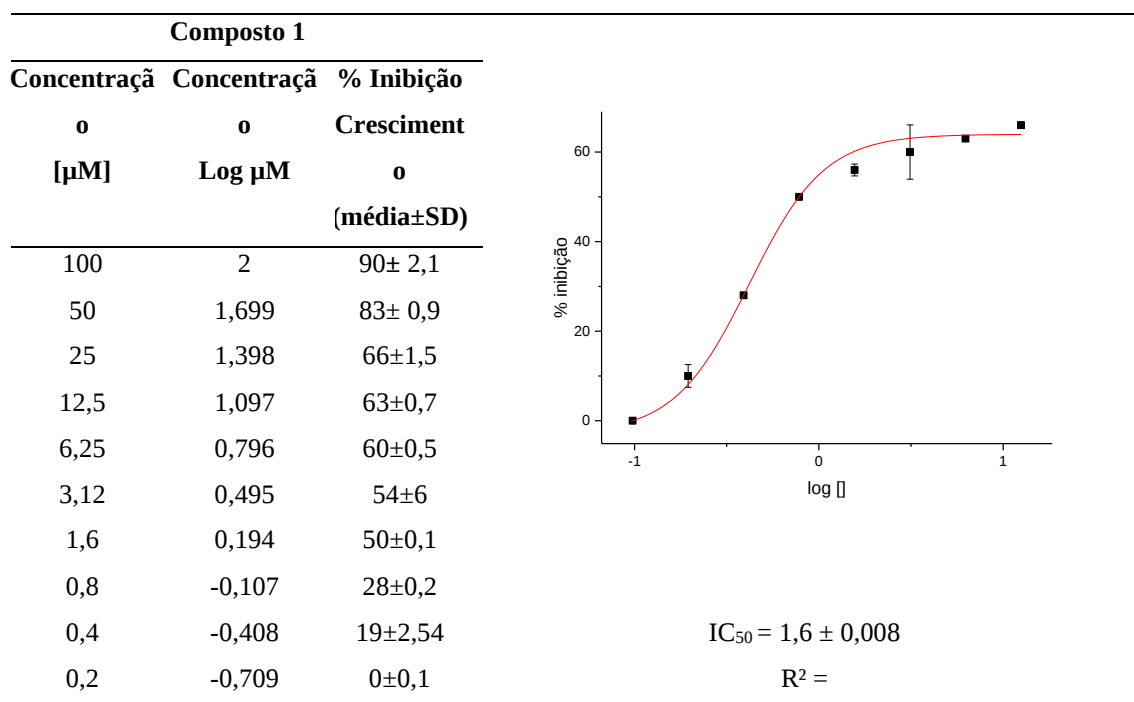
Dados apresentados em média e desvio-padrão (dp) de ensaios realizados em triplicata.

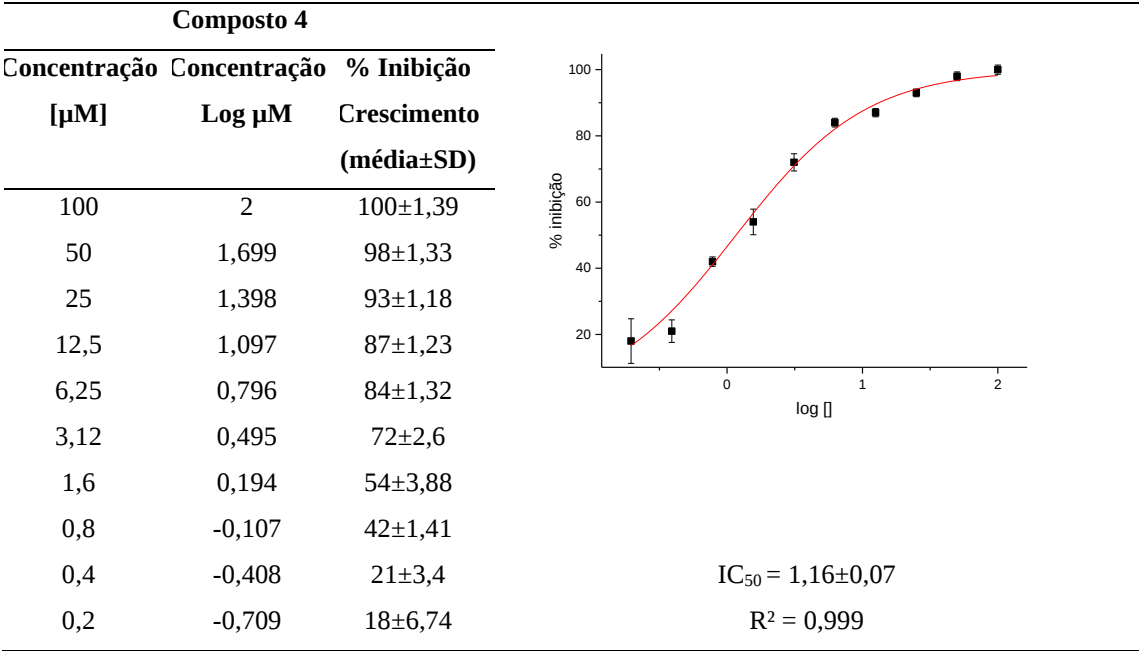
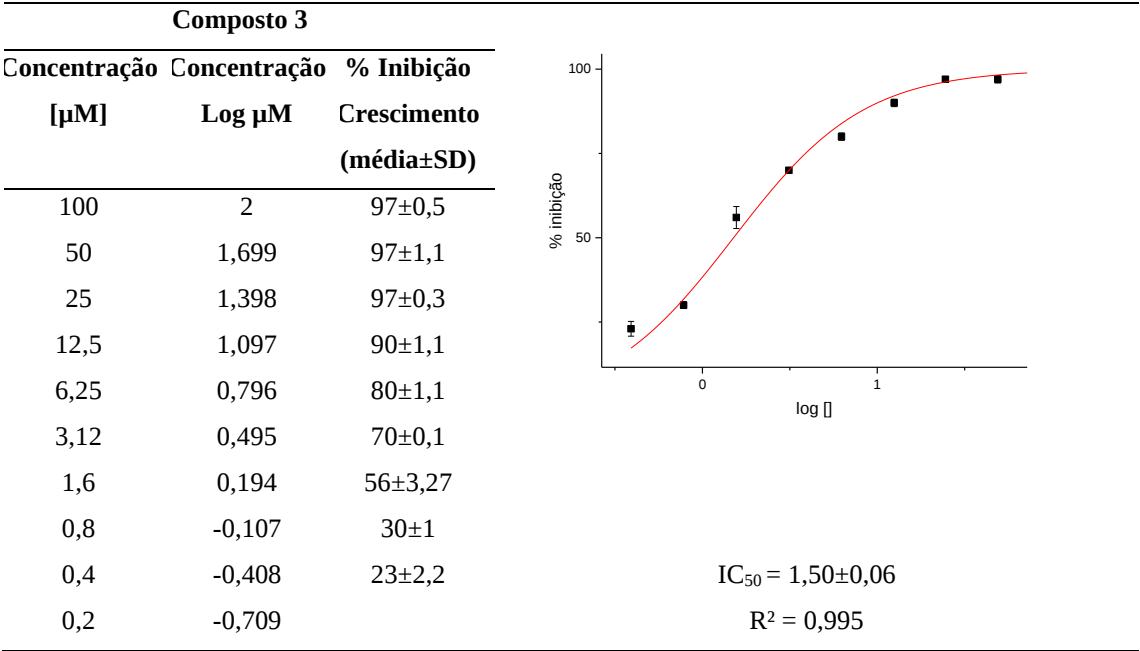
Curva de calibração para culturas de promastigotas de *L. (L.) infantum*.



Equação da curva e do coeficiente de determinação linear (R^2), obtidos a partir de regressão linear da absorbância ($\lambda = 590$ nm) versus números de parasitas/mL. Intervalo de confiança de 95% (linhas pontilhadas). $P > 0,0001$.

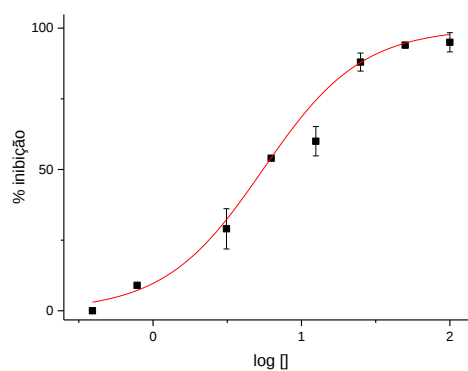
ANEXO 4 – CURVAS DOSE-RESPOSTA CORRESPONDENTES À INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO PARASITÁRIO PARA AS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. (L.) INFANTUM*.





Composto 5

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	95±3,4
50	1,699	94±0,9
25	1,398	88±3,2
12,5	1,097	88±5,2
6,25	0,796	60±0,1
3,12	0,495	29±7,12
1,6	0,194	9±0,1
0,8	-0,107	0±0,1
0,4	-0,408	-
0,2	-0,709	-

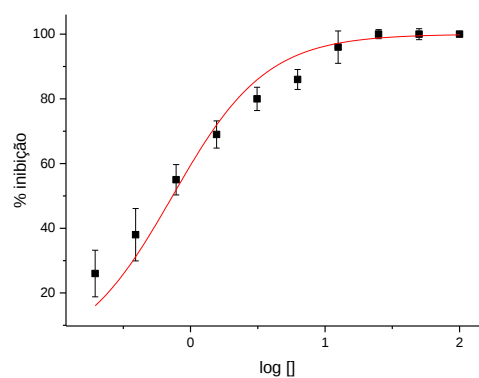


$$IC_{50} = 5,50 \pm 0,23$$

$$R^2 = 0,991$$

Composto 6

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	100±1,39
50	1,699	98±1,33
25	1,398	93±1,18
12,5	1,097	87±1,23
6,25	0,796	84±1,32
3,12	0,495	72±2,6
1,6	0,194	54±3,88
0,8	-0,107	42±1,41
0,4	-0,408	21±3,4
0,2	-0,709	18±6,74

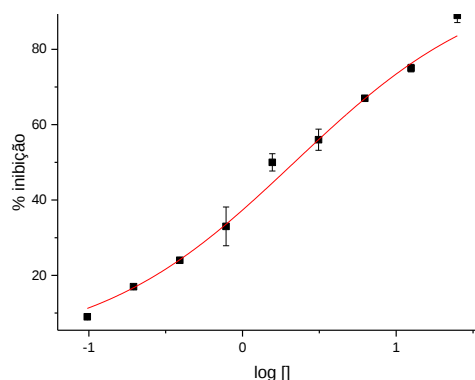


$$IC_{50} = 0,73 \pm 0,07$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 7

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	96±1
50	1,699	96±1,3
25	1,398	91±0,9
12,5	1,097	75±0,4
6,25	0,796	67±2,8
3,12	0,495	56±2,3
1,6	0,194	50±5,4
0,8	-0,107	39±0,1
0,4	-0,408	24±0,1
0,2	-0,709	17±0,4

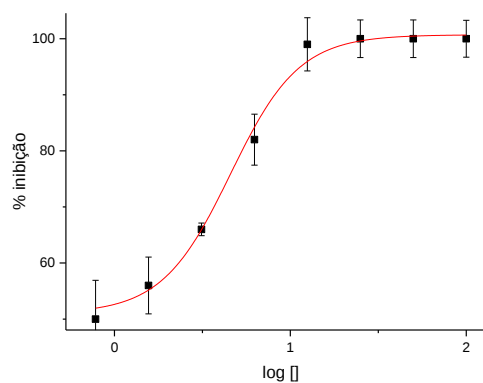


$$IC_{50} = 2,17 \pm 0,097$$

$$R^2 = 0,996$$

Composto 8

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	95± 0,46
50	1,699	96 ± 5,44
25	1,398	95 ± 3,03
12,5	1,097	84 ± 4,13
6,25	0,796	74 ± 3,72
3,12	0,495	46 ± 3,79
1,6	0,194	42 ± 1,51
0,8	-0,107	36 ± 6,56
0,4	-0,408	-
0,2	-0,709	-

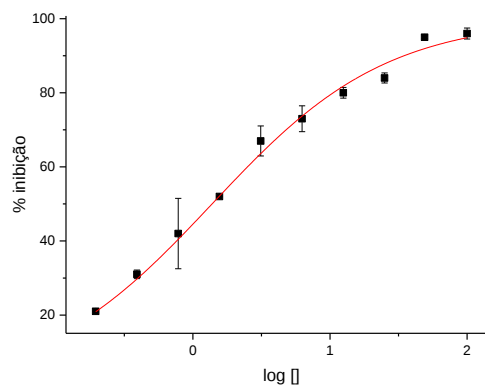


$$IC_{50} = 4,56 \pm 0,4$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 9

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	96± 1,46
50	1,699	95 ± 0,4
25	1,398	84 ± 3,03
12,5	1,097	80 ± 1,36
6,25	0,796	73 ± 1,4
3,12	0,495	67 ± 3,5
1,6	0,194	52 ± 4
0,8	-0,107	42 ± 0,1
0,4	-0,408	31± 9,5
0,2	-0,709	21 ± 1,1

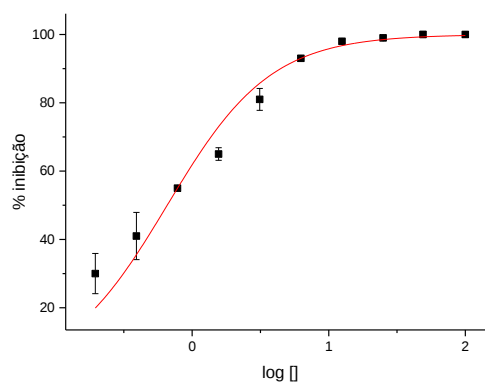


$$IC_{50} = 1,37 \pm 0,022$$

$$R^2 = 0,998$$

Composto 10

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	100± 0,9
50	1,699	100± 0,4
25	1,398	99± 0,5
12,5	1,097	93± 0,8
6,25	0,796	81 ± 3,2
3,12	0,495	65 ± 1,7
1,6	0,194	55 ± 0,1
0,8	-0,107	41 ± 6,9
0,4	-0,408	30± 5,8
0,2	-0,709	-

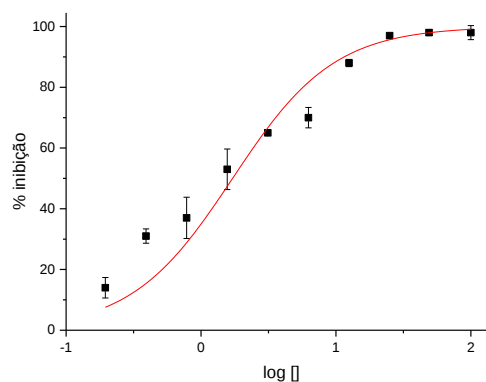


$$IC_{50} = 0,65 \pm 0,0053$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 11

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	97 ± 1,39
50	1,699	97 ± 0,2
25	1,398	93 ± 0,4
12,5	1,097	81 ± 0,8
6,25	0,796	71 ± 1,03
3,12	0,495	68 ± 3,11
1,6	0,194	57 ± 5,69
0,8	-0,107	51 ± 2,38
0,4	-0,408	37 ± 0,1
0,2	-0,709	22 ± 4,62

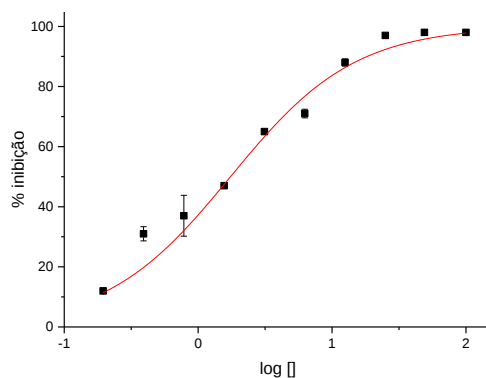


$$IC_{50} = 0,82 \pm 0,039$$

$$R^2 = 0,997$$

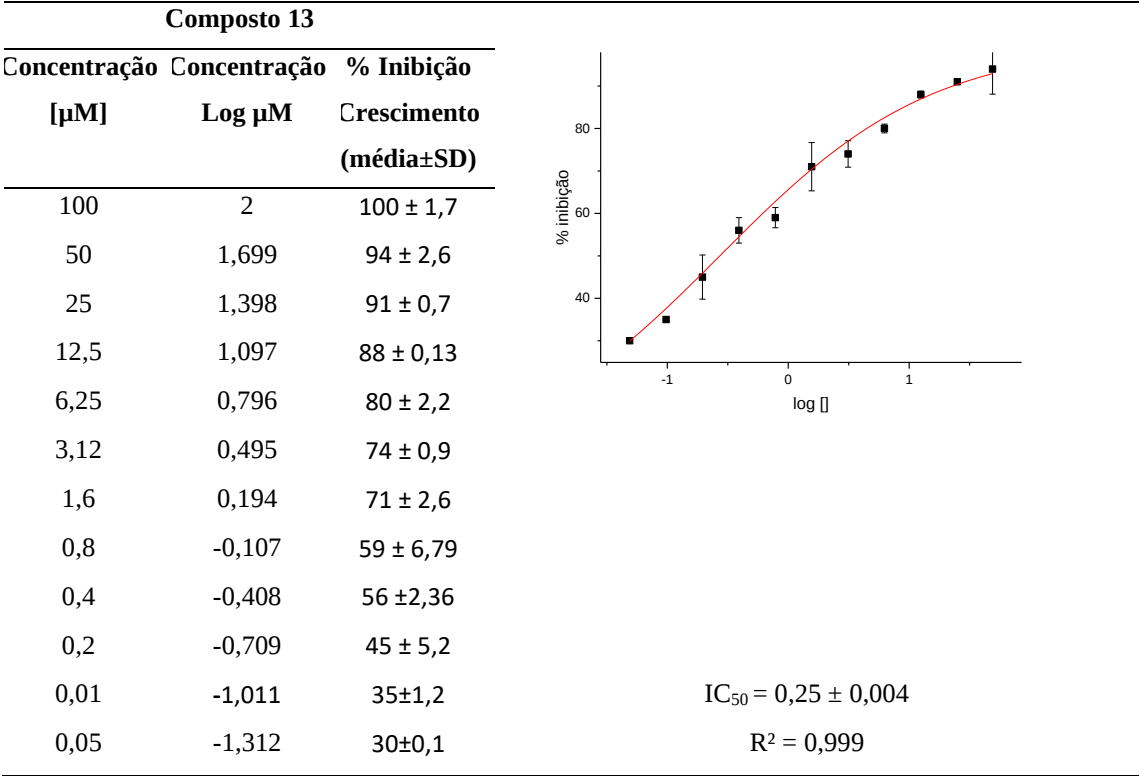
Composto 12

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	98 ± 0,1
50	1,699	98 ± 0,9
25	1,398	97 ± 0,2
12,5	1,097	88 ± 1,19
6,25	0,796	71 ± 1,43
3,12	0,495	65 ± 0,7
1,6	0,194	47 ± 0,1
0,8	-0,107	37 ± 6,79
0,4	-0,408	31 ± 2,36
0,2	-0,709	12 ± 0,1



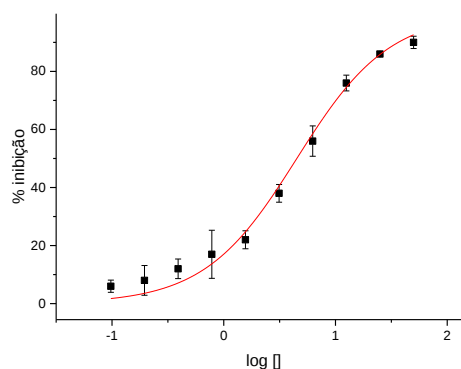
$$IC_{50} = 1,74 \pm 0,048$$

$$R^2 = 0,999$$



Composto 15

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	-
50	1,699	90 ± 2,12
25	1,398	86 ± 0,5
12,5	1,097	76 ± 2,71
6,25	0,796	56 ± 5,23
3,12	0,495	38 ± 3,06
1,6	0,194	22 ± 3,09
0,8	-0,107	17 ± 8,27
0,4	-0,408	12 ± 3,38
0,2	-0,709	8 ± 5,12
0,01	-1,011	6 ± 2,09

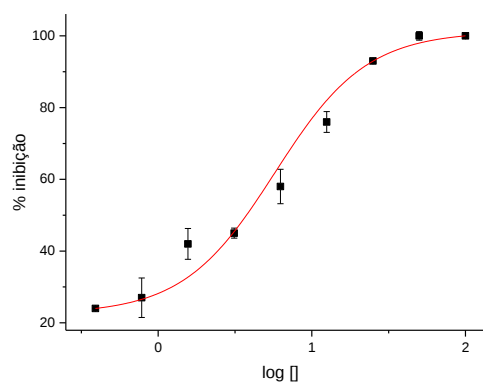


$$IC_{50} = 4,50 \pm 0,318$$

$$R^2 = 0,995$$

Composto 16

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	100±1,1 -
50	1,699	93± 0,4
25	1,398	76 ± 2,9
12,5	1,097	58 ± 4,89
6,25	0,796	45 ± 1,4
3,12	0,495	42 ± 4,3
1,6	0,194	27 ± 5,5
0,8	-0,107	24 ± 0,1
0,4	-0,408	-
0,2	-0,709	-

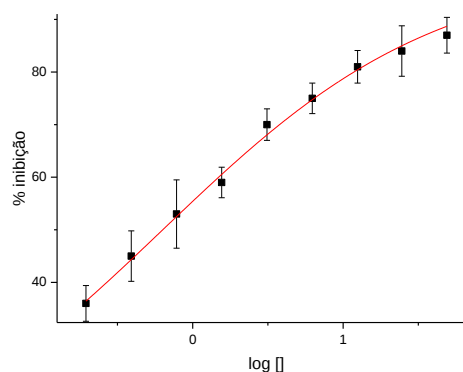


$$IC_{50} = 5,74 \pm 0,37$$

$$R^2 = 0,995$$

Composto 17

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	-
50	1,699	-
25	1,398	84 ± 4,8
12,5	1,097	81 ± 4,31
6,25	0,796	75 ± 2,9
3,12	0,495	70 ± 3
1,6	0,194	59 ± 2,9
0,8	-0,107	53 ± 6,5
0,4	-0,408	45 ± 4,8
0,2	-0,709	36 ± 3,4

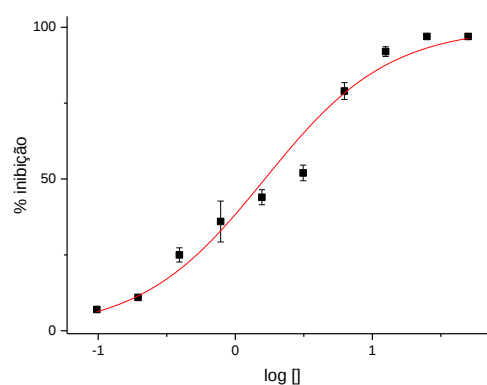


$$IC_{50} = 0,8 \pm 0,03$$

$$R^2 = 0,993$$

Composto 18

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	-
50	1,699	97 ± 0,5
25	1,398	98 ± 0,6
12,5	1,097	94 ± 1,62
6,25	0,796	79 ± 2,77
3,12	0,495	52 ± 2,57
1,6	0,194	44 ± 2,49
0,8	-0,107	36 ± 6,75
0,4	-0,408	25 ± 2,35
0,2	-0,709	11 ± 0,1
0,01	-1,011	7 ± 0,1

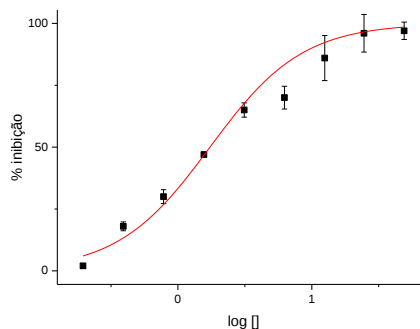


$$IC_{50} = 1,64 \pm 0,1985$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 19

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	-
50	1,699	97 ± 3,5
25	1,398	96 ± 7,6
12,5	1,097	86 ± 9,1
6,25	0,796	70 ± 4,6
3,12	0,495	65 ± 2,9
1,6	0,194	47 ± 0,7
0,8	-0,107	30 ± 2,8
0,4	-0,408	18 ± 1,8
0,2	-0,709	2 ± 1

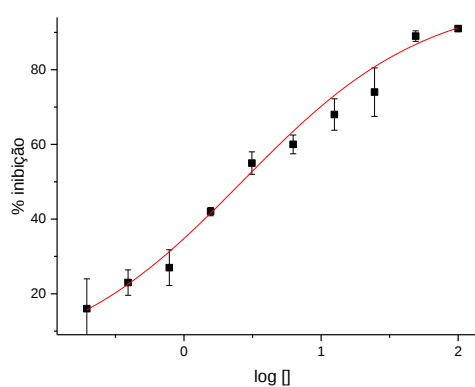


$$IC_{50} = 1,75 \pm 0,086$$

$$R^2 = 0,998$$

Composto 20

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	91 ± 0,7
50	1,699	89 ± 1,4
25	1,398	74 ± 6,5
12,5	1,097	68 ± 4,2
6,25	0,796	60 ± 2,5
3,12	0,495	55 ± 3
1,6	0,194	42 ± 1,1
0,8	-0,107	27 ± 4,8
0,4	-0,408	23 ± 3,4
0,2	-0,709	16 ± 8

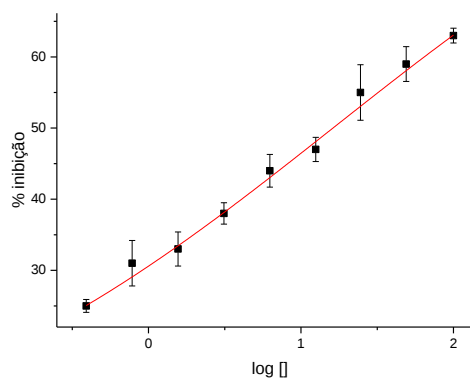


$$IC_{50} = 2,64 \pm 0,14$$

$$R^2 = 0,995$$

Composto 21

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	61±1,04
50	1,699	55±2,44
25	1,398	52±3,9
12,5	1,097	46±1,7
6,25	0,796	43±2,3
3,12	0,495	39±1,5
1,6	0,194	38±2,4
0,8	-0,107	28±3,2
0,4	-0,408	24±0,9
0,2	-0,709	

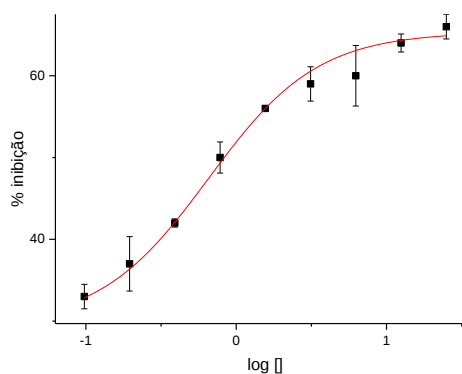


$$IC_{50} = 16,2 \pm 0,65$$

$$R^2 = 0,998$$

Composto 22

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	-
50	1,699	-
25	1,398	66 ± 1,5
12,5	1,097	64 ± 1,1
6,25	0,796	60 ± 3,7
3,12	0,495	59 ± 2,1
1,6	0,194	56 ± 0,1
0,8	-0,107	50 ± 1,9
0,4	-0,408	42 ± 0,5
0,2	-0,709	35 ± 3,33
0,01	-1,011	33 ± 1,5

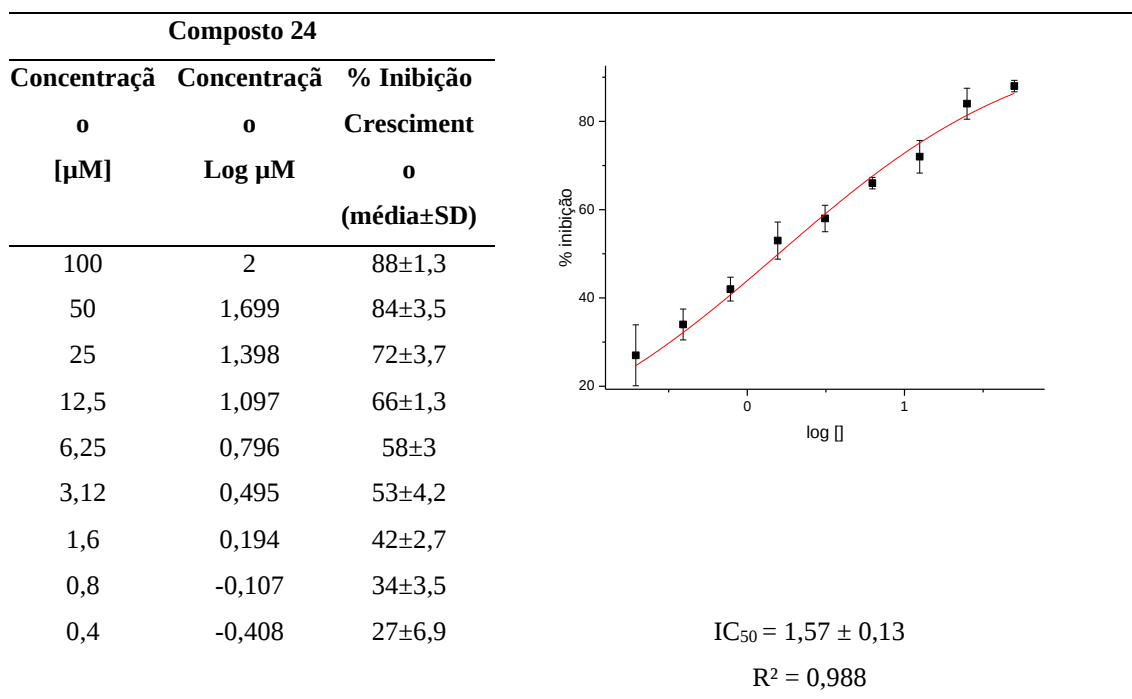
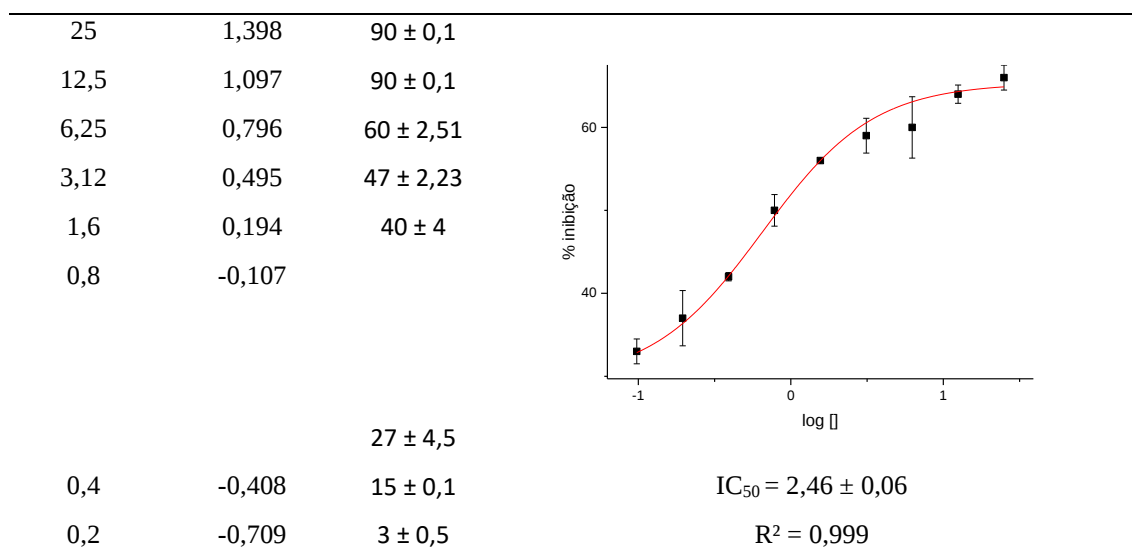


$$IC_{50} = 0,65 \pm 0,06$$

$$R^2 = 0,998$$

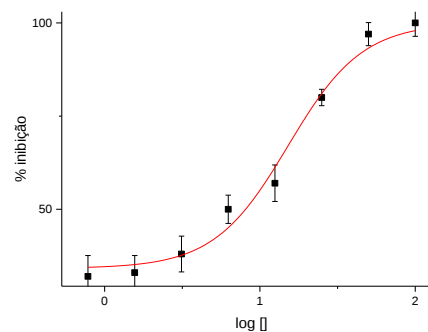
Composto 23

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	-
50	1,699	-



Composto 25

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	100±3,6
50	1,699	97±3,1
25	1,398	80±2,2
12,5	1,097	57±4,9
6,25	0,796	50±3,79
3,12	0,495	38±4,8
1,6	0,194	33±4,6
0,8	-0,107	32±5,6
0,4	-0,408	-
0,2	-0,709	-

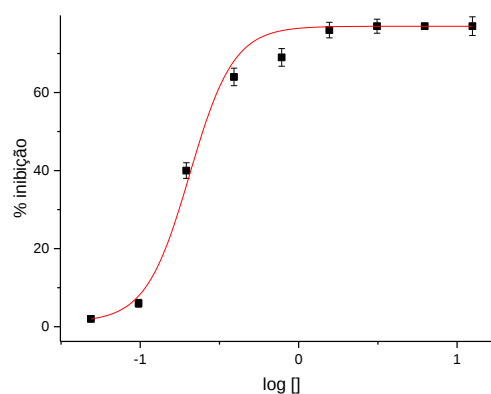


$$IC_{50} = 15,72 \pm 1,84$$

$$R^2 = 0,98$$

Composto 27

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	
50	1,699	78 ± 3,5
25	1,398	78 ± 1,2
12,5	1,097	74±0,1
6,25	0,796	62±2,77
3,12	0,495	58±4,85
1,6	0,194	55±5,5
0,8	-0,107	45±3,64
0,4	-0,408	36±0,1
0,2	-0,709	9±5,5
0,01	-1,011	9±0,1

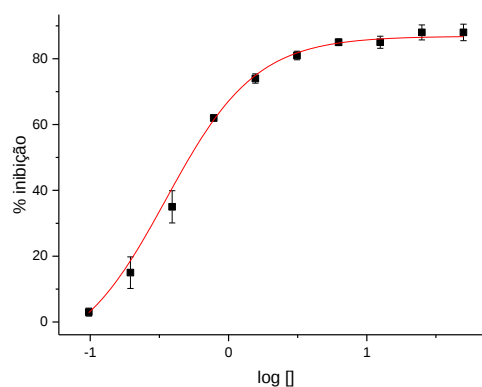


$$IC_{50} = 0,38 \pm 0,012$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 28

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	-
50	1,699	88±2,51
25	1,398	88±2,28
12,5	1,097	85±1,84
6,25	0,796	85±1
3,12	0,495	81±1,304
1,6	0,194	74±1,42
0,8	-0,107	62±0,9
0,4	-0,408	35±4,9
0,2	-0,709	15±4,8
0,01	-1,011	3±1,22

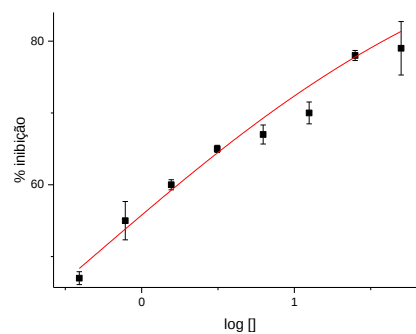


$$IC_{50} = 0,35 \pm 0,049$$

$$R^2 = 0,998$$

Composto 29

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	-
50	1,699	79± 3,72
25	1,398	78 ± 0,7
12,5	1,097	70 ± 1,52
6,25	0,796	67 ± 1,33
3,12	0,495	65 ± 0,5
1,6	0,194	60 ± 0,7
0,8	-0,107	55± 2,67
0,4	-0,408	47± 0,9
0,2	-0,709	14 ± 3,24

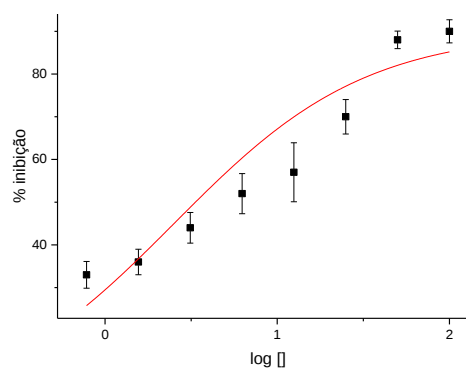


$$IC_{50} = 0,48 \pm 0,05$$

$$R^2 = 0,98$$

Composto 30

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	90 ± 2,7
50	1,699	90 ± 2,06
25	1,398	70 ± 4,03
12,5	1,097	57 ± 6,9
6,25	0,796	52 ± 4,7
3,12	0,495	44 ± 3,58
1,6	0,194	36 ± 2,98
0,8	-0,107	33 ± 3,13
0,4	-0,408	-
0,2	-0,709	-

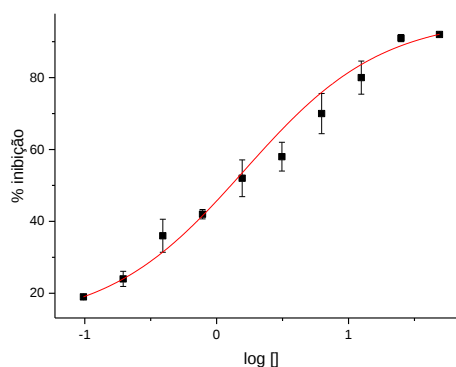


$$IC_{50} = 3,5 \pm 0,4$$

$$R^2 = 0,98$$

Composto 32

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	-
50	1,699	92 ± 0,2
25	1,398	91 ± 1
12,5	1,097	80 ± 4,6
6,25	0,796	70 ± 5,6
3,12	0,495	58 ± 4
1,6	0,194	52 ± 5,11
0,8	-0,107	42 ± 1,3
0,4	-0,408	36 ± 6,8
0,2	-0,709	24 ± 2,1
0,01	-1,011	19 ± 0,1

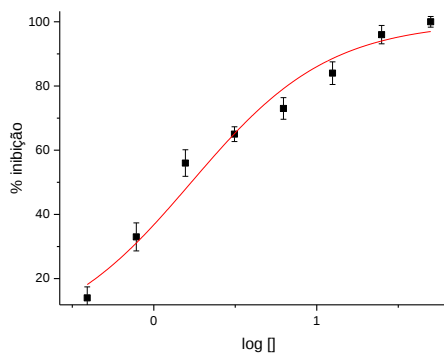


$$IC_{50} = 1,26 \pm 0,18$$

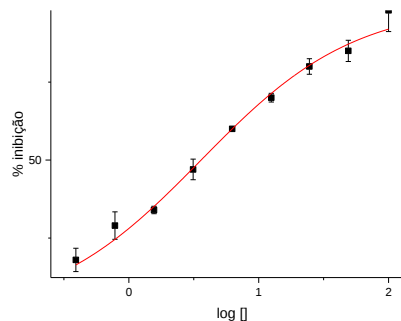
$$R^2 = 0,999$$

Composto 33

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	-
50	1,699	100 ± 1,67
25	1,398	96 ± 2,86
12,5	1,097	84 ± 3,52
6,25	0,796	73 ± 3,37
3,12	0,495	65 ± 2,31
1,6	0,194	56 ± 4,14
0,8	-0,107	33 ± 4,36
0,4	-0,408	14 ± 3,42
0,2	-0,709	-

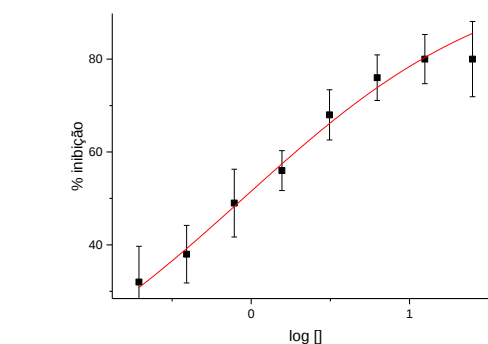

 $IC_{50} = 1,69 \pm 0,18$
 $R^2 = 0,98$
Composto 34

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	98±6,8
50	1,699	85±3,4
25	1,398	80±2,5
12,5	1,097	70±1,4
6,25	0,796	60±0,1
3,12	0,495	47±3,3
1,6	0,194	34±1,2
0,8	-0,107	29±4,4
0,4	-0,408	18±3,74
0,2	-0,709	-


 $IC_{50} = 3,60 \pm 0,0064$
 $R^2 = 0,994$

Composto 35

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	98±6,8
50	1,699	85±3,4
25	1,398	80±8,1
12,5	1,097	80±5,3
6,25	0,796	76±4,9
3,12	0,495	68±5,4
1,6	0,194	50 ±4,3
0,8	-0,107	49±7,3
0,4	-0,408	38±6,2
0,2	-0,709	32±7,7

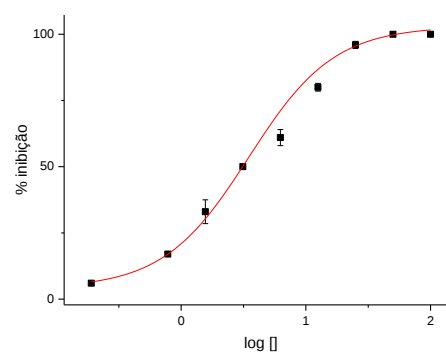


$$IC_{50} = 1,6 \pm 0,088$$

$$R^2 = 0,98$$

Composto 36

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	100 ± 0,3
50	1,699	100 ± 0,1
25	1,398	96 ± 1,35
12,5	1,097	80 ± 1,47
6,25	0,796	61 ± 3,05
3,12	0,495	50 ± 0,7
1,6	0,194	33 ± 4,5
0,8	-0,107	17 ± 0,1
0,4	-0,408	6 ± 0,5
0,2	-0,709	-

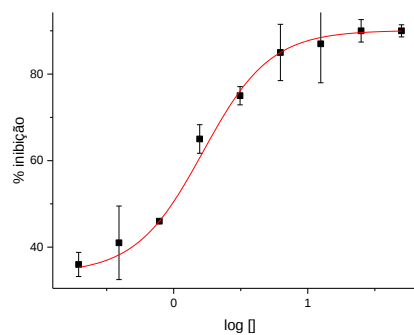


$$IC_{50} = 3,48 \pm 0,31$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 37

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	-
50	1,699	90 ± 1,4
25	1,398	90 ± 2,6
12,5	1,097	87 ± 9
6,25	0,796	85 ± 6,5
3,12	0,495	75 ± 2,1
1,6	0,194	65 ± 3,3
0,8	-0,107	46 ± 0,1
0,4	-0,408	41 ± 8,5
0,2	-0,709	36 ± 2,8
0,01	-1,011	

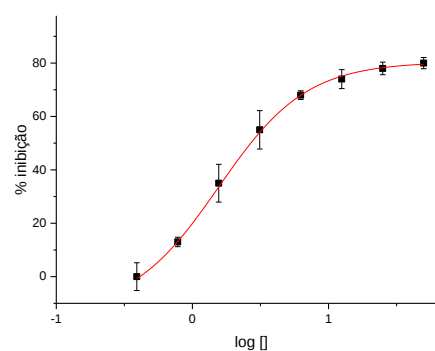


$$IC_{50} = 1,65 \pm 0,12$$

$$R^2 = 0,998$$

Composto 38

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	-
50	1,699	80 ± 0,55
25	1,398	78 ± 0,7
12,5	1,097	74 ± 1,04
6,25	0,796	68 ± 1,98
3,12	0,495	55 ± 1,76
1,6	0,194	35 ± 0,67
0,8	-0,107	13 ± 1,48
0,4	-0,408	0 ± 2,36
		-

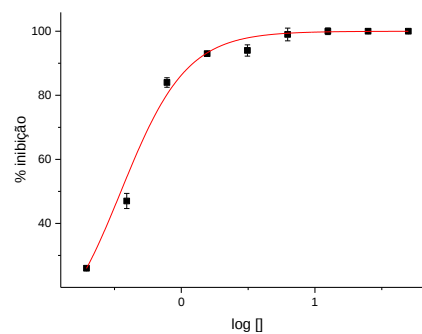


$$IC_{50} = 1,55 \pm 0,11$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 39

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
100	2	-
50	1,699	100 ± 0,55
25	1,398	100 ± 0,7
12,5	1,097	100 ± 1,04
6,25	0,796	99 ± 1,98
3,12	0,495	94 ± 1,76
1,6	0,194	93 ± 0,67
0,8	-0,107	84 ± 1,48
0,4	-0,408	47 ± 2,36
0,2	-0,709	26 ± 0,3

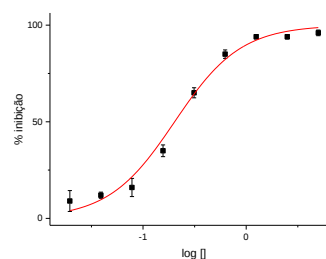


$$IC_{50} = 0,35 \pm 0,008$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 40

Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento (média±SD)
5	0,699	96±1,47
2,5	0,398	94±1,16
1,25	0,097	94±1,16
0,625	-0,204	85±2,19
0,312	-0,505	65±2,6
0,156	-0,806	35±3,03
0,0781	-1,107	16±4,7
0,039	-1,408	12±1,59
0,0195	-1,709	9±5,4

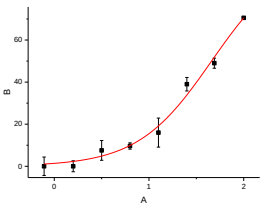
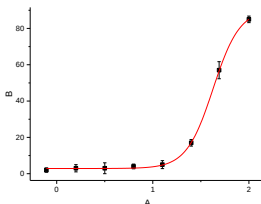
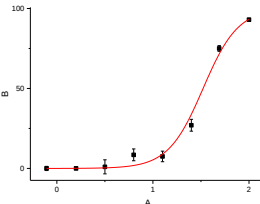


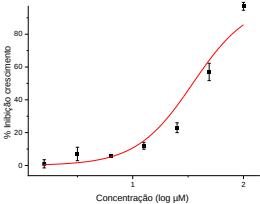
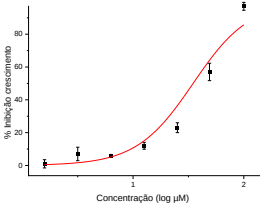
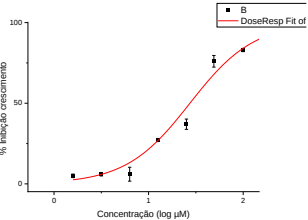
$$IC_{50} = 0,207 \pm 0,0195$$

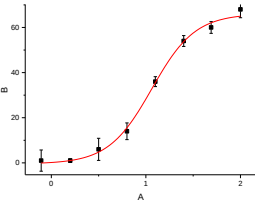
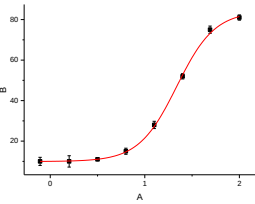
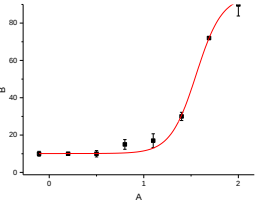
$$R^2 = 0,999$$

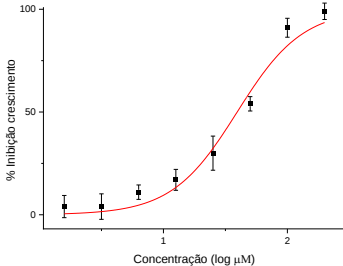
ANEXO 5 – CURVAS DOSE-RESPOSTA RELATIVAS À TOXICIDADE DOS COMPOSTOS FRENTE A CÉLULAS THP-1 DURANTE 24, 48 E 72 HORAS.

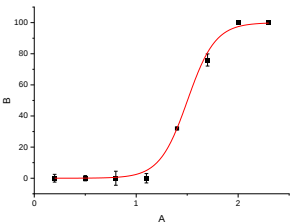
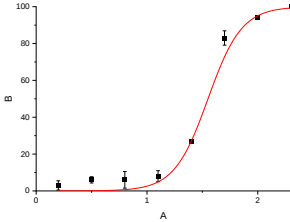
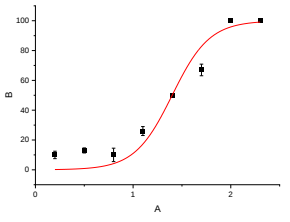
Compostos	CC ₅₀ (μM)		
	24 h	48 h	72 h
1	>200	> 100	97,97 ± 17,94
2	>200	> 100	> 100
8	43,43 ± 0,9	49,42 ± 6,6	53,188 ± 3,96
13	30,28 ± 3,9	35,34 ± 5,39	30,23 ± 2,59
15	50 ± 0,9	45 ± 0,9	27,33 ± 1,35
39	>100	>100	>100
40	>200	>100	>100
AMB	32,55 ± 2,8	35,55 ± 1	25,1 ± 0,8
MT	18,47 ± 0,3	14,49 ± 0,04	7,47 ± 0,08
NF	>200	>100	38,75 ± 4,94

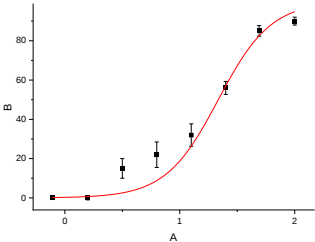
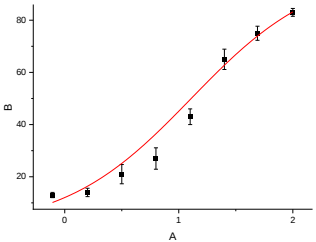
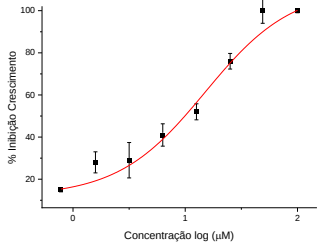
Composto 8				
Concentração	Concentração	% Inibição	% Inibição	% Inibição
[µM]	Log µM	Crescimento	Crescimento	Crescimento
		24 h	48 h	72 h
		(média±SD)	(média±SD)	(média±SD)
100	2	70,55 ± 0,06	85 ± 1,8	93 ± 0,4
50	1,699	49 ± 2,4	57 ± 4,7	75 ± 1,8
25	1,398	39 ± 3,2	17 ±1,8	27± 3,7
12,5	1,097	16 ± 6,9	5 ±2,2	8,49 ± 2,7
6,25	0,796	9,63 ±1,5	4 ±1,3	7,51 ± 3,7
3,12	0,495	7,54 ± 4,7	3 ±1,5	1 ± 4,4
1,6	0,194	0 ±2,6	3 ±1,9	0 ± 0,4
0,8	-0,107	0 ± 4,4	2 ±1,2	0 ± 1,3
24h		48h	72h	
				
IC ₅₀ = 45,78 ± 1,54		IC ₅₀ = 47,31 ±2,48	IC ₅₀ = 33,26 ±1,61	
R ² = 0,997		R ² =0,992	R ² =0,999	

Composto 13				
Concentração [µM]	Concentração Log µM	% Inibição Crescimento 24 h (média±SD)	% Inibição Crescimento 48 h (média±SD)	% Inibição Crescimento 72 h (média±SD)
100	2	68 ± 3,7	81 ± 1,3	90 ± 6,2
50	1,699	60 ± 2,6	75 ± 1,8	72 ± 0,7
25	1,398	54 ± 2,4	52 ±1,3	30 ± 2,2
12,5	1,097	36 ± 2,2	28 ±1,8	17 ± 3,7
6,25	0,796	14 ±3,7	15 ±1,5	15 ± 2,6
3,12	0,495	6 ± 4,9	11 ±0,6	10 ± 1,7
1,6	0,194	1 ±0,8	10 ±2,8	10 ± 1,4
0,8	-0,107	1 ± 4,7	10 ±2	10 ± 1,3
24h		48h		72h
				
IC ₅₀ = 27,54 ± 2,63		IC ₅₀ = 21,77 ± 0,56		IC ₅₀ =35,82 ± 3,1
R ² = 0,997		R ² =0,999		R ² =0,999

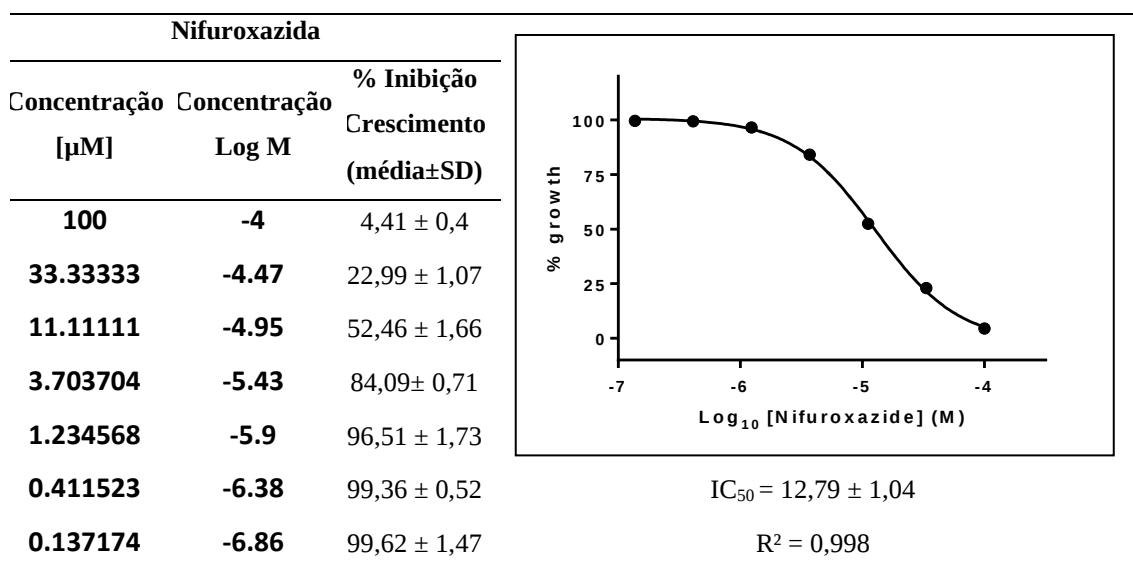
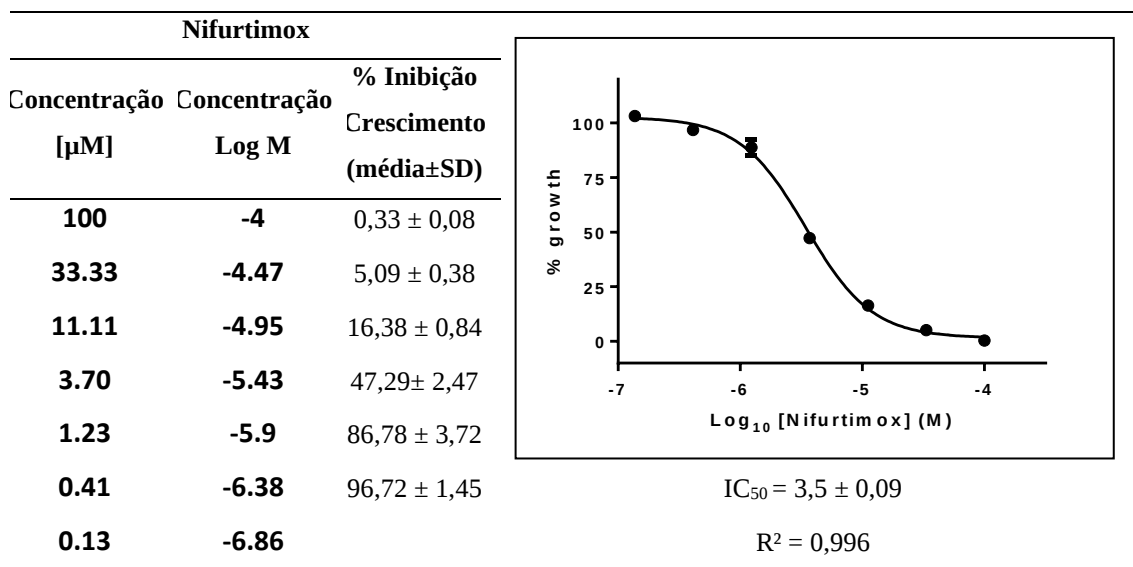
Composto 15				
Concentração [μM]	Concentração Log μM	% Inibição Crescimento 24 h (média±SD)	% Inibição Crescimento 48 h (média±SD)	% Inibição Crescimento 72 h (média±SD)
200	2,3	90 ± 08	100 ± 2	100 ± 1,9
100	2	83 ± 0,4	97 ± 2,4	83 ± 1
50	1,699	50 ± 0,9	57 ± 5,3	76 ± 36
25	1,398	40 ± 1,4	23 ± 3	37 ± 3,2
12,5	1,097	36 ± 2,3	12 ± 2,1	27 ± 0,2
6,25	0,796	23 ± 0,1	6 ± 0,4	6 ± 4,3
3,12	0,495	19 ± 0,9	7 ± 4,1	6 ± 1,08
1,6	0,194	15 ± 1,7	1 ± 2,5	5 ± 1,4
24h		48h		72h
				
IC ₅₀ = 50 ± 0,9		IC ₅₀ = 45 ± 0,9		IC ₅₀ = 27,33 ± 1,35
R ² = 0,98		R ² = 0,96		R ² = 0,99

Nifuroxazida				
Concentração [µM]	Concentração Log µM	% Inibição Crescimento 24 h (média±SD)	% Inibição Crescimento 48 h (média±SD)	% Inibição Crescimento 72 h (média±SD)
200	2,3	> 200	> 100	99 ± 4
100	2			91 ± 4,6
50	1,699			54 ± 3,5
25	1,398			30 ± 8,3
12,5	1,097			17 ± 5,1
6,25	0,796			11 ± 5,5
3,12	0,495			4 ± 6,2
1,6	0,194			4 ± 5,4
24h	48h	72h		
				
< 200	< 100	IC ₅₀ = 38,75 ± 4,94		
R ² = 0,97				

Anforecina B				
Concentração [µM]	Concentração Log µM	% Inibição Crescimento 24 h (média±SD)	% Inibição Crescimento 48 h (média±SD)	% Inibição Crescimento 72 h (média±SD)
200	2,3	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1
100	2	100 ± 0,9	94 ± 0,9	100 ± 0,9
50	1,699	76 ± 3,9	83 ± 5,3	67 ± 3,9
25	1,398	32 ± 0,2	27 ± 0,2	50 ± 0,2
12,5	1,097	0 ± 2,3	8 ± 3	26 ± 3
6,25	0,796	0 ± 0,1	6 ± 5,5	10 ± 4,5
3,12	0,495	0 ± 0,9	6 ± 1,7	13 ± 1,7
1,6	0,194	0 ± 1,7	3 ± 2,5	10 ± 2,5
24h		48h		72h
				
IC ₅₀ = 32,55 ± 2,8		IC ₅₀ = 35,55 ± 1		IC ₅₀ = 25,1 ± 0,8
R ² = 0,98		R ² = 0,99		R ² = 0,98

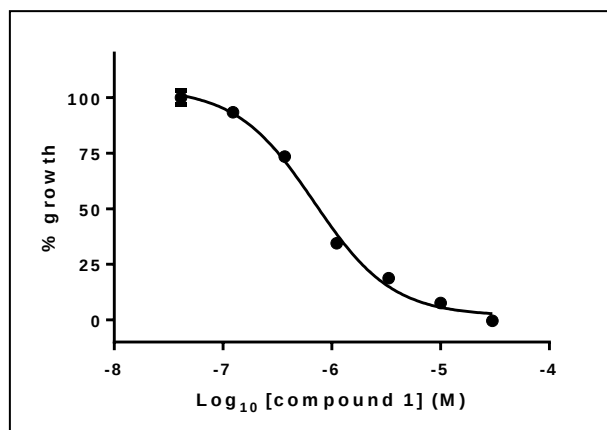
Miltefosina				
Concentração [µM]	Concentração Log µM	% Inibição Crescimento 24 h (média±SD)	% Inibição Crescimento 48 h (média±SD)	% Inibição Crescimento 72 h (média±SD)
200	2,3	-	-	-
100	2	90 ± 2	80 ± 1,5	101 ± 1
50	1,699	85 ± 2	82 ± 2,7	99 ± 0,6
25	1,398	56 ± 3	65 ± 3,9	76 ± 3,7
12,5	1,097	32 ± 5	43 ± 3	52 ± 3,8
6,25	0,796	22 ± 6	27 ± 4,1	41 ± 5,3
3,12	0,495	15 ± 5	21 ± 3,7	29 ± 8,4
1,6	0,194	0 ± 0,1	14 ± 1,6	28 ± 0,1
0,8	-0,1	0 ± 1,2	13 ± 0,6	15 ± 0,1
24h		48h		72h
				
IC ₅₀ = 18,47 ± 0,3 R ² = 0,97		IC ₅₀ = 14,49 ± 0,04 R ² = 0,98		IC ₅₀ = 7,47 ± 0,08 R ² = 0,98

ANEXO 6 - CURVA DOSE-RESPOSTA CORRESPONDENTES À INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO PARASITÁRIO PARA AS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. (L.) MAJOR*



Composto 1

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,04 ± 0,0,15
10	-5	7,5 ± 0,51
3.33	-5.47	18,80 ± 0,26
1.11	-5.95	34,51 ± 0,79
0.3	-6.43	73,47 ± 0,82
0.12	-6.9	93,36 ± 1
0.041	-7.38	100 ± 3,25

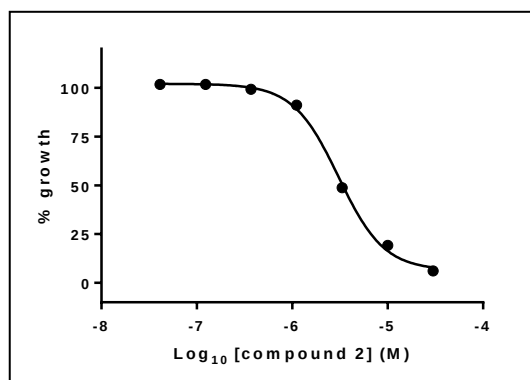


$$IC_{50} = 0,67 \pm 0,007$$

$$R^2 = 0,994$$

Composto 2

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	6,04 ± 0,18
10	-5	19,24 ± 0,51
3.33	-5.47	48,72 ± 0,76
1.11	-5.95	91,17 ± 1,11
0.3	-6.43	99 ± 1,25
0.12	-6.9	100 ± 2,49
0.041	-7.38	100 ± 1,49

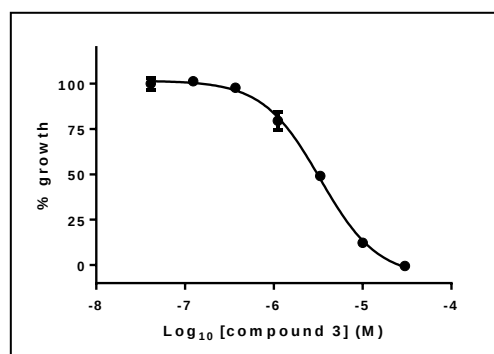


$$IC_{50} = 3,03 \pm 0,05$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 3

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,53 ± 0,11
10	-5	12,25 ± 0,35
3.33	-5.47	49,04 ± 0,45
1.11	-5.95	79,52 ± 5
0.3	-6.43	97,69 ± 1,05
0.12	-6.9	100 ± 1,76
0.041	-7.38	100 ± 3,29

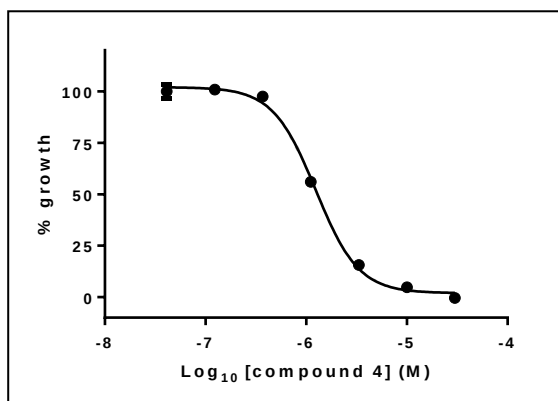


$$IC_{50} = 3,27 \pm 0,115$$

$$R^2 = 0,996$$

Composto 4

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,46 ± 0,19
10	-5	4,79 ± 1,87
3.33	-5.47	15,63 ± 0,45
1.11	-5.95	56,01 ± 1,71
0.3	-6.43	97,54 ± 1,11
0.12	-6.9	100 ± 1,69
0.041	-7.38	100 ± 3,25

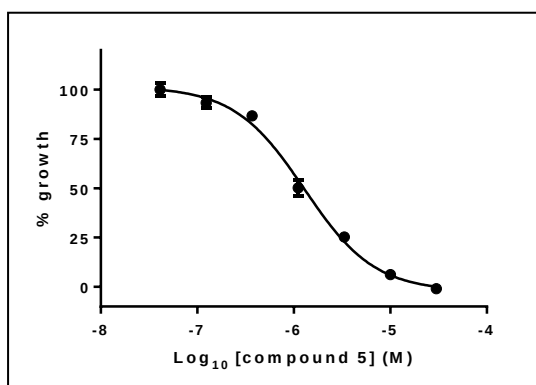


$$IC_{50} = 1,211 \pm 0,011$$

$$R^2 = 0,996$$

Composto 5

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,94 ± 0,11
10	-5	6,22 ± 1,22
3.33	-5.47	25,25 ± 0,17
1.11	-5.95	50,18 ± 4,07
0.3	-6.43	86,70 ± 2,29
0.12	-6.9	93,33 ± 2,82
0.041	-7.38	100 ± 3,25

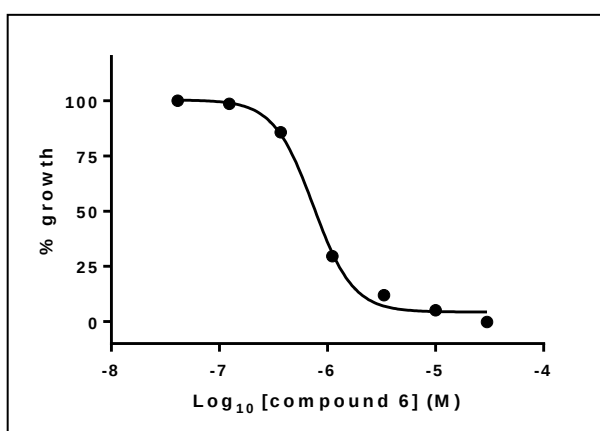


$$IC_{50} = 1,311 \pm 0,11$$

$$R^2 = 0,993$$

Composto 6

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,18 ± 0,09
10	-5	5,13 ± 0,32
3.33	-5.47	11,89 ± 0,08
1.11	-5.95	29,63 ± 0,54
0.3	-6.43	85,76 ± 1,97
0.12	-6.9	98,61 ± 2,51
0.041	-7.38	100 ± 1,73

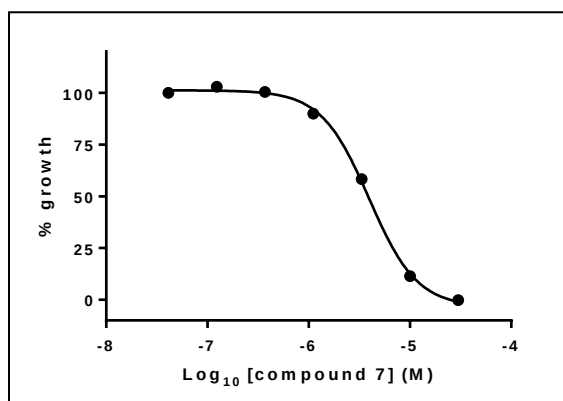


$$IC_{50} = 0,737 \pm 0,0008$$

$$R^2 = 0,995$$

Composto 7

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,20 ± 0,023
10	-5	11,36 ± 0,46
3.33	-5.47	58,30 ± 1,08
1.11	-5.95	98,95 ± 0,66
0.3	-6.43	100 ± 1,05
0.12	-6.9	100 ± 1,28
0.041	-7.38	100 ± 1,73

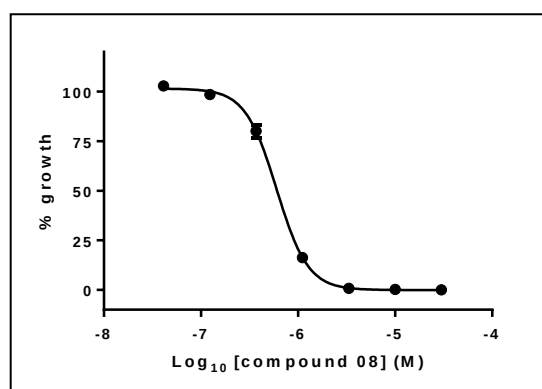


$$IC_{50} = 3,98 \pm 0,46$$

$$R^2 = 0,998$$

Composto 8

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,02 ± 0,078
10	-5	0,21 ± 0,031
3.33	-5.47	0,73 ± 0,204
1.11	-5.95	16,22 ± 1,56
0.3	-6.43	80,1 ± 3,299
0.12	-6.9	98,5 ± 0,799
0.041	-7.38	100 ± 1,47

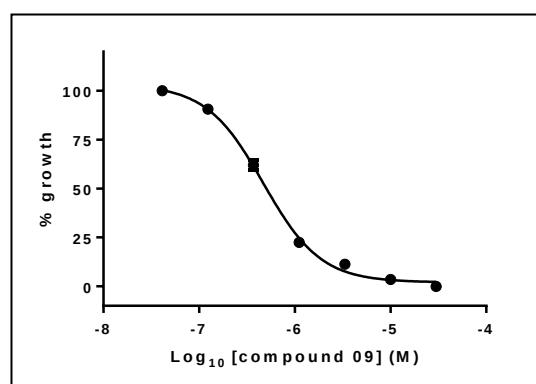


$$IC_{50} = 0,60 \pm 0,28$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 9

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,09 ± 0,03
10	-5	3,45 ± 0,06
3.33	-5.47	11,24 ± 0,37
1.11	-5.95	22,48 ± 0,37
0.3	-6.43	61,97 ± 2,63
0.12	-6.9	90,56 ± 2,52
0.041	-7.38	100 ± 1,73

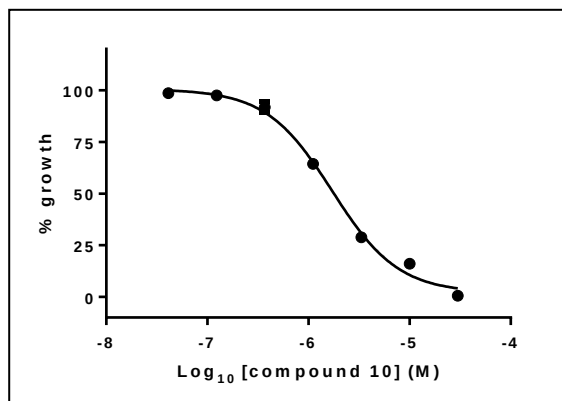


$$IC_{50} = 0,44 \pm 0,025$$

$$R^2 = 0,996$$

Composto 10

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,454 ± 0,18
10	-5	16,05 ± 0,69
3.33	-5.47	28,81 ± 0,74
1.11	-5.95	64,36 ± 2,08
0.3	-6.43	91,73 ± 2,65
0.12	-6.9	97,48 ± 1,23
0.041	-7.38	98,55 ± 2,34

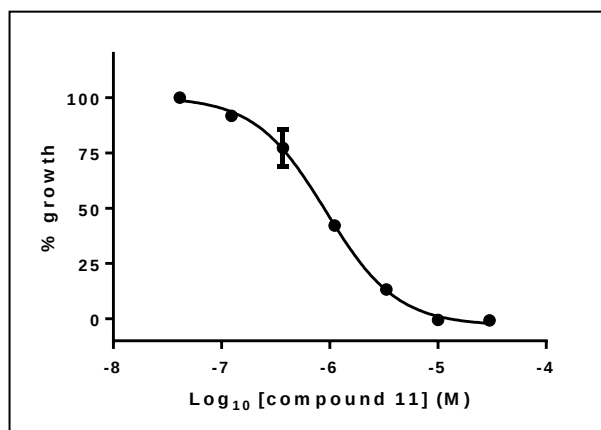


$$IC_{50} = 1,71 \pm 0,09$$

$$R^2 = 0,998$$

Composto 11

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,5 ± 0,21
10	-5	0,78 ± 0,11
3.33	-5.47	13,19 ± 0,5
1.11	-5.95	42,20 ± 2,39
0.3	-6.43	77,22 ± 8,45
0.12	-6.9	91,76 ± 0,1
0.041	-7.38	100 ± 1,73

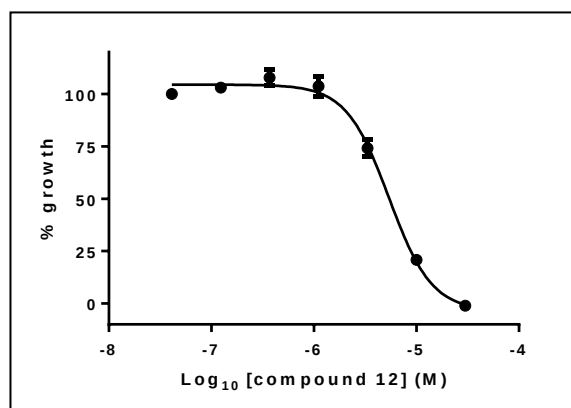


$$IC_{50} = 0,44 \pm 0,025$$

$$R^2 = 0,994$$

Composto 12

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	1,07 ± 0,14
10	-5	20,83 ± 0,97
3.33	-5.47	74,13 ± 4,09
1.11	-5.95	100 ± 4,8
0.3	-6.43	100 ± 3,7
0.12	-6.9	100 ± 2,44
0.041	-7.38	100 ± 0,1

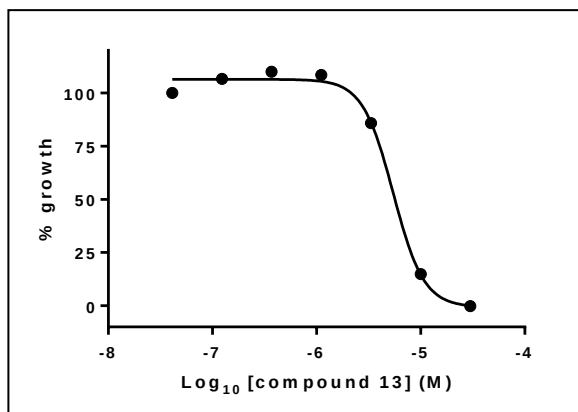


$$IC_{50} = 5,39 \pm 1,88$$

$$R^2 = 0,992$$

Composto 13

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,15 ± 0,09
10	-5	14,91 ± 0,81
3.33	-5.47	85,79 ± 1,1
1.11	-5.95	100 ± 0,69
0.3	-6.43	100 ± 0,3
0.12	-6.9	100 ± 0,71
0.041	-7.38	100 ± 0,1



$$IC_{50} = 5,45 \pm 0,07$$

$$R^2 = 0,994$$

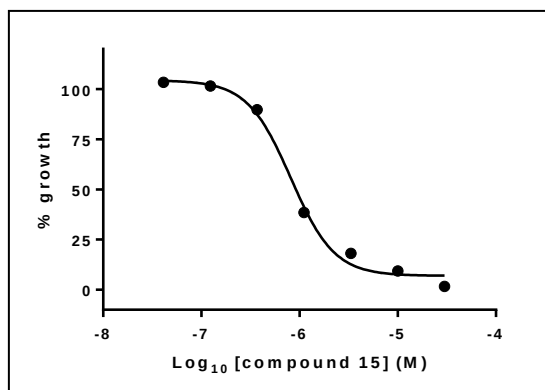
Composto 14

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	71,64 ± 0,22
10	-5	82,85 ± 0,15
3.33	-5.47	100 ± 0,78
1.11	-5.95	100 ± 0,85
0.3	-6.43	100 ± 1,67
0.123	-6.90	100 ± 1,55

IC₅₀ não determinado

Composto 15

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	1,62 ± 0,18
10	-5	9,34 ± 0,46
3.33	-5.47	18,1 ± 0,33
1.11	-5.95	38,48 ± 2,39
0.3	-6.43	89,7 ± 0,71
0.12	-6.9	100 ± 1,229
0.041	-7.38	100 ± 0,87

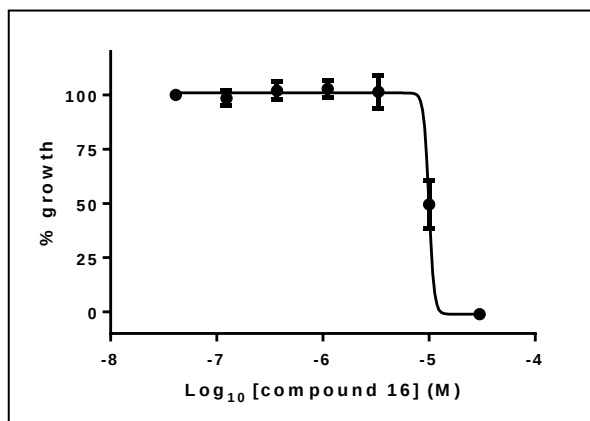


$$IC_{50} = 0,81 \pm 0,3$$

$$R^2 = 0,993$$

Composto 16

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	1,07 ± 0,13
10	-5	49,52 ± 2,56
3.33	-5.47	100 ± 7,48
1.11	-5.95	100 ± 3,78
0.3	-6.43	100 ± 4,17
0.12	-6.9	100 ± 3,51
0.04	-7.38	100 ± 0,1

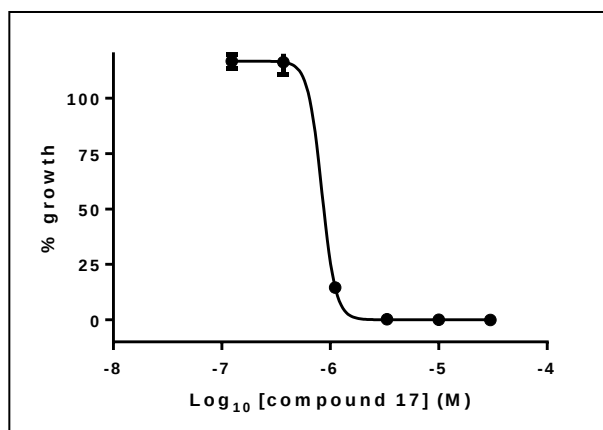


$$IC_{50} = 10,70 \pm 0,95$$

$$R^2 = 0,983$$

Composto 17

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,01 ± 0,05
10	-5	0,1 ± 0,06
3.33	-5.47	0,2 ± 0,1
1.11	-5.95	14,55 ± 1,05
0.3	-6.43	100 ± 5,47
0.12	-6.9	100 ± 3,31
0.041	-7.38	

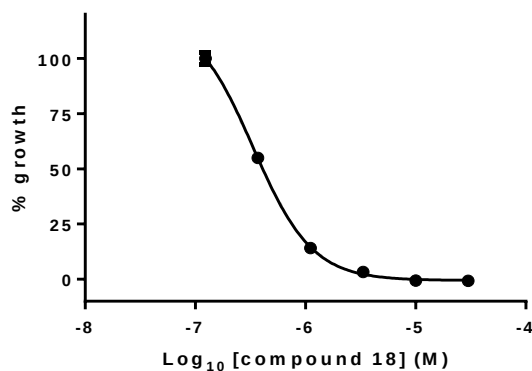


$$IC_{50} = 0,9 \pm 0,13$$

$$R^2 = 0,998$$

Composto 18

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,7 ± 0,05
10	-5	0,58 ± 0,08
3.33	-5.47	3,32 ± 0,17
1.11	-5.95	14,07 ± 0,49
0.3	-6.43	54,90 ± 2,52
0.12	-6.9	100 ± 2,62
0.041	-7.38	100 ± 3,25

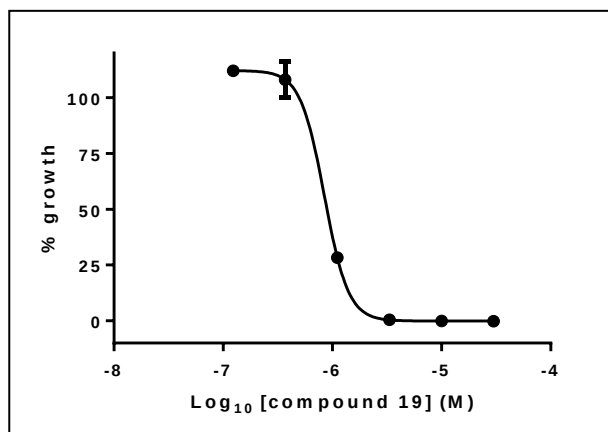


$$IC_{50} = 0,33 \pm 0,029$$

$$R^2 = 0,998$$

Composto 19

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,07 ± 0,1
10	-5	0,23 ± 0,12
3.33	-5.47	10,47 ± 0,07
1.11	-5.95	28,26 ± 0,63
0.3	-6.43	100 ± 7,99
0.12	-6.9	100 ± 0,32

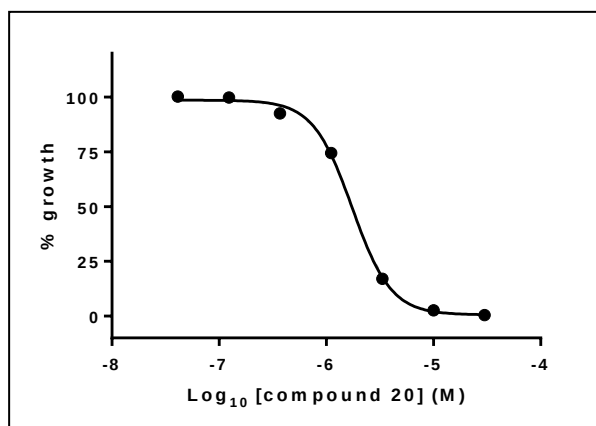


$$IC_{50} = 0,87 \pm 0,13$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 20

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,5 ± 0,01
10	-5	2,66 ± 0,13
3.33	-5.47	17,03 ± 1,18
1.11	-5.95	74,48 ± 1,41
0.3	-6.43	92,5 ± 1,5
0.12	-6.9	99,81 ± 1,81
0.041	-7.38	100 ± 1,5

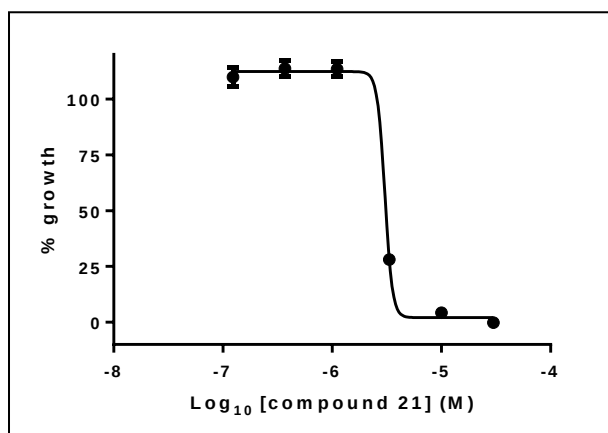


$$IC_{50} = 1,74 \pm 0,08$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 21

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,15 ± 0,05
10	-5	4,22 ± 0,42
3.33	-5.47	28,13 ± 1,14
1.11	-5.95	100 ± 3,27
0.3	-6.43	100 ± 3,68
0.12	-6.9	100 ± 4,49

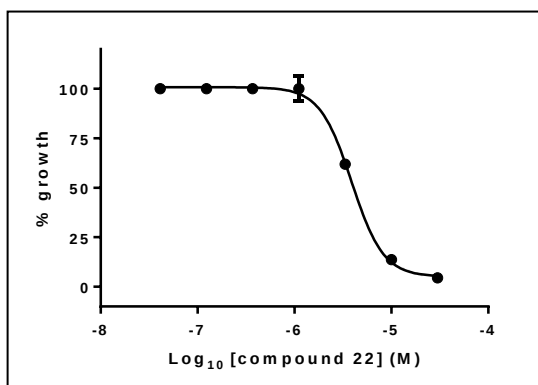


$$IC_{50} = 2,8 \pm 0,009$$

$$R^2 = 0,996$$

Composto 22

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,46 ± 0,19
10	-5	4,79 ± 1,87
3.33	-5.47	15,63 ± 0,45
1.11	-5.95	56,01 ± 1,71
0.3	-6.43	97,54 ± 1,11
0.12	-6.9	100 ± 1,69
0.041	-7.38	100 ± 3,25

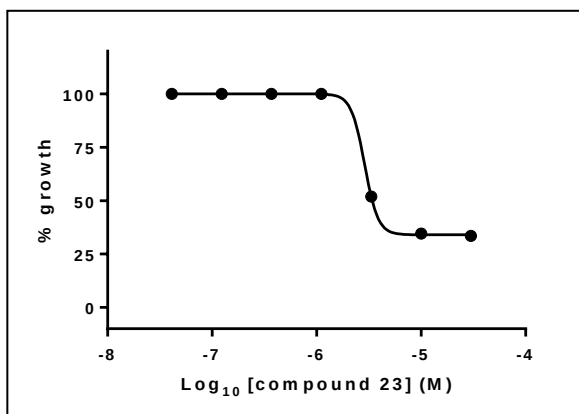


$$IC_{50} = 1,211 \pm 0,011$$

$$R^2 = 0,996$$

Composto 23

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	33,46 ± 0,84
10	-5	34,6 ± 0,53
3.33	-5.47	51,87 ± 0,53
1.11	-5.95	100 ± 1,09
0.3	-6.43	100 ± 2,11
0.12	-6.9	100 ± 1,31
0.041	-7.38	100 ± 1

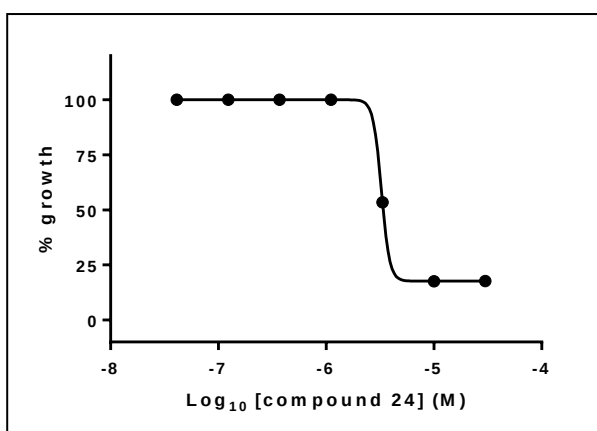


$$IC_{50} = 2,87 \pm 0,014$$

$$R^2 = 0,998$$

Composto 24

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	17,72 ± 0,31
10	-5	17,55 ± 0,42
3.33	-5.47	53,48 ± 0,45
1.11	-5.95	100 ± 1,98
0.3	-6.43	100 ± 0,49
0.12	-6.9	100 ± 0,83
0.041	-7.38	100 ± 1

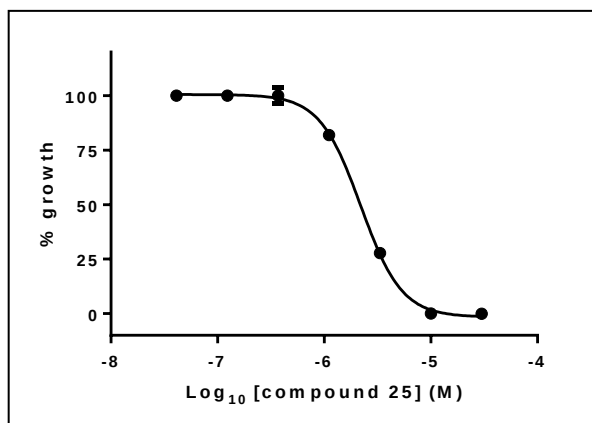


$$IC_{50} = 1,211 \pm 0,011$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 25

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,06 ± 0,07
10	-5	0,04 ± 0,07
3.33	-5.47	27,75 ± 0,42
1.11	-5.95	81,88 ± 1,9
0.3	-6.43	100 ± 3,66
0.12	-6.9	100 ± 0,78
0.041	-7.38	100 ± 1

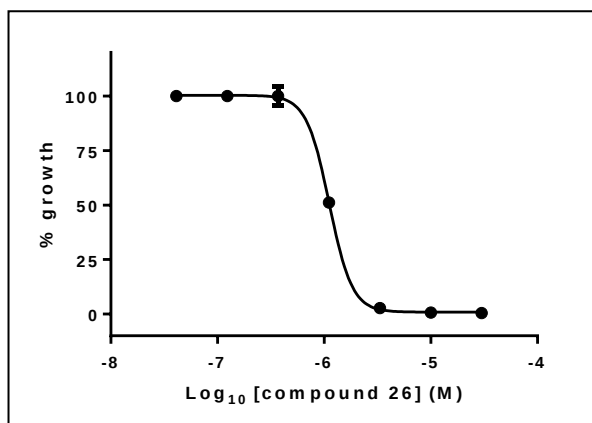


$$IC_{50} = 1,98 \pm 0,007$$

$$R^2 = 0,998$$

Composto 26

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,44 ± 0,07
10	-5	0,65 ± 0,18
3.33	-5.47	2,75 ± 0,19
1.11	-5.95	51,17 ± 0,8
0.3	-6.43	100 ± 4,44
0.12	-6.9	100 ± 0,4

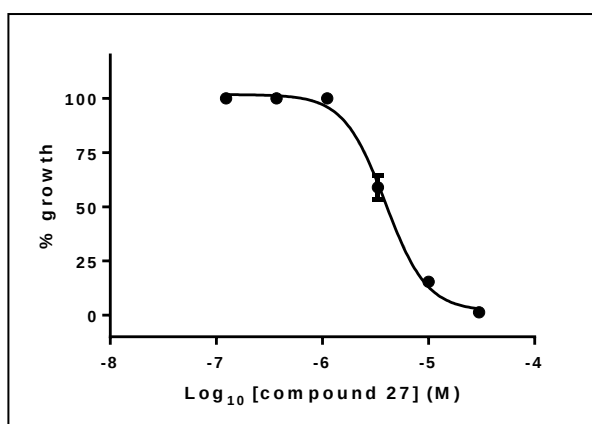


$$IC_{50} = 1,11 \pm 0,009$$

$$R^2 = 0,998$$

Composto 27

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	1,34 ± 0,14
10	-5	15,44 ± 0,66
3.33	-5.47	58,93 ± 5,38
1.11	-5.95	100 ± 0,68
0.3	-6.43	100 ± 0,34
0.12	-6.9	100 ± 0,83
0.041	-7.38	

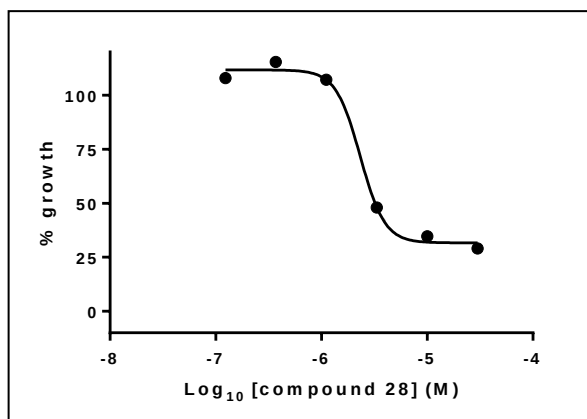


$$IC_{50} = 3,64 \pm 0,35$$

$$R^2 = 0,994$$

Composto 28

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	29,03 ± 0,3
10	-5	34,7 ± 0,36
3.33	-5.47	48,03 ± 0,3
1.11	-5.95	100 ± 0,81
0.3	-6.43	100 ± 0,45
0.12	-6.9	100 ± 0,95
0.041	-7.38	

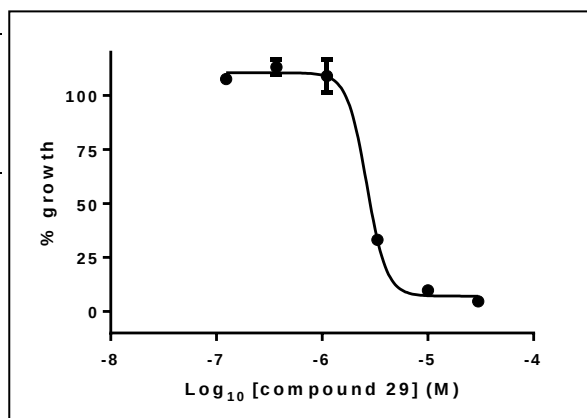


$$IC_{50} = 2,71 \pm 0,12$$

$$R^2 = 0,994$$

Composto 29

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	4,7 ± 0,38
10	-5	9,75 ± 0,35
3.33	-5.47	33,15 ± 1,22
1.11	-5.95	100 ± 1,49
0.3	-6.43	100 ± 3,59
0.12	-6.9	100 ± 2,08
0.041	-7.38	

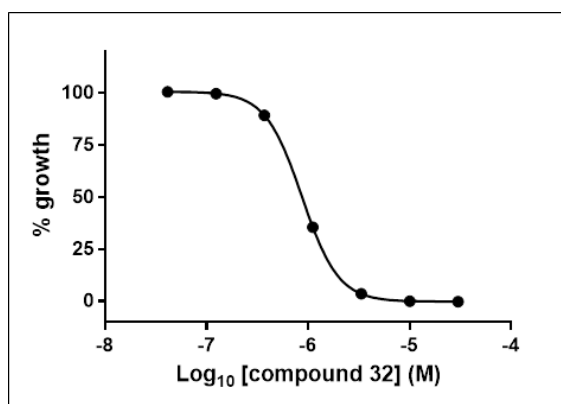


$$IC_{50} = 2,64 \pm 0,36$$

$$R^2 = 0,994$$

Composto 32

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,01 ± 0,07
10	-5	0,15 ± 0,06
3.33	-5.47	3,61 ± 0,31
1.11	-5.95	35,59 ± 1,38
0.3	-6.43	89,23 ± 0,91
0.12	-6.9	99,72 ± 0,7
0.041	-7.38	100 ± 0,74

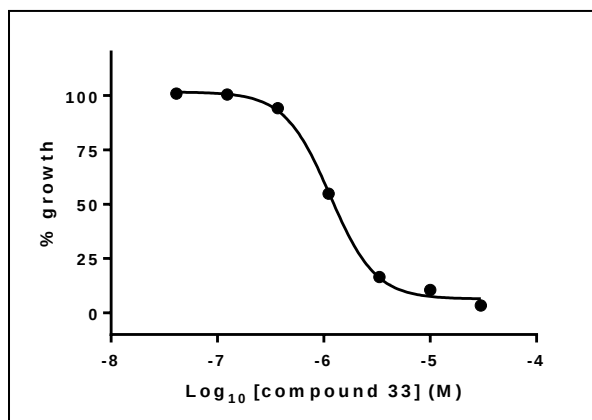


$$IC_{50} = 0,86 \pm 0,023$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 33

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	3,4 ± 0,2
10	-5	10,53 ± 0,54
3.33	-5.47	16,5 ± 1,6
1.11	-5.95	54,87 ± 2,25
0.3	-6.43	94,13 ± 0,72
0.12	-6.9	100 ± 1,6
0.041	-7.38	100 ± 2,27

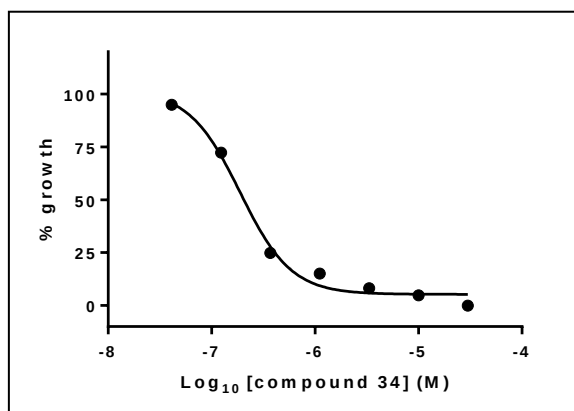


$$IC_{50} = 1,14 \pm 0,03$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 34

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
30	-4.52	0,06 ± 0,07
10	-5	4,79 ± 0,04
3.33	-5.47	8,16 ± 0,2
1.11	-5.95	15,03 ± 0,5
0.3	-6.43	24,82 ± 0,3
0.12	-6.9	72,22 ± 0,67
0.041	-7.38	94,95 ± ,22

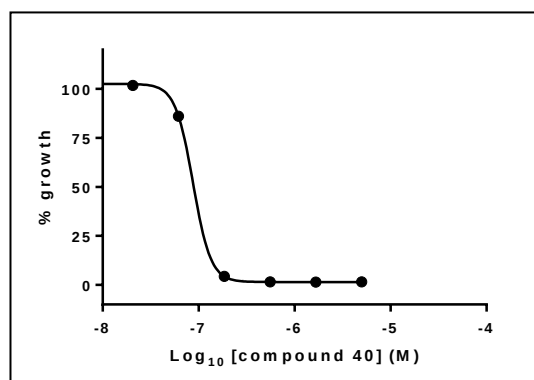


$$IC_{50} = 0,188 \pm 0,008$$

$$R^2 = 0,99$$

Composto 40

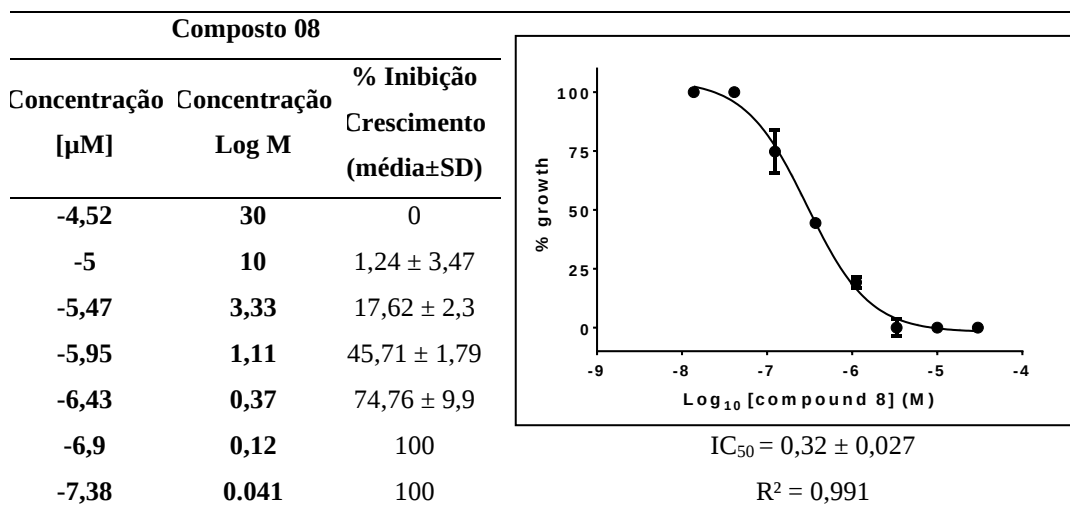
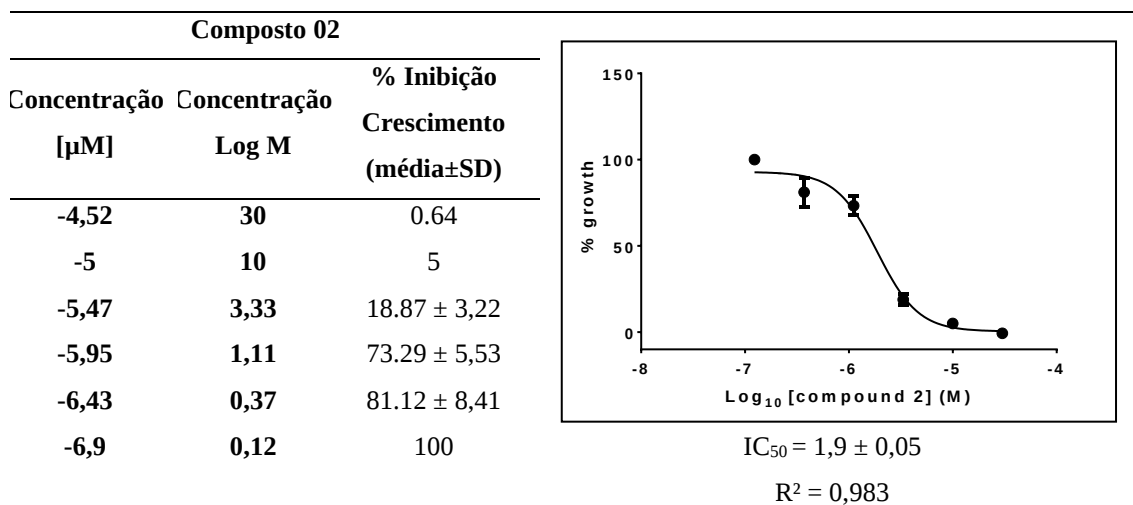
Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
5	-5.30	1,48 ± 0,12
1.66	-5.77	1,39 ± 0,07
0.55	-6.25	1,58 ± 0,04
0.18	-6.73	4,31 ± 0,2
0.06	-7.20	86,06 ± 1,34
0.0205	-7.68	100 ± 0,86
0.0068	-8.16	100 ± 1,33



$$IC_{50} = 0,087 \pm 0,0012$$

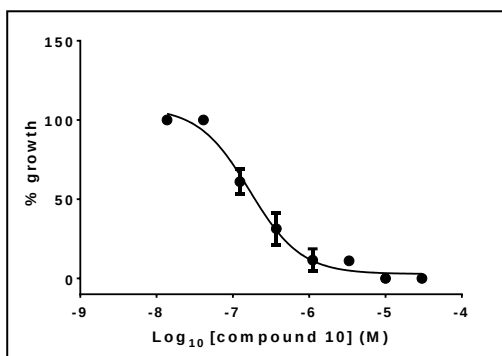
$$R^2 = 0,999$$

ANEXO 7 - CURVA DOSE-RESPOSTA CORRESPONDENTES À INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO PARASITÁRIO PARA AS FORMAS AMASTIGOTA DE *L. (L.) MAJOR*



Composto 10

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
-4,52	30	
-5	10	0
-5,47	3,33	11 ± 2,44
-5,95	1,11	11,5 ± 7,12
-6,43	0,37	31,35 ± 10
-6,9	0,12	61 ± 7,89
-7,38	0.041	100

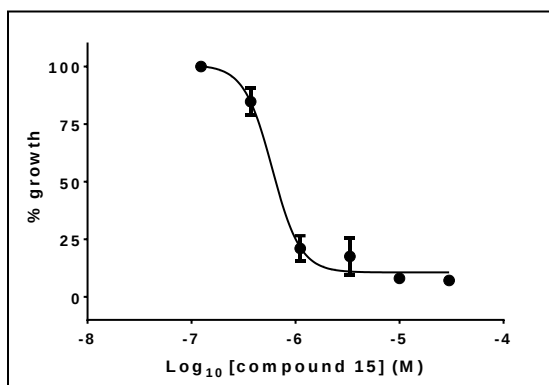


$$IC_{50} = 0,14 \pm 0,009$$

$$R^2 = 0,977$$

Composto 15

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
-4,52	30	7.36
-5	10	6.58
-5,47	3,33	10,50 ± 7,98
-5,95	1,11	14,03 ± 5,5
-6,43	0,37	66,63 ± 5,72
-6,9	0,12	100

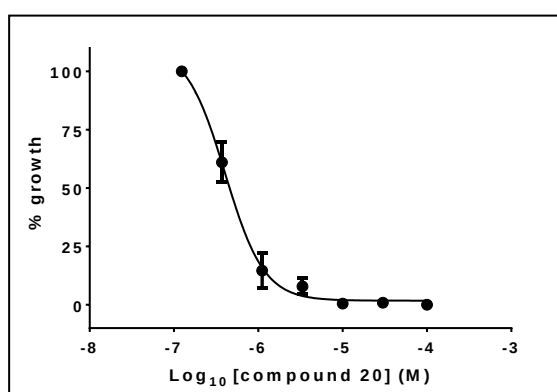


$$IC_{50} = 0,44 \pm 0,08$$

$$R^2 = 0,983$$

Composto 20

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
-4,52	30	1,48 ± 0,12
-5	10	1,39 ± 0,07
-5,47	3,33	1,58 ± 0,04
-5,95	1,11	4,31 ± 0,2
-6,43	0,37	86,06 ± 1,34
-6,9	0,12	100 ± 0,86

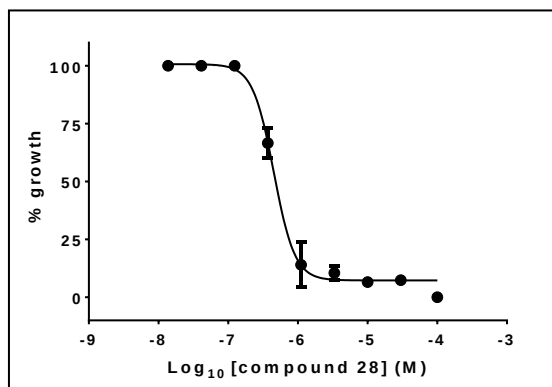


$$IC_{50} = 0,43 \pm 0,029$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 28

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
-4,52	30	7,36
-5	10	6,57
-5,47	3,33	10,5 ± 2,8
-5,95	1,11	14 ± 9,7
-6,43	0,37	66,63 ± 6,44
-6,9	0,12	100

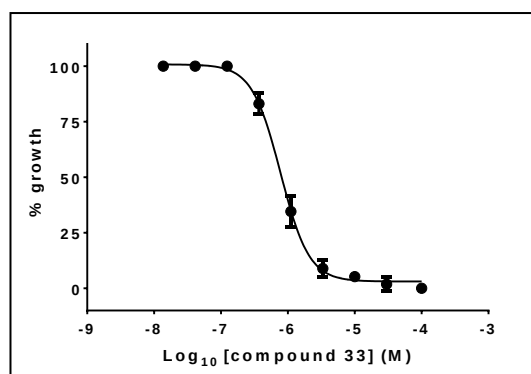


$$IC_{50} = 0,44 \pm 0,08$$

$$R^2 = 0,983$$

Composto 33

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
-4,52	30	1,84
-5	10	5,25
-5,47	3,33	8,89 ± 3,84
-5,95	1,11	34,57 ± 6,85
-6,43	0,37	83,11 ± 4,8
-6,9	0,12	100

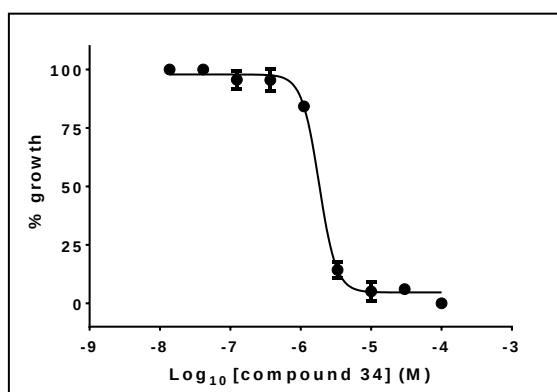


$$IC_{50} = 0,84 \pm 0,05$$

$$R^2 = 0,995$$

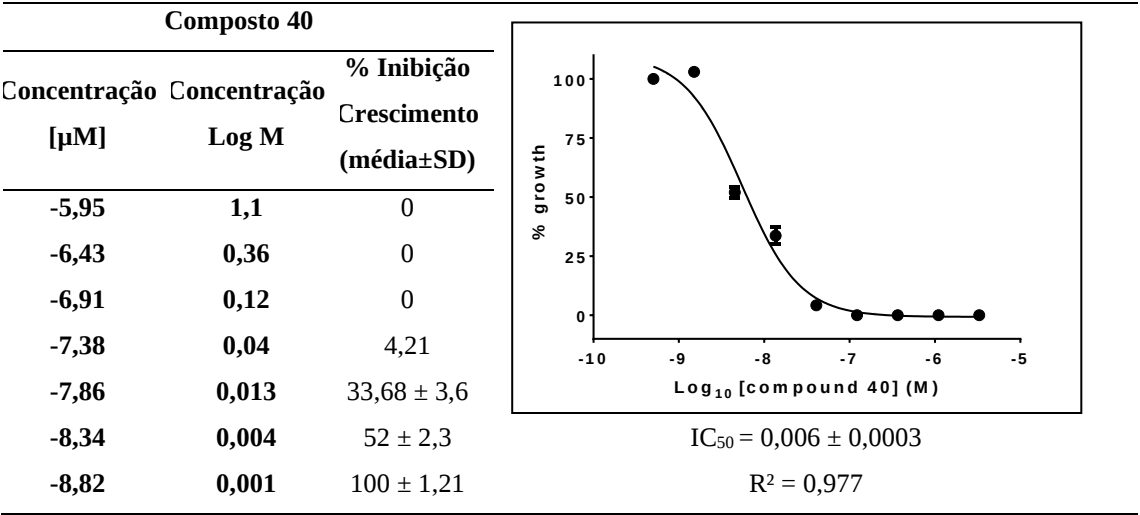
Composto 34

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
-4,52	30	6,07
-5	10	5,14 ± 4
-5,47	3,33	14,29 ± 3,2
-5,95	1,11	84,26 ± 1,34
-6,43	0,37	95,48 ± 4,6
-6,9	0,12	95,63

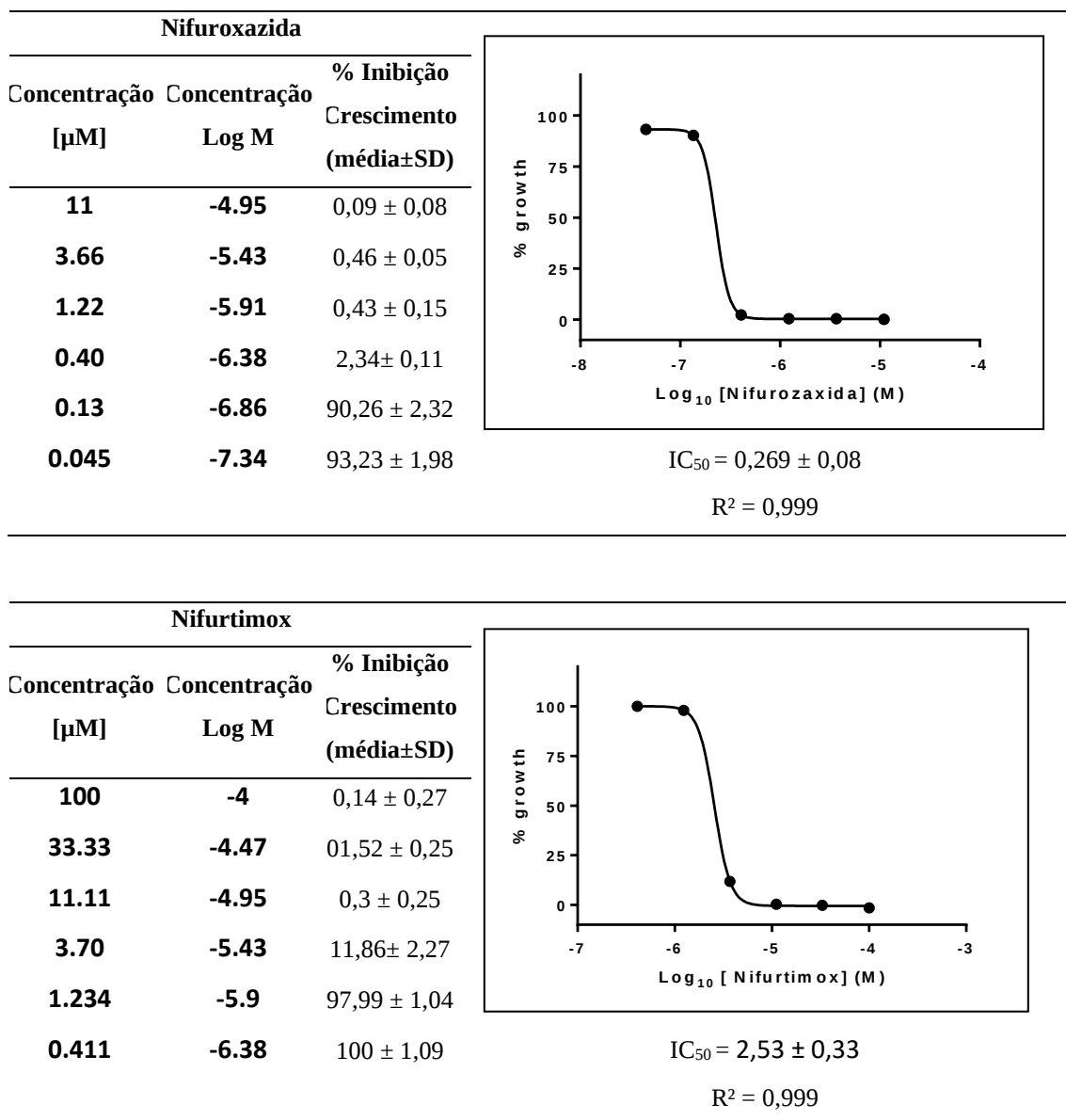


$$IC_{50} = 1,84 \pm 0,09$$

$$R^2 = 0,995$$

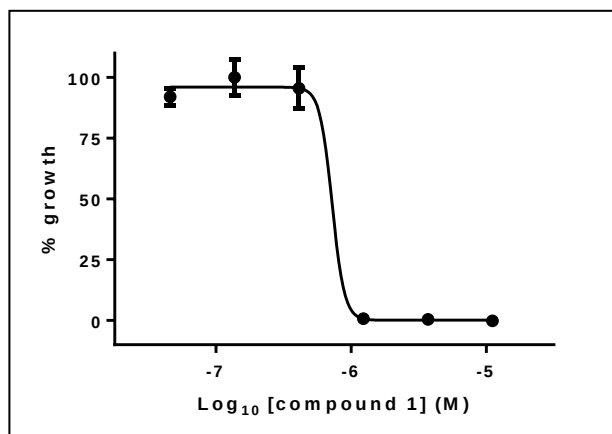


ANEXO 8 - CURVA DOSE-RESPOSTA CORRESPONDENTES À INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO PARASITÁRIO PARA AS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. BRUCEI*



Composto 1

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,19 ± 0,19
3.66	-5.43	0,42 ± 0,14
1.22	-5.91	0,7 ± 0,16
0.40	-6.38	95,59 ± 0,14
0.13	-6.86	92,08 ± 3,47
0.045	-7.34	100 ± 3,2

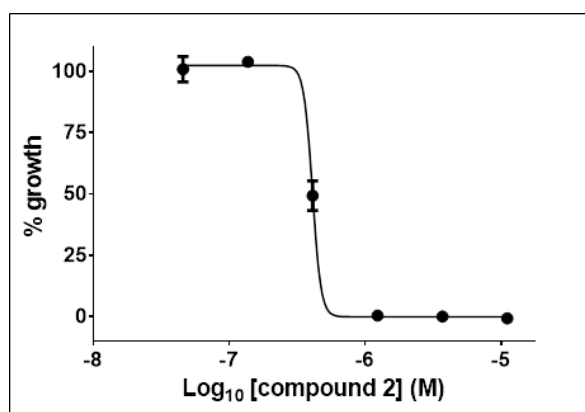


$$IC_{50} = 0,65 \pm 0,05$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 2

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,074 ± 0,08
3.66	-5.43	0, ± 0,05
1.22	-5.91	0,43 ± 0,15
0.40	-6.38	49,36 ± 6
0.13	-6.86	100 ± 1,64
0.045	-7.34	100 ± 5,18

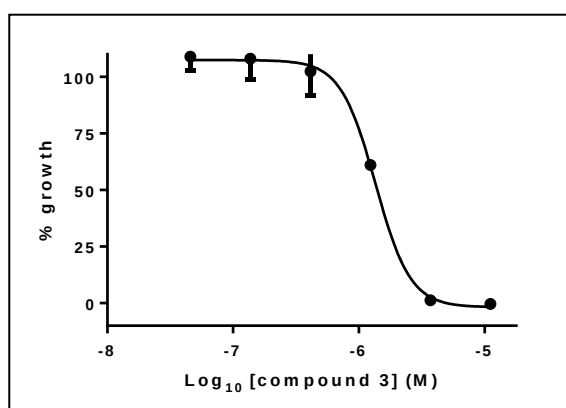


$$IC_{50} = 0,41 \pm 0,018$$

$$R^2 = 0,996$$

Composto 3

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,38 ± 0,02
3.66	-5.43	1,2 ± 0,1
1.22	-5.91	61,07 ± 1,1
0.40	-6.38	100 ± 9,9
0.13	-6.86	100 ± 9
0.045	-7.34	100 ± 6,16

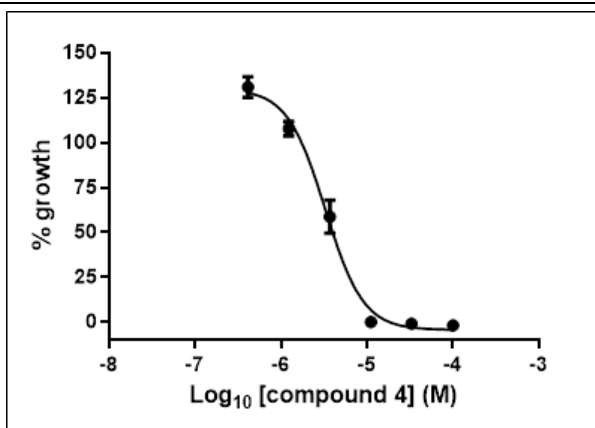


$$IC_{50} = 1,3 \pm 0,091$$

$$R^2 = 0,987$$

Composto 4

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,043 ± 0,06
3.66	-5.43	0,63 ± 0,03
1.22	-5.91	1,39 ± 0,07
0.40	-6.38	44,83 ± 7,04
0.13	-6.86	82,21 ± 3,05
0.045	-7.34	100 ± 4,3

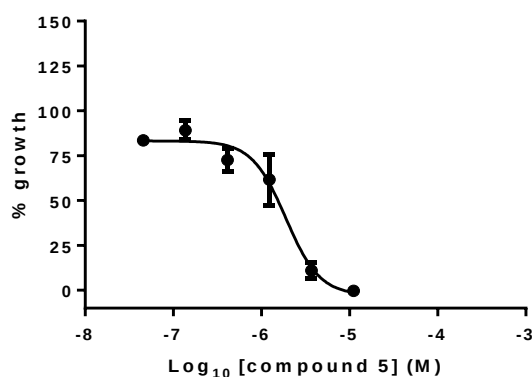


$$IC_{50} = 2,97 \pm 0,69$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 5

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,27 ± 0,46
3.66	-5.43	11,03 ± 4,7
1.22	-5.91	61,7 ± 9,9
0.40	-6.38	72,53 ± 6,59
0.13	-6.86	89,14 ± 5,32
0.045	-7.34	83,5 ± 1,41

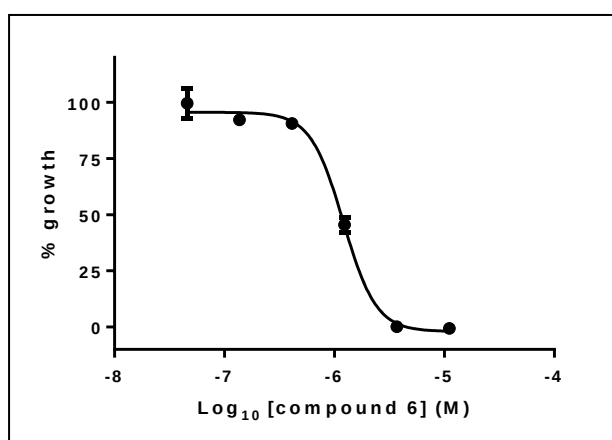


$$IC_{50} = 1,83 \pm 0,65$$

$$R^2 = 0,958$$

Composto 6

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,64 ± 0,49
3.66	-5.43	0,15 ± 0,49
1.22	-5.91	45,48 ± 3,38
0.40	-6.38	90,61 ± 1,3
0.13	-6.86	92,18 ± 0,6
0.045	-7.34	99,53 ± 6,62

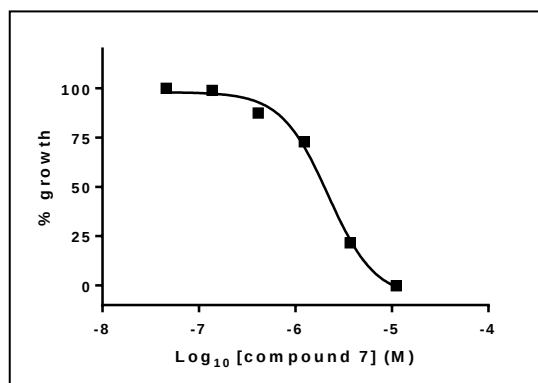


$$IC_{50} = 1,15 \pm 0,07$$

$$R^2 = 0,993$$

Composto 7

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,14 ± 0,07
3.66	-5.43	21,55 ± 2,5
1.22	-5.91	72,77 ± 5,5
0.40	-6.38	87,44 ± 3,3
0.13	-6.86	98,88 ± 5,3
0.045	-7.34	100 ± 7,63

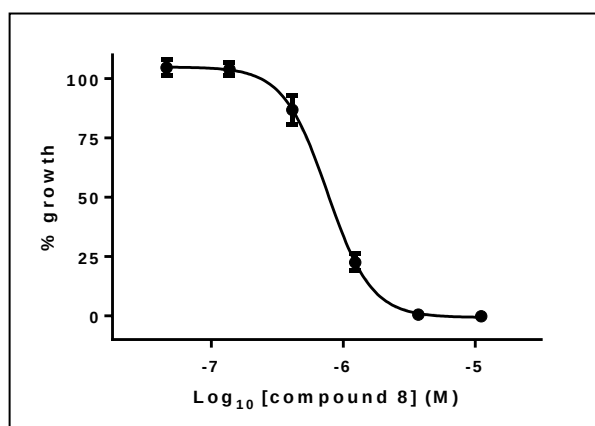


$$IC_{50} = 2,12 \pm 0,17$$

$$R^2 = 0,991$$

Composto 8

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,16 ± 0,01
3.66	-5.43	0,59 ± 0,1
1.22	-5.91	22,57 ± 3,6
0.40	-6.38	86,87 ± 6,26
0.13	-6.86	100 ± 2,8
0.045	-7.34	100 ± 3,41

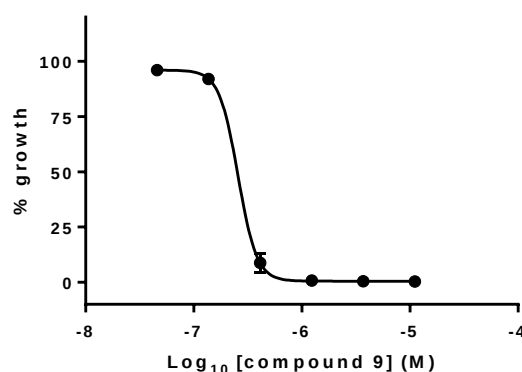


$$IC_{50} = 0,8 \pm 0,01$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 9

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	1,13 ± 0,69
3.66	-5.43	5,65 ± 1,7
1.22	-5.91	15,08 ± 1,13
0.40	-6.38	74,19 ± 7
0.13	-6.86	96,79 ± 2,8
0.045	-7.34	100 ± 4,48

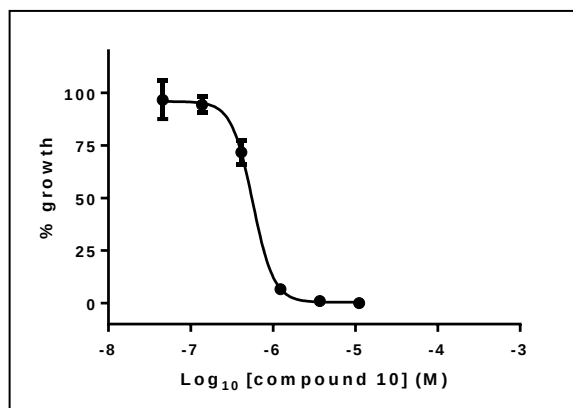


$$IC_{50} = 0,62 \pm 0,07$$

$$R^2 = 0,998$$

Composto 10

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,03 ± 0,21
3.66	-5.43	1 ± 0,33
1.22	-5.91	6,6 ± 1
0.40	-6.38	71,71 ± 5,6
0.13	-6.86	94,25 ± 3,7
0.045	-7.34	96,67 ± 9

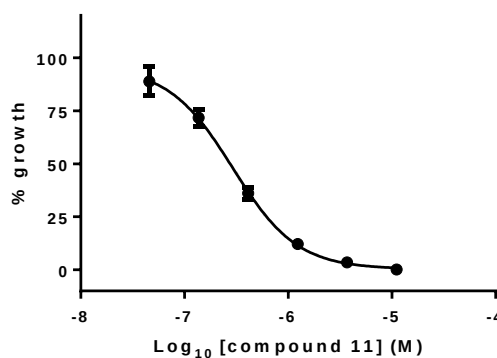


$$IC_{50} = 0,58 \pm 0,007$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 11

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,09 ± 0,08
3.66	-5.43	0,46 ± 0,05
1.22	-5.91	0,43 ± 0,15
0.40	-6.38	2,34 ± 0,11
0.13	-6.86	90,26 ± 2,32
0.045	-7.34	93,23 ± 1,98

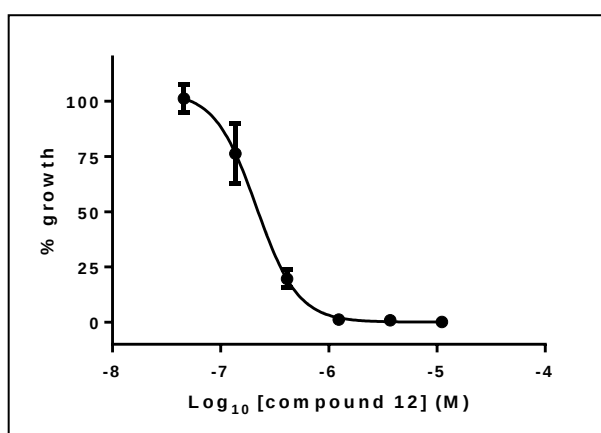


$$IC_{50} = 0,25 \pm 0,007$$

$$R^2 = 0,992$$

Composto 12

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,17 ± 0,05
3.66	-5.43	0,84 ± 0,07
1.22	-5.91	1,18 ± 0,1
0.40	-6.38	19,68 ± 4,1
0.13	-6.86	76,31 ± 9,9
0.045	-7.34	100 ± 6,51

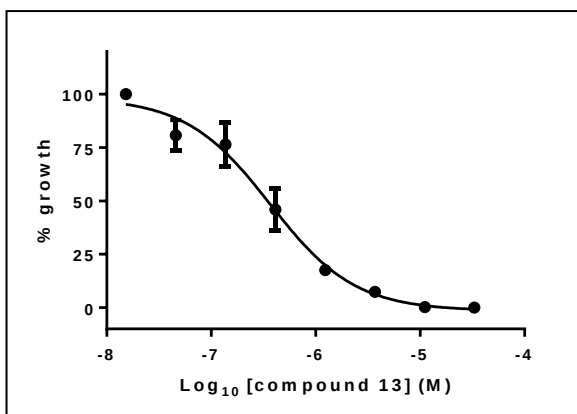


$$IC_{50} = 0,18 \pm 0,02$$

$$R^2 = 0,993$$

Composto 13

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,21 ± 0,3
3.66	-5.43	7,44 ± 1,8
1.22	-5.91	15,57 ± 2,3
0.40	-6.38	45,98 ± 9,9
0.13	-6.86	76,39 ± 9,9
0.045	-7.34	80,72 ± 7,2

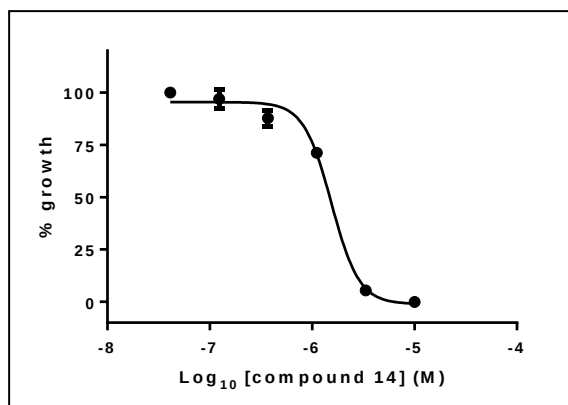


$$IC_{50} = 0,399 \pm 0,17$$

$$R^2 = 0,975$$

Composto 14

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,05 ± 0,08
3.66	-5.43	5,48 ± 0,5
1.22	-5.91	71,19 ± 1,65
0.40	-6.38	87,81 ± 3,8
0.13	-6.86	96,98 ± 4,59
0.045	-7.34	100 ± 2,2

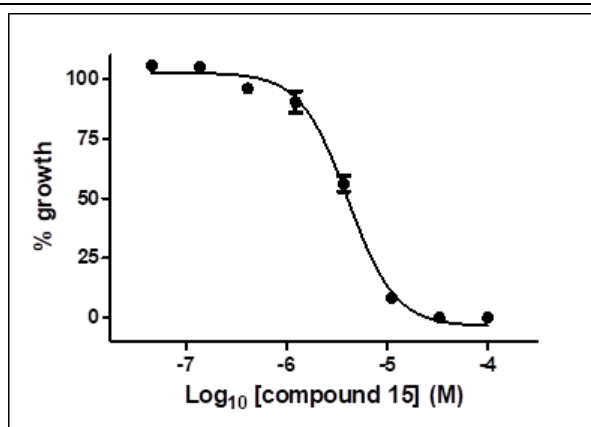


$$IC_{50} = 1,55 \pm 0,05$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 15

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	8,23 ± 0,22
3.66	-5.43	56,17 ± 3,2
1.22	-5.91	90,48 ± 4,41
0.40	-6.38	96,16 ± 1,79
0.13	-6.86	100 ± 2
0.045	-7.34	100 ± 0,85

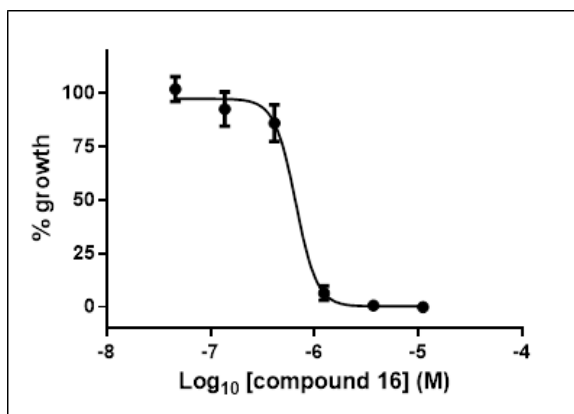


$$IC_{50} = 3,9 \pm 0,07$$

$$R^2 = 0,994$$

Composto 16

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,09 ± 0,04
3.66	-5.43	0,69 ± 0,02
1.22	-5.91	6,4 ± 3,3
0.40	-6.38	86,08 ± 8,5
0.13	-6.86	92,62 ± 7,98
0.045	-7.34	100 ± 5,9

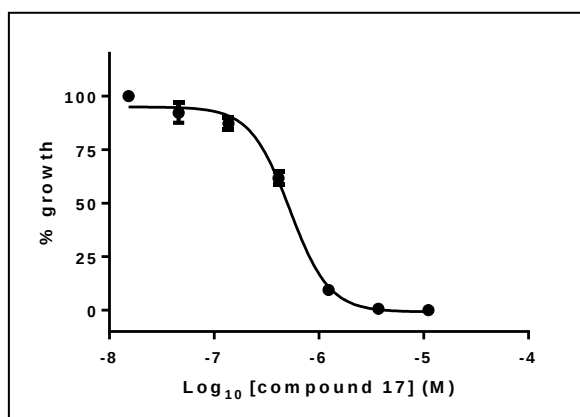


$$IC_{50} = 0,56 \pm 0,08$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 17

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,01 ± 0,07
3.66	-5.43	0,62 ± 0,07
1.22	-5.91	9,44 ± 0,47
0.40	-6.38	61,67 ± 3,12
0.13	-6.86	87,23 ± 2,9
0.045	-7.34	92,21 ± 4,6

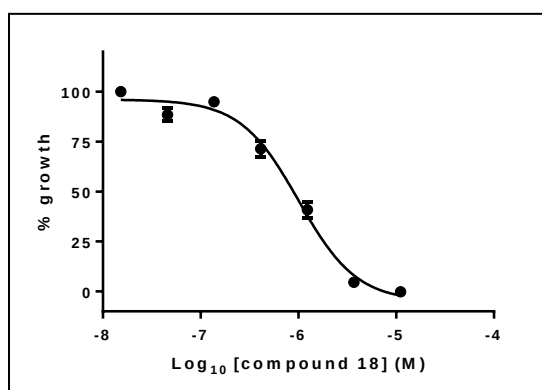


$$IC_{50} = 0,52 \pm 0,02$$

$$R^2 = 0,993$$

Composto 18

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,23 ± 0,13
3.66	-5.43	4,54 ± 0,64
1.22	-5.91	40,81 ± 3,96
0.40	-6.38	71,43 ± 2,77
0.13	-6.86	94,97 ± 2,5
0.045	-7.34	88,44 ± 2,31

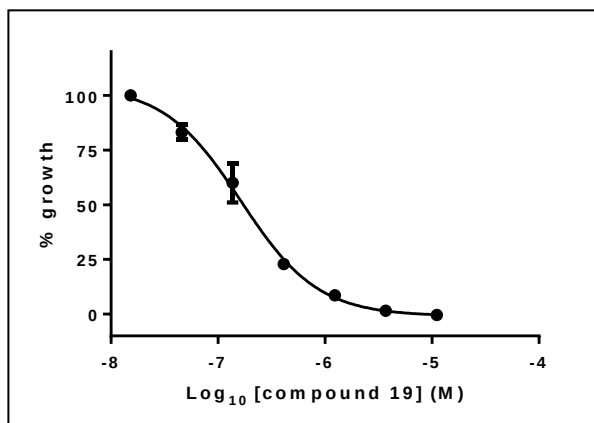


$$IC_{50} = 1,05 \pm 0,18$$

$$R^2 = 0,986$$

Composto 19

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,4 ± 0,25
3.66	-5.43	1,5 ± 0,56
1.22	-5.91	8,56 ± 1,12
0.40	-6.38	22,84 ± 2,3
0.13	-6.86	60,03 ± 8,9
0.045	-7.34	83,1 ± 3,4

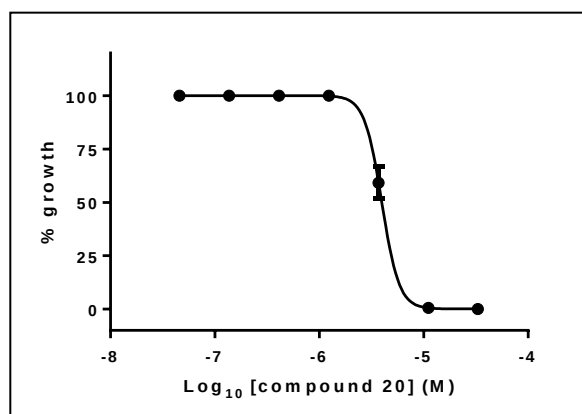


$$IC_{50} = 0,18 \pm 0,04$$

$$R^2 = 0,991$$

Composto 20

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,4 ± 0,03
3.66	-5.43	10,42 ± 2,11
1.22	-5.91	86,64 ± 1,23
0.40	-6.38	94,8 ± 1,7
0.13	-6.86	97,04 ± 0,53
0.045	-7.34	100 ± 2,4

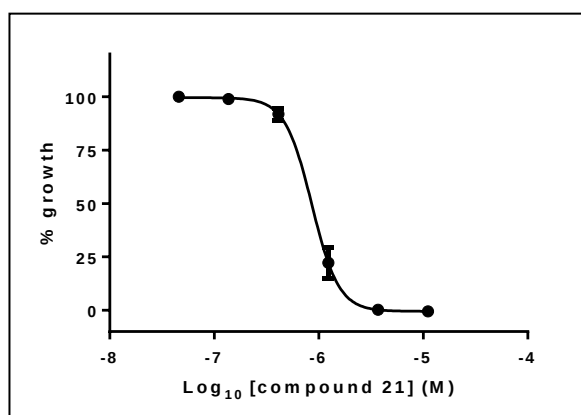


$$IC_{50} = 2,18 \pm 0,2$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 21

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,49 ± 0,38
3.66	-5.43	0,23 ± 0,31
1.22	-5.91	22,2 ± 7,17
0.40	-6.38	91,89 ± 2,8
0.13	-6.86	98,92 ± 2,28
0.045	-7.34	100 ± 2,19

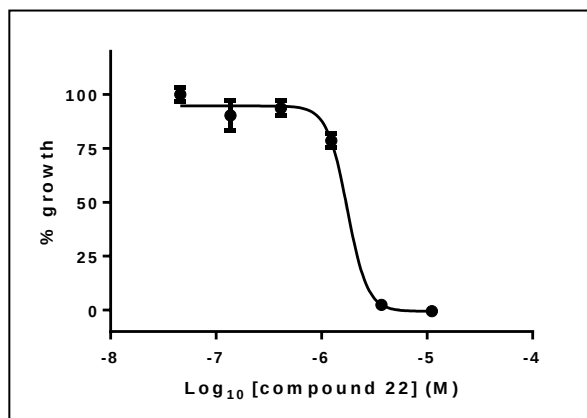


$$IC_{50} = 0,81 \pm 0,014$$

$$R^2 = 0,996$$

Composto 22

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,51 ± 0,28
3.66	-5.43	2,41 ± 0,67
1.22	-5.91	78,53 ± 3,25
0.40	-6.38	93,59 ± 3,35
0.13	-6.86	90,25 ± 6,8
0.045	-7.34	100 ± 3,3

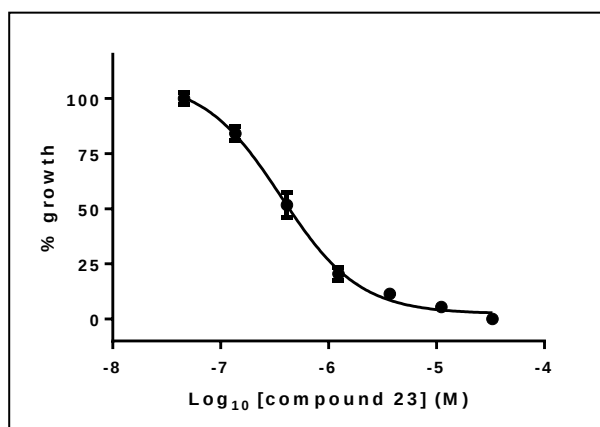


$$IC_{50} = 1,76 \pm 0,18$$

$$R^2 = 0,990$$

Composto 23

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	5,4 ± 0,7
3.66	-5.43	11,42 ± 1,74
1.22	-5.91	20,44 ± 2,97
0.40	-6.38	51,64 ± 5,67
0.13	-6.86	84 ± 3,19
0.045	-7.34	100 ± 2,87

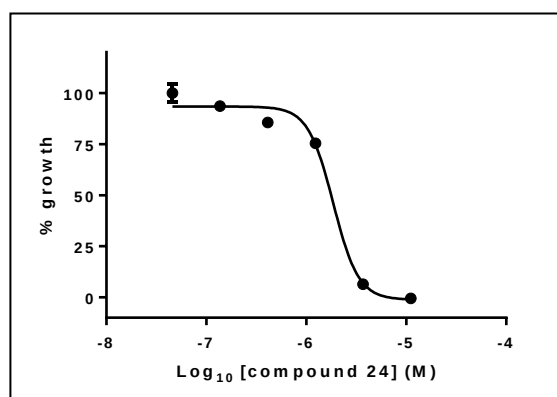


$$IC_{50} = 0,36 \pm 0,09$$

$$R^2 = 0,993$$

Composto 24

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,54 ± 0,06
3.66	-5.43	6,41 ± 0,38
1.22	-5.91	75,37 ± 0,98
0.40	-6.38	85,62 ± 1,5
0.13	-6.86	93,63 ± 0,9
0.045	-7.34	100 ± 4,2

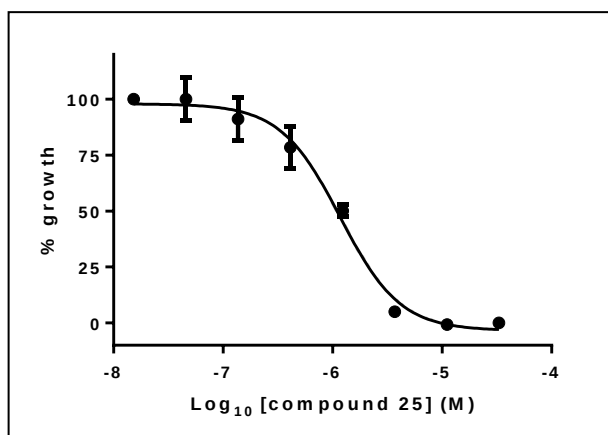


$$IC_{50} = 1,85 \pm 0,05$$

$$R^2 = 0,988$$

Composto 25

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,68 ± 0,09
3.66	-5.43	5 ± 0,82
1.22	-5.91	50,07 ± 2,66
0.40	-6.38	78,44 ± 9,18
0.13	-6.86	91,1 ± 9,5
0.045	-7.34	100 ± 9,49

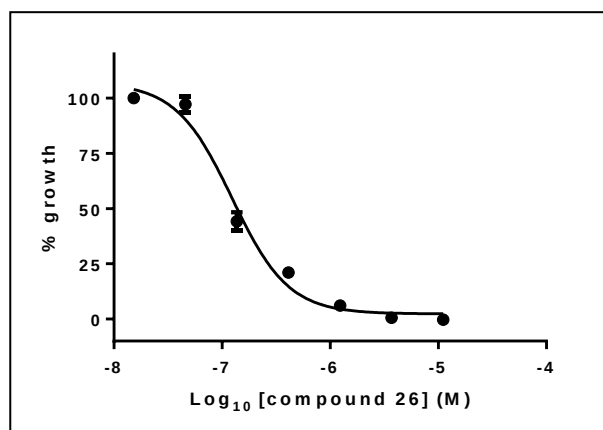


$$IC_{50} = 1,22 \pm 0,07$$

$$R^2 = 0,980$$

Composto 26

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,27 ± 0,06
3.66	-5.43	0,54 ± 0,16
1.22	-5.91	6,05 ± 0,39
0.40	-6.38	21,01 ± 2,3
0.13	-6.86	44,26 ± 4,1
0.045	-7.34	97,19 ± 3,6

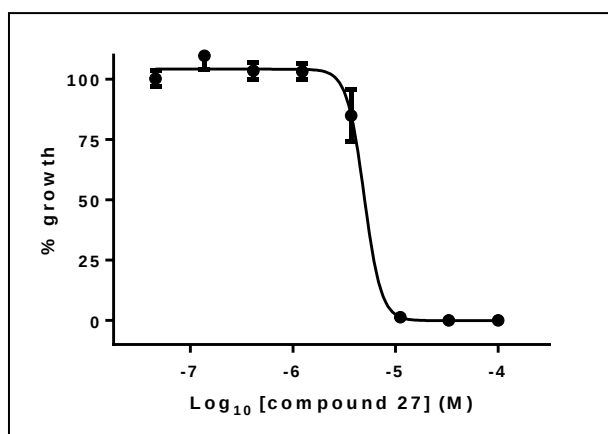


$$IC_{50} = 0,12 \pm 0,01$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 27

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	1,3 ± 0,8
3.66	-5.43	84,91 ± 9,9
1.22	-5.91	100 ± 3,3
0.40	-6.38	100 ± 3,4
0.13	-6.86	100 ± 5,7
0.045	-7.34	100 ± 3,2

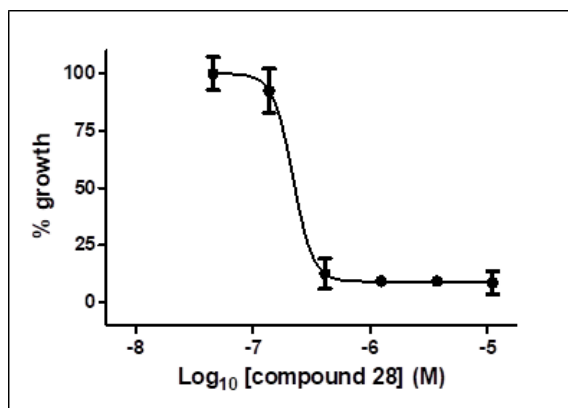


$$IC_{50} = 1,55 \pm 0,05$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 28

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	8,61 ± 5,13
3.66	-5.43	9,37 ± 0,37
1.22	-5.91	9,3 ± 0,38
0.40	-6.38	12,6 ± 6,5
0.13	-6.86	92,49 ± 9,63
0.045	-7.34	100 ± 7,1

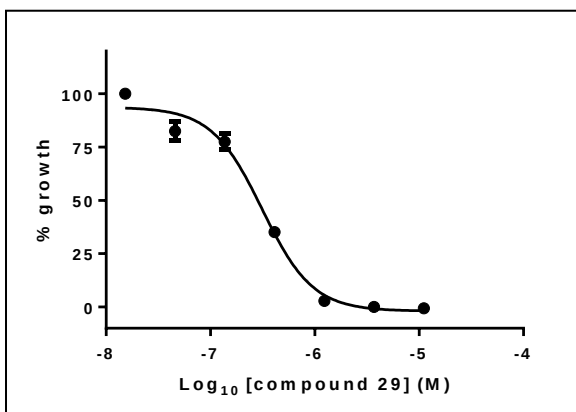


$$IC_{50} = 0,24 \pm 0,04$$

$$R^2 = 0,998$$

Composto 29

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,6 ± 0,15
3.66	-5.43	0,06 ± 0,05
1.22	-5.91	2,7 ± 0,2
0.40	-6.38	35,13 ± 1,24
0.13	-6.86	77,44 ± 3,78
0.045	-7.34	82,43 ± 4,4

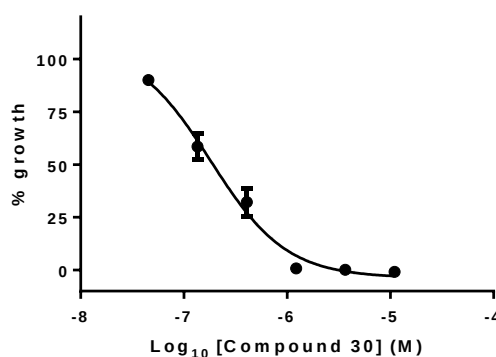


$$IC_{50} = 0,39 \pm 0,01$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 30

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,79 ± 0,17
3.66	-5.43	5,07 ± 0,12
1.22	-5.91	0,8 ± 0,24
0.40	-6.38	32,21 ± 6,6
0.13	-6.86	58,47 ± 6,3
0.045	-7.34	90 ± 1,48

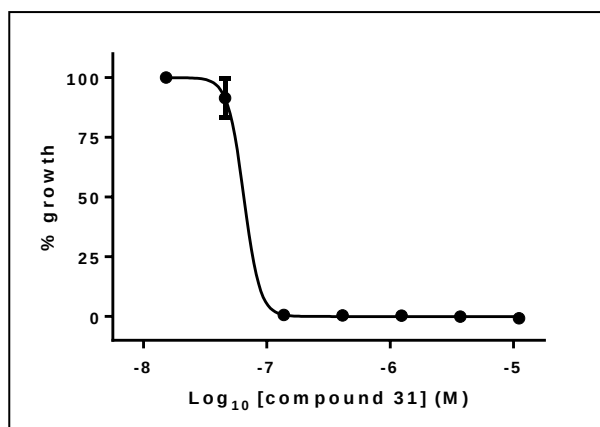


$$IC_{50} = 0,18 \pm 0,05$$

$$R^2 = 0,981$$

Composto 31

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,06 ± 0,29
3.66	-5.43	0,75 ± 0,22
1.22	-5.91	0,32 ± 0,41
0.40	-6.38	0,48 ± 0,22
0.13	-6.86	0,66 ± 0,36
0.045	-7.34	91,46 ± 8,33

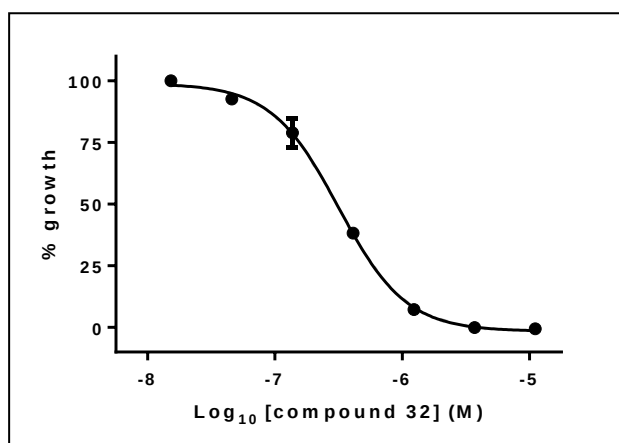


$$IC_{50} = 0,069 \pm 0,012$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 32

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,02 ± 0,2
3.66	-5.43	0,58 ± 0,29
1.22	-5.91	7,29 ± 1,18
0.40	-6.38	38,22 ± 2,12
0.13	-6.86	78,95 ± 5,8
0.045	-7.34	92,68 ± 1,15

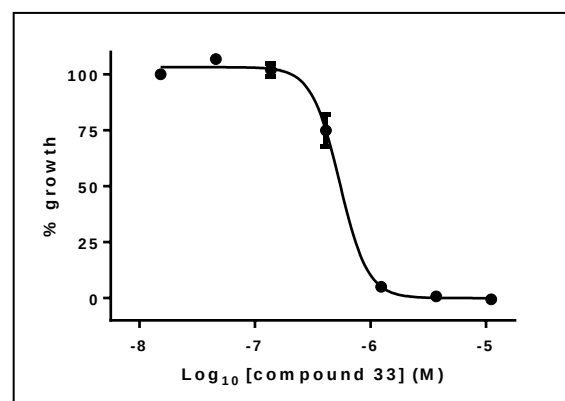


$$IC_{50} = 0,31 \pm 0,03$$

$$R^2 = 0,995$$

Composto 33

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,55 ± 0,25
3.66	-5.43	0,7 ± 0,12
1.22	-5.91	5,02 ± 0,2
0.40	-6.38	74,97 ± 7,06
0.13	-6.86	100 ± 2,9
0.045	-7.34	100 ± 1,6

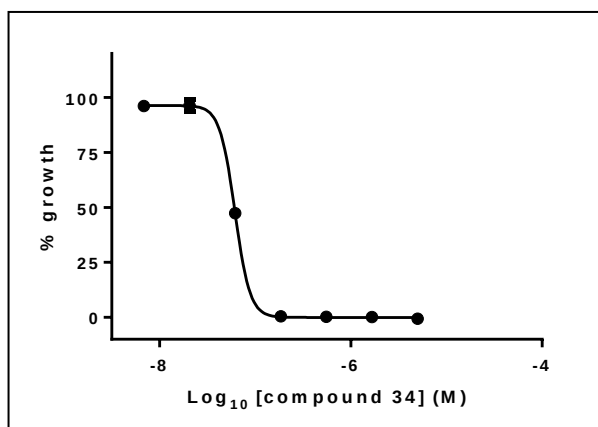


$$IC_{50} = 0,54 \pm 0,05$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 34

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,08 ± 0,19
3.66	-5.43	0,19 ± 0,16
1.22	-5.91	0,42 ± 0,3
0.40	-6.38	0,65 ± 0,2
0.13	-6.86	47,34 ± 1,8
0.045	-7.34	96,36 ± 2,9
0.006	-8.16	96,13 ± 1,29

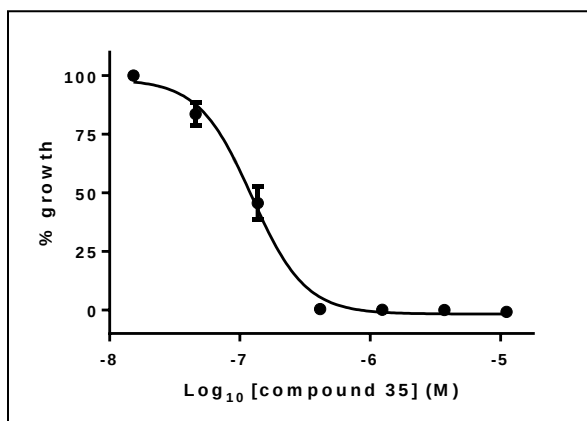


$$IC_{50} = 0,06 \pm 0,001$$

$$R^2 = 0,999$$

Composto 35

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,7 ± 0,1
3.66	-5.43	0,07 ± 0,07
1.22	-5.91	0,18 ± 0,2
0.40	-6.38	0,4 ± 0,2
0.13	-6.86	45,6 ± 6,69
0.045	-7.34	83,64 ± 4,7

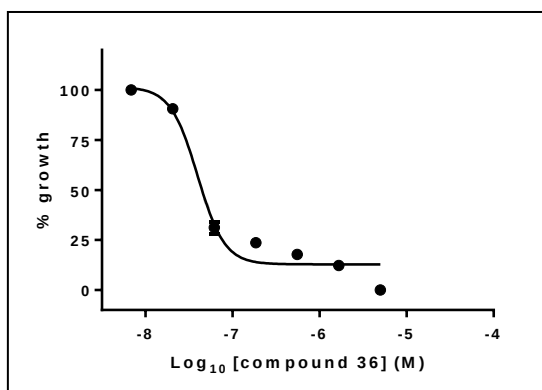


$$IC_{50} = 0,131 \pm 0,017$$

$$R^2 = 0,997$$

Composto 36

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
5	-5.30	0,57 ± 0,35
1.66	-5.77	12,31 ± 1,6
0.55	-6.25	17,77 ± 1,05
0.18	-6.73	23,63 ± 1,3
0.061	-7.2	31,26 ± 3
0.020	-7.68	90 ± 2

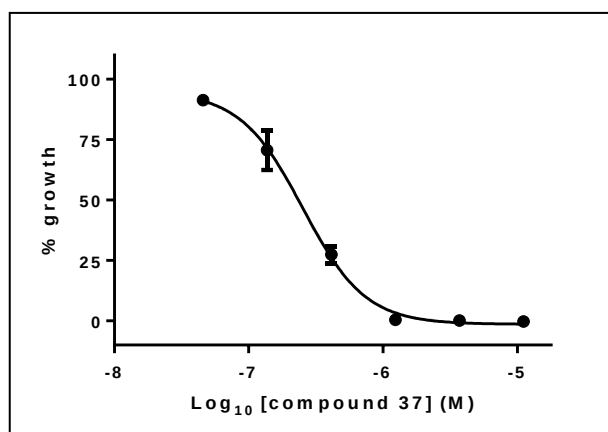


$$IC_{50} = 0,038 \pm 0,00078$$

$$R^2 = 0,968$$

Composto 37

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,2 ± 0,06
3.66	-5.43	0,16 ± 0,06
1.22	-5.91	0,4 ± 0,02
0.40	-6.38	27,45 ± 3,4
0.13	-6.86	70,6 ± 8,28
0.045	-7.34	91,36 ± 2,04

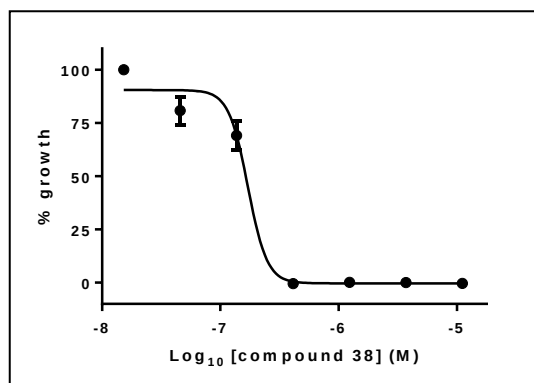


$$IC_{50} = 0,22 \pm 0,02$$

$$R^2 = 0,991$$

Composto 38

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,3 ± 0,19
3.66	-5.43	0,08 ± 0,2
1.22	-5.91	0,18 ± 0,27
0.40	-6.38	0,42 ± 1,3
0.13	-6.86	69,18 ± 7
0.045	-7.34	80 ± 6,5

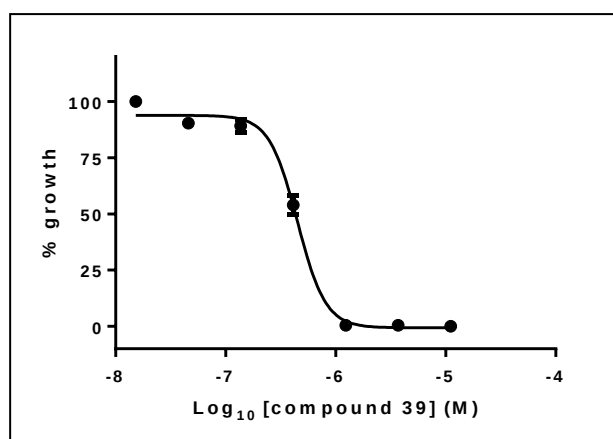


$$IC_{50} = 0,17 \pm 0,009$$

$$R^2 = 0,991$$

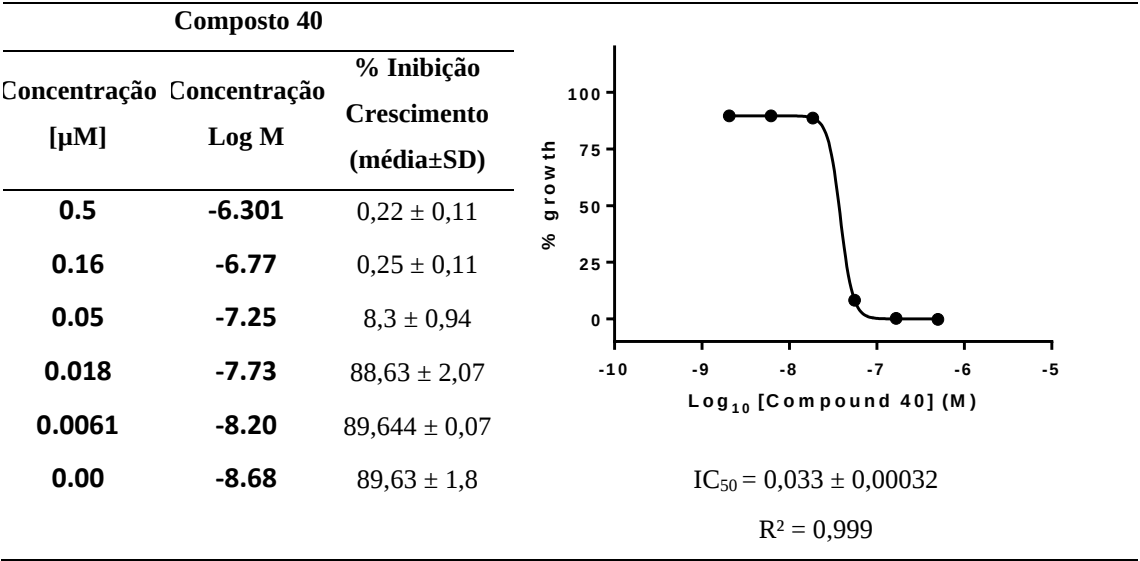
Composto 39

Concentração [μM]	Concentração Log M	% Inibição Crescimento (média±SD)
11	-4.95	0,57 ± 0,35
3.66	-5.43	12,31 ± 1,6
1.22	-5.91	17,77 ± 1,05
0.40	-6.38	23,63 ± 1,3
0.13	-6.86	31,26 ± 3
0.045	-7.34	90 ± 2



$$IC_{50} = 0,444 \pm 0,003$$

$$R^2 = 0,998$$



ANEXO 9 – VALORES DOS DESCRITORES CALCULADOS PARA OS COMPOSTOS 5-NITRO-2-FURFURILIDÊNICOS

Descritores:

EHOMO: energia de o orbital de fronteira HOMO; *ELUMO*: energia do orbital de fronteira LUMO; *GAP*: diferença entre HOMO e LUMO; μ (x, y, z e TOT): momento dipolo elétrico; *CHELPG*: carga de potencial eletrostático para os átomos dos grupamentos 5-nitro e ligação N-acilhidrazina; *D* (1,2,3 e 4): distância entre átomos (Å) dos grupamentos 5-nitro e ligação N-acilhidrazina; *A* (1,2,3,4) ângulos de torção das diedrais dos átomos dos grupamentos 5-nitro e ligação N-acilhidrazina; *ClogP*: coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do Marvin (ChemAxon); *ClogD* (2,7,10): coeficiente de partição calculado aparente em faixas de pH diferentes; *Platt*: índice que descreve a soma dos graus de contorno de superfície; *Randic*: índice que descreve a soma harmônica das médias geométricas dos vértices; *Balaban*: índice que descreve a soma das distancias médias; *Harary*: índice que descreve a soma das metades dos elementos diagonais externos da matriz de distância molecular recíproca; *Hyper Wiener*: variação do índice de Wiener; *Szeged*: índice que estende o de Wiener para diagramas cíclicos, contando pela soma da contagem do número de átomos em ambos os lados de cada ligação; *Wiener*: índice que descreve a soma da distância entre átomos; *Polarity Wiener*: índice que descreve o número de 3 distâncias de ligação na molécula; *Cyclomatic number*: menor número de ligações que deve ser removido para que não haja átomos conectados restante; *fsp3*: número de carbonos sp³ hibridizados divididos pelo número total de carbonos em uma molécula; *Aliphatic atom count*: nº de átomos alifáticos; *Aliphatic bond count*: nº de ligações; *Aromatic atom count*: nº de átomos aromáticos; *Aromatic bond count*: nº de ligações aromáticas; *Bond count*: nº de ligações; *Chain atom count*: nº de átomos em cadeia; *Chain bond count*: nº de ligações em cadeia; *Chiral center count*: nº de centros quirais; *Ring atom count*: nº de anéis; *Ring bond count*: nº de ligações em anéis; *Rotatable bond count*: nº de ligações rotáveis; *Aliphatic ring count*: nº de anéis alifáticos; *Aromatic ring count*: nº de anéis aromáticos; *Carbo ring count*: nº de anéis que contenham somente carbono em uma molécula; *Carboaliphatic ring count*: nº de anéis alifáticos que contenham somente carbonos; *Carboaromatic ring count*: nº de anéis aromáticos que contenham somente carbonos; *Fused aromatic ring count*: nº de anéis aromáticos com ligações em comum com outros anéis; *Fused ring*

count: nº de anéis fundidos em uma molécula; *Hetero ring count*: nº de anéis com hetero átomos em uma molécula; *Heteroaromatic ring count*: nº de anéis aromáticos heterocíclicos; *Largest ring size*: tamanho do maior anel em uma molécula; *Largest ring system size*: Número de anéis no maior sistema de anéis em uma molécula; *Ring count*: nº de anéis em uma molécula; *Ring system count*: nº de sistema de anéis em uma molécula; *avdW*: superfície de Van der Waals de uma molécula ($\text{\AA}^2$); *VvdW*: volume de Van der Waals de uma molécula e substituinte ($\text{\AA}^3$); *ASAR*: Superfície de Van der Waals do substituinte ($\text{\AA}^2$); *ASA*: superfície de acessibilidade ao solvente; *ASA+*: superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos com carga parcial positiva ($\text{\AA}^2$); *ASA-*: superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos com carga parcial negativa ($\text{\AA}^2$); *ASAH*: superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos ($\text{\AA}^2$); *ASAP*: superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos polares ($\text{\AA}^2$); *PSA*: área de superfície polar; *MR*: refratividade molar ($10^6[\text{m}^3/\text{mol}]$); *Pi-energy*: energia π do anel aromático pelo método orbital molecular de Huckel; *Dreiding*: energia das estruturas 3D usando o campo de força Dreiding (kcal/mol); *MW*: peso molecular (g/mol); *Atom Number*: nº de átomos; *Donor count*: soma dos átomos em uma molécula que tem capacidade doadora de hidrogênio; *Donor sites*: soma dos átomos de hidrogênio conectados com átomos doadores de ligação de hidrogênio; *Acceptor count*: nº de átomos aceptores de ligação de hidrogênio; *Acceptor sites*: soma de pares de elétrons nos átomos aceptores de ligações de hidrogênios; *NMR* de ^1H e ^{13}C : dados de deslocamento químico (ppm) de ressonâncias magnéticas nuclear de hidrogênio (^1H – 300 MHz, DMSO- d_6) e carbono (^{13}C – 75 MHz, DMSO- d_6),

Compostos	Y (pIC50 M)	Platt	Randic	Balaba n	Harary	Hyper wiener	Szeged	Wiener	Wiener polarity	Cyclomati c n°
NF	5,22	90	13,43	1,59	61,58	3968	1244	981	25	2
1	6,09	64	9,46	2,1	35,91	1116	397	356	14	1
2	6,22	66	10,02	2,06	43,14	1904	588	537	17	1
3	5,82	112	14,16	2,01	50,35	3149	843	782	19	1
4	5,93	78	11,19	2,06	43,14	1904	588	537	17	1
5	5,25	78	11,56	1,5	52,87	2702	817	725	20	2
6	6,13	112	13,71	1,5	52,87	2702	817	725	20	2
7	5,56	102	13,69	2,12	51,83	2799	800	739	19	1
8	5,34	88	12,89	1,43	57,13	3271	1055	845	23	2
9	5,86	78	11,56	1,5	52,87	2702	817	725	20	2
10	6,18	124	14,96	1,43	57,13	3271	1055	845	23	2
11	6,08	100	14,11	1,61	61,81	3847	1218	968	25	2
12	5,75	100	14,14	1,54	60,71	4171	1231	1007	23	2
13	4,99	100	14,11	1,59	61,58	3968	1244	981	25	2
15	5,34	82	11,95	1,45	57,63	3160	930	831	23	2
16	5,24	90	13,43	1,51	65,8	4821	1453	1137	27	2
17	4,96	112	15,36	1,51	65,8	4821	1453	1137	27	2
18	5,78	102	14,58	1,51	65,8	4821	1453	1137	27	2
19	5,75	88	12,89	1,59	61,58	3968	1244	981	25	2
20	5,57	148	18,21	1,83	61,36	6184	1363	1287	22	1
21	4,79	124	16,61	1,46	70,52	5677	1664	1295	29	2
22	6,18	124	16,61	1,44	69,92	5851	1683	1314	28	2
23	5,60	118	16,23	1,46	70,52	5677	1664	1295	29	2
24	5,80	114	15,83	1,44	69,92	5851	1683	1314	28	2
25	4,80	94	13,81	1,5	71,11	5288	1586	1256	29	2
26	5,96	112	15,72	1,29	77,21	6129	2021	1411	32	3
27	6,42	136	17,86	1,56	73,99	7080	1935	1513	29	2
28	6,45	136	17,86	1,62	75,75	6536	1877	1455	31	2
29	6,31	126	17,08	1,56	73,99	7080	1935	1513	29	2
30	5,45	116	16,26	1,66	75,91	6157	1819	1419	32	2
32	5,89	100	14,11	1,68	76,5	6013	1773	1403	31	2
33	5,77	142	18,77	1,48	78,04	8531	2210	1735	30	2
34	5,44	138	18,33	1,48	78,04	8531	2210	1735	30	2
35	6,05	124	17,54	1,15	85,5	8985	2585	1859	34	3
36	5,45	126	18,02	1,39	91,68	8819	2548	1942	35	3
37	5,78	184	21,21	1,48	78,04	8531	2210	1735	30	2
38	5,80	148	19,11	1,48	78,04	8531	2210	1735	30	2
39	6,45	172	21,61	1,51	86,12	12196	2833	2252	32	2
40	6,69	174	22,08	1,44	90,17	14461	3183	2549	33	2

Compostos	Aliphatic atom	Aliphatic bond	Aromatic atom	Aromatic bond	Bond count	Chain atom	Chain bond	Chiral center	Ring atom	Ring bond
NF	9	10	11	11	30	9	10	0	11	11
1	9	9	5	5	21	9	9	0	5	5
2	11	11	5	5	22	11	11	0	5	5
3	13	13	5	5	33	13	13	0	5	5
4	11	11	5	5	25	11	11	0	5	5
5	8	9	10	10	26	8	9	0	10	10
6	13	14	5	5	32	8	9	0	10	10
7	13	13	5	5	31	13	13	0	5	5
8	8	9	11	11	29	8	9	0	11	11
9	8	9	10	10	26	8	9	0	10	10
10	14	15	5	5	35	8	9	0	11	11
11	9	10	11	11	32	9	10	0	11	11
12	9	10	11	11	32	9	10	0	11	11
13	9	10	11	11	32	9	10	0	11	11
15	9	10	10	10	27	9	10	0	10	10
16	10	11	11	11	30	10	11	0	11	11
17	10	11	11	11	35	10	11	0	11	11
18	10	11	11	11	33	10	11	0	11	11
19	9	10	11	11	29	9	10	0	11	11
20	16	16	5	5	42	16	16	0	5	5
21	11	12	11	11	38	11	12	0	11	11
22	11	12	11	11	38	11	12	0	11	11
23	11	12	11	11	37	11	12	0	11	11
24	11	12	11	11	36	11	12	0	11	11
25	11	12	11	11	31	11	12	0	11	11
26	8	9	15	16	36	8	9	0	15	16
27	12	13	11	11	41	12	13	0	11	11
28	12	13	11	11	41	12	13	0	11	11
29	12	13	11	11	39	12	13	0	11	11
30	12	13	11	11	37	12	13	0	11	11
32	12	13	11	11	32	12	13	0	11	11
33	13	14	11	11	43	13	14	0	11	11
34	13	14	11	11	42	13	14	0	11	11
35	8	10	17	17	40	8	10	0	17	17
36	9	11	17	17	41	9	11	0	17	17
37	19	20	5	5	50	13	14	2	11	11
38	13	14	11	11	44	13	14	0	11	11
39	15	16	11	11	50	15	16	0	11	11
40	16	17	11	11	51	16	17	0	11	11

Composos	Carbo ring	Carboalip hatic ring	Fused aromati c ring	Fused ring	Hetero ring	Heteroa romatic ring	Largest ring size	Largest system size	Ring count	Ring system count
NF	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
2	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
3	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
4	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
5	0	0	0	0	2	2	1	0	2	2
6	1	1	0	0	0	1	1	0	2	2
7	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
8	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
9	0	0	0	0	2	2	1	0	2	2
10	1	1	0	0	1	1	1	0	2	2
11	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
12	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
13	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
15	0	10	0	0	2	2	1	0	2	2
16	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
17	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
18	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
19	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
20	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
21	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
22	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
23	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
24	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
25	1	0	1	0	1	1	6	0	2	2
26	2	0	2	2	1	1	2	0	3	2
27	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
28	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
29	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
30	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
32	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
33	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
34	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2
35	2	0	2	0	1	1	1	0	3	3
36	2	0	2	0	1	1	1	0	3	3
37	1	1	0	0	1	13	1	2	2	2
38	1	0	1	0	1	13	1	0	2	2
39	1	0	1	0	1	15	1	0	2	2
40	1	0	1	0	1	16	1	0	2	2

Compostos	RMN C	RMN H8	RMN H6	ASA	ASA+	ASA-	ASAH	ASAP	PSA	avdW
NF	161,10	12,02	8,39	501,98	266,87	235,11	287,68	214,30	120,65	341,47
1	172,27	11,74	8,14	421,43	254,49	166,93	240,65	180,78	100,42	258,17
2	170,30	12,14	8,14	440,25	234,52	205,72	220,68	219,57	124,21	276,24
3	174,70	11,70	8,16	533,68	333,75	199,93	372,02	161,66	100,42	380,70
4	153,10	11,53	7,98	489,94	285,37	204,58	298,97	190,97	109,65	303,55
5	154,20	12,23	7,99	471,36	291,35	180,01	277,87	193,49	113,56	303,32
6	177,60	11,71	8,19	477,01	284,32	192,69	314,87	162,14	100,42	351,69
7	167,40	11,34	7,97	522,95	307,64	215,32	347,40	175,55	109,65	367,45
8	163,43	12,22	8,42	494,10	261,63	232,48	324,70	169,40	100,42	330,31
9	159,10	12,03	8,01	475,86	279,93	195,93	299,95	175,91	100,42	305,72
10	177,20	11,66	8,18	486,92	296,01	190,91	326,85	160,07	100,42	379,46
11	163,60	12,18	8,41	534,43	294,90	239,53	366,27	168,16	100,42	362,92
12	172,60	11,97	8,22	529,03	304,65	224,38	360,89	168,14	100,42	365,46
13	163,27	12,15	8,40	533,41	291,34	242,08	362,78	170,63	100,42	363,18
15	163,50	12,75	8,09	495,13	246,25	248,88	292,64	202,48	126,20	325,93
16	162,10	12,40	8,41	504,44	260,07	244,37	296,64	207,80	124,21	347,51
17	163,40	12,15	8,41	561,62	318,92	242,70	391,90	169,72	100,42	393,39
18	162,40	11,92	8,44	560,17	347,23	212,93	352,70	207,47	109,65	378,11
19	162,32	12,30	8,43	511,11	249,82	261,29	341,68	169,43	100,42	346,89
20	174,70	11,69	8,16	626,32	402,89	223,43	462,60	163,72	100,42	472,79
21	163,40	12,16	8,43	576,63	336,99	239,65	407,46	169,17	100,42	422,91
22	163,30	12,16	8,42	575,87	335,87	240,00	406,17	169,70	100,42	423,54
23	163,20	11,93	8,40	581,58	374,44	207,14	405,65	175,92	103,66	417,33
24	163,40	11,91	8,45	577,33	355,33	222,00	393,35	183,98	109,65	408,92
25	161,30	12,50	8,75	536,92	288,70	248,22	366,93	169,98	146,24	371,11
26	163,50	12,20	8,49	551,19	302,37	248,82	382,62	168,58	100,42	392,31
27	163,29	12,17	8,44	606,68	359,75	246,93	436,01	170,67	100,42	454,18
28	163,40	12,16	8,43	588,22	346,10	242,11	418,66	169,56	100,42	457,58
29	161,70	12,07	8,67	608,91	367,74	241,16	426,59	182,31	109,65	439,04
30	162,90	12,06	8,42	604,93	401,88	203,05	383,81	221,13	118,88	424,59
32	162,00	12,39	8,42	544,37	257,08	287,28	273,70	270,67	100,42	380,39
33	165,70	11,84	8,37	640,56	396,90	243,66	436,87	203,69	112,45	473,79
34	162,80	12,09	8,41	652,14	411,20	240,93	471,78	471,78	109,65	470,05
35	170,50	12,08	8,47	594,89	325,09	269,81	426,88	168,02	100,42	434,18
36	169,50	12,14	8,30	627,68	374,79	252,89	443,53	184,15	109,65	454,45
37	177,30	11,67	8,17	623,08	406,90	216,18	464,10	158,98	100,42	530,08
38	163,30	12,15	8,41	658,33	395,72	262,61	488,83	169,50	100,42	484,70
39	163,30	12,15	8,42	693,37	431,47	261,89	523,90	169,47	100,42	545,13
40	161,80	12,09	8,41	738,99	477,12	261,87	558,87	180,12	109,65	561,65

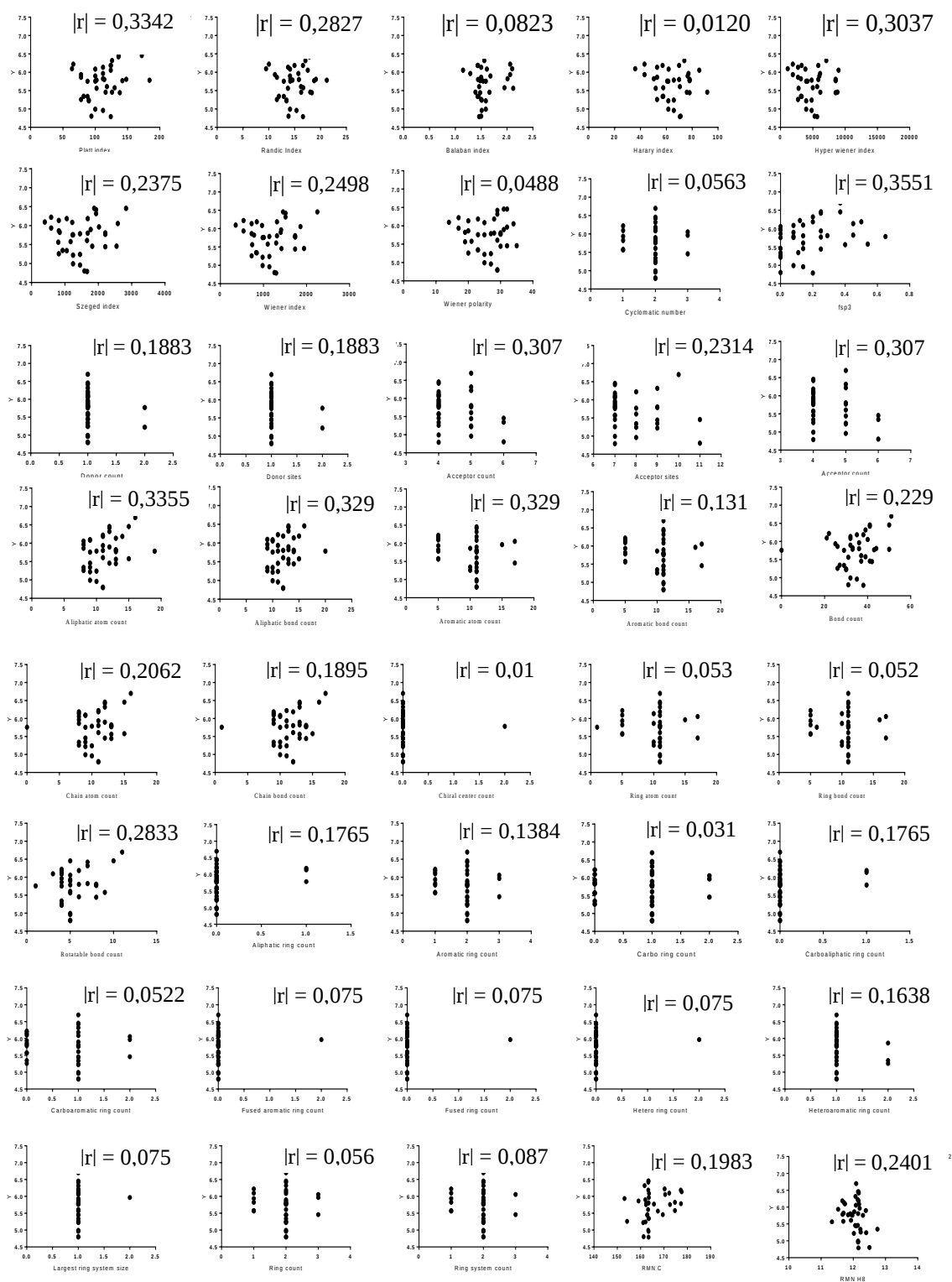
Compostos	vdW	MR	Dreidin g	Pi energy	Atom n°	MM	LopP	logD2	logD7	logD10
NF	218,36	69,19	106,11	43,72	29,00	275,22	1,80	1,75	1,73	0,19
1	156,46	46,53	73,16	30,99	21,00	197,15	0,20	0,20	0,20	0,19
2	173,98	51,86	79,85	33,60	22,00	222,16	0,15	0,15	0,14	-1,03
3	224,81	64,96	85,80	30,99	33,00	253,26	2,23	2,23	2,23	2,23
4	182,17	52,91	78,95	35,36	25,00	227,18	1,17	1,17	1,17	1,09
5	189,95	59,60	115,99	40,57	25,00	249,18	1,11	1,11	1,11	0,69
6	213,18	63,14	90,24	30,99	31,00	251,24	1,87	1,87	1,87	1,86
7	216,37	61,96	86,32	35,36	31,00	255,23	1,87	1,87	1,87	1,78
8	210,42	67,20	104,05	39,40	28,00	259,22	2,05	2,05	2,05	1,97
9	197,16	64,09	237,00	38,86	25,00	265,24	1,97	1,97	1,97	1,83
10	230,28	67,74	90,17	30,99	34,00	265,27	2,31	2,31	2,31	2,31
11	227,30	72,25	105,38	39,40	31,00	273,25	2,57	2,57	2,57	1,49
12	228,45	71,26	102,54	38,99	31,00	273,25	2,03	2,03	2,03	2,03
13	227,34	72,25	105,61	39,40	31,00	273,25	2,27	2,57	2,57	2,51
15	208,76	65,88	97,04	40,21	26,00	281,25	0,91	0,90	0,90	0,23
16	226,70	72,93	103,58	42,44	29,00	284,23	1,91	1,91	1,91	1,72
17	244,42	76,85	107,86	39,40	34,00	287,28	3,01	3,01	3,01	2,96
18	236,21	73,67	112,89	43,72	32,00	289,25	1,89	1,89	1,89	1,82
19	224,17	72,01	102,26	42,51	28,00	293,66	2,66	2,66	2,68	2,52
20	276,04	78,77	91,30	30,99	42,00	295,34	3,57	3,57	3,57	3,56
21	261,53	81,40	111,81	39,40	37,00	301,30	3,30	3,30	3,30	3,24
22	261,48	81,45	110,46	39,40	37,00	301,30	3,46	3,45	3,46	3,40
23	256,63	81,63	121,11	42,46	36,00	302,29	2,16	0,87	2,16	2,16
24	253,21	78,42	113,44	43,72	35,00	303,27	2,25	2,25	2,25	2,18
25	232,91	74,53	112,13	51,16	30,00	304,22	1,99	1,99	1,99	1,56
26	253,70	83,65	122,17	45,08	34,00	309,28	3,04	3,04	3,04	2,96
27	278,59	86,05	113,07	39,40	40,00	315,33	3,90	3,90	3,90	3,94
28	278,83	85,87	122,25	39,40	40,00	315,33	3,60	3,60	3,60	3,54
29	270,31	82,94	118,21	43,72	38,00	317,30	2,77	2,77	2,70	2,70
30	262,02	80,13	125,44	48,02	36,00	319,27	1,74	1,74	1,74	1,59
32	242,26	73,18	109,14	55,66	31,00	327,22	2,93	2,93	2,93	2,76
33	290,22	91,27	119,07	42,46	42,00	330,34	2,85	1,13	2,85	2,85
34	287,40	87,54	119,89	43,72	41,00	331,33	3,22	3,22	3,22	3,14
35	281,80	92,34	143,55	47,79	38,00	335,32	3,70	3,70	3,70	3,60
36	290,88	93,45	134,36	51,85	39,00	351,32	3,55	3,55	3,55	3,46
37	315,76	90,63	106,96	30,99	49,00	335,40	4,38	4,38	4,38	4,37
38	295,63	90,65	114,84	39,40	43,00	329,36	4,34	4,34	4,34	4,29
39	329,80	99,65	120,62	39,40	49,00	357,41	5,23	5,23	5,23	5,18
40	338,60	101,34	124,56	43,72	50,00	373,41	4,55	4,55	4,55	4,48

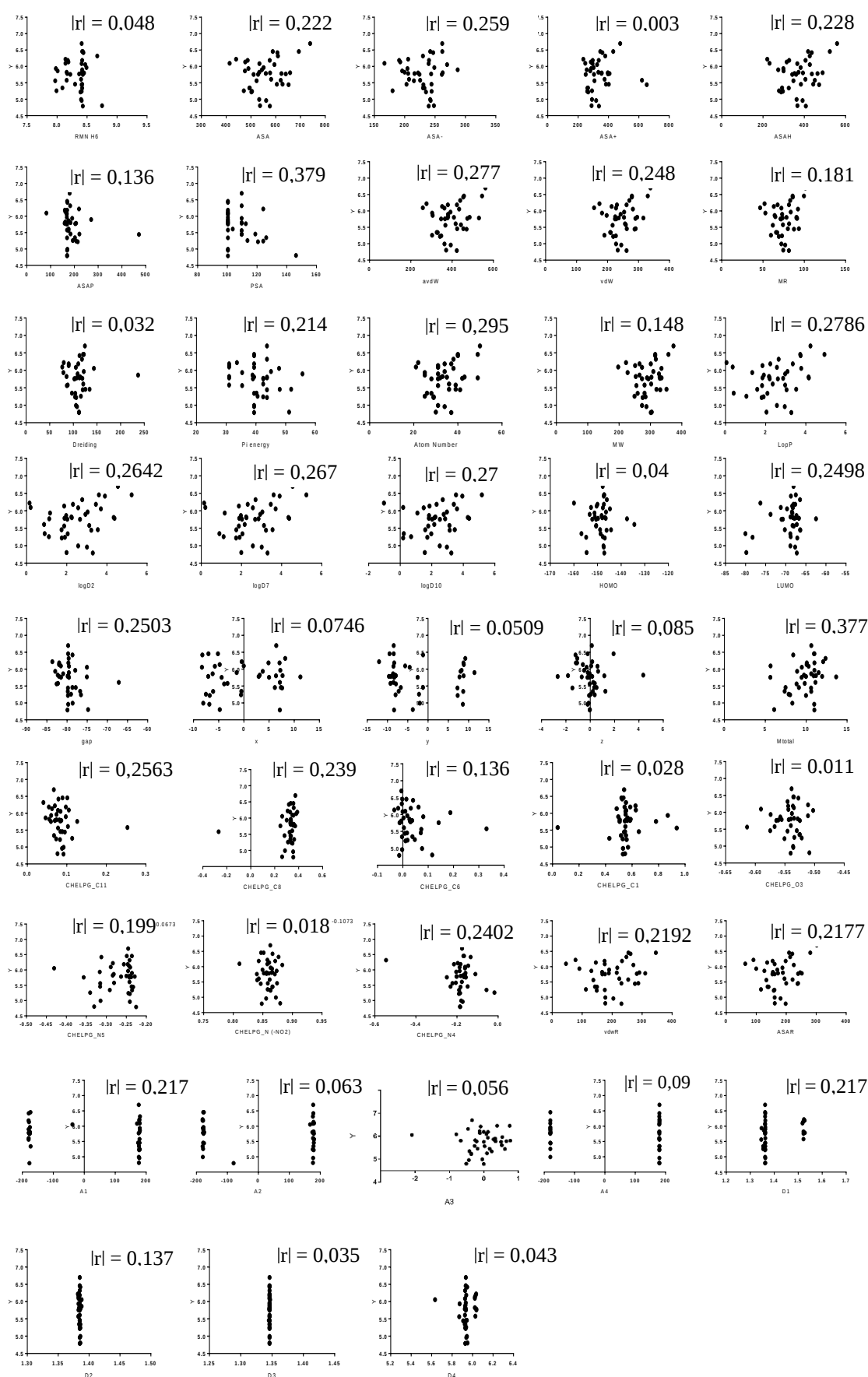
Compostos	HOMO	LUMO	gap	x	y	z	Mtotal	vdwR	ASAR	CHELPG C11
NF	-146,90	-67,13	-79,77	-6,79	7,31	-0,09	9,98	148,75	158,59	0,08
1	-151,92	-69,28	-82,63	-4,43	9,11	-0,01	10,13	46,01	63,36	0,05
2	-159,96	-76,31	-83,64	-0,51	-12,03	0,16	12,05	77,92	90,71	0,07
3	-151,09	-68,80	-82,28	3,17	-8,09	4,35	9,72	166,81	155,77	0,06
4	-151,26	-68,34	-82,92	3,75	7,96	0,66	8,82	90,83	99,97	0,06
5	-147,77	-68,76	-79,00	-7,54	-2,23	0,04	7,86	112,48	115,80	0,11
6	-150,37	-68,40	-81,97	-4,80	8,82	-0,60	10,06	145,74	136,66	0,06
7	-150,60	-68,01	-82,58	-3,91	-7,91	-0,05	8,83	137,51	133,78	0,08
8	-148,67	-68,86	-79,81	-5,92	8,62	0,24	10,46	149,69	141,12	0,07
9	-148,28	-67,32	-80,95	-6,20	-8,63	-0,03	10,62	130,76	127,23	0,05
10	-150,01	-68,08	-81,93	4,89	8,75	-1,08	10,08	174,80	154,83	0,05
11	-147,73	-68,23	-79,50	-5,76	-8,52	0,60	10,30	175,47	161,40	0,08
12	-152,20	-70,70	-81,49	5,00	-2,56	-0,08	5,62	176,11	161,36	0,13
13	-147,46	-68,85	-78,60	-8,06	-2,03	-0,13	8,31	177,37	161,44	0,09
15	-156,78	-80,04	-76,73	-0,50	-7,24	1,25	7,37	142,81	137,99	0,07
16	-154,79	-78,26	-76,53	-0,56	-8,01	0,37	8,04	175,61	160,69	0,07
17	-147,36	-67,65	-79,70	-6,85	8,58	-0,21	10,98	204,03	181,19	0,09
18	-146,53	-66,71	-79,81	-7,07	-9,64	0,17	11,95	188,95	172,52	0,09
19	-150,57	-71,05	-79,52	-4,41	-8,35	-0,22	9,44	167,35	154,05	0,06
20	-150,81	-68,64	-82,17	4,57	2,26	8,78	10,15	253,59	221,13	0,07
21	-147,14	-67,24	-79,89	7,15	-8,37	-0,04	11,00	230,93	198,11	0,09
22	-147,29	-67,63	-79,66	7,08	-8,34	-1,18	11,01	232,91	198,03	0,10
23	-134,41	-67,25	-67,15	7,17	-8,53	0,25	11,14	223,84	194,31	0,10
24	-147,99	-68,22	-79,77	6,38	8,78	1,16	10,92	215,34	189,03	0,08
25	-154,59	-79,81	-74,77	-4,79	-3,76	-0,02	6,09	177,20	161,87	0,08
26	-146,41	-68,46	-77,95	7,24	8,28	-0,50	11,01	217,30	187,40	0,07
27	-147,34	-68,70	-78,63	-8,24	-1,23	-1,21	8,42	261,39	220,44	0,08
28	-147,22	-67,49	-79,72	-7,03	-8,46	-0,21	11,00	254,34	209,76	0,10
29	-146,03	-66,44	-79,59	8,21	9,19	-1,07	12,37	247,61	213,15	0,04
30	-144,26	-66,42	-77,84	6,15	-6,71	0,52	9,12	230,95	200,03	0,09
32	-153,33	-73,78	-79,54	-1,42	11,44	-0,20	11,53	190,04	170,40	0,10
33	-137,52	-62,45	-75,06	11,23	7,76	-0,70	13,67	282,31	239,70	0,08
34	-146,15	-66,37	-79,77	7,60	7,25	-1,47	10,61	276,18	237,88	0,09
35	-144,73	-69,67	-75,06	-8,32	-4,52	-0,29	9,47	271,08	225,40	0,08
36	-148,89	-70,23	-78,66	7,37	-1,25	0,33	7,48	287,49	239,59	0,08
37	-149,75	-67,80	-81,94	2,95	-9,15	-2,67	9,98	310,46	252,09	0,07
38	-146,90	-67,23	-79,67	7,69	-7,92	-1,83	11,19	290,69	246,46	0,07
39	-147,15	-67,44	-79,70	-5,15	-9,50	1,92	10,97	345,99	280,42	0,09
40	-147,78	-68,06	-79,72	6,43	-8,46	0,13	10,63	364,01	301,97	0,07

Compostos	CHELPGC8	CHELPGC6	CHELPGC1	CHELPGO3	CHELPGN4	CHELPG N(NO ₂)	CHELPGN5	A1
NF	0,34	0,01	0,55	-0,55	-0,19	0,86	-0,24	177,49
1	0,34	0,02	0,64	-0,54	-0,16	0,87	-0,28	179,20
2	0,30	0,06	0,62	-0,51	-0,20	0,85	-0,28	178,35
3	0,33	0,04	0,58	-0,53	-0,17	0,86	-0,28	-177,74
4	0,30	0,08	0,86	-0,57	-0,20	0,86	-0,31	179,54
5	0,31	0,05	0,42	-0,53	-0,02	0,85	-0,34	177,94
6	0,37	-0,03	0,48	-0,53	-0,15	0,86	-0,24	-178,51
7	0,32	0,07	0,93	-0,61	-0,22	0,84	-0,31	-179,63
8	0,36	0,00	0,51	-0,52	-0,19	0,86	-0,23	-173,25
9	0,33	0,03	0,56	-0,55	-0,11	0,87	-0,28	179,80
10	0,38	-0,02	0,54	-0,53	-0,18	0,87	-0,25	177,69
11	0,35	0,00	0,55	-0,54	-0,19	0,85	-0,24	170,60
12	0,24	0,14	0,78	-0,56	-0,25	0,84	-0,35	-177,79
13	0,28	0,08	0,56	-0,53	-0,18	0,87	-0,31	176,24
15	0,33	0,04	0,55	-0,52	-0,06	0,86	-0,29	176,80
16	0,33	0,02	0,52	-0,52	-0,18	0,86	-0,24	179,52
17	0,35	0,00	0,53	-0,53	-0,17	0,85	-0,24	177,84
18	0,35	-0,01	0,58	-0,55	-0,20	0,85	-0,23	-179,44
19	0,37	-0,01	0,50	-0,52	-0,16	0,87	-0,24	-175,63
20	0,36	0,01	0,61	-0,55	-0,14	0,85	-0,29	178,58
21	0,35	-0,01	0,53	-0,54	-0,18	0,84	-0,23	-176,94
22	0,32	0,03	0,58	-0,54	-0,21	0,84	-0,25	-179,56
23	0,34	0,00	0,54	-0,53	-0,18	0,84	-0,24	-179,37
24	0,33	0,03	0,55	-0,53	-0,18	0,86	-0,25	178,30
25	0,26	0,12	0,54	-0,51	-0,19	0,87	-0,33	176,63
26	0,33	0,02	0,55	-0,53	-0,19	0,86	-0,25	-175,37
27	0,31	0,04	0,52	-0,52	-0,13	0,86	-0,31	-179,16
28	0,35	0,00	0,52	-0,53	-0,17	0,84	-0,24	-173,67
29	0,35	0,00	0,55	-0,54	-0,55	0,87	-0,24	180,00
30	0,33	0,02	0,65	-0,57	-0,23	0,85	-0,24	178,78
32	0,33	0,00	0,49	-0,51	-0,16	0,84	-0,24	-179,59
33	0,36	-0,01	0,54	-0,56	-0,17	0,85	-0,24	175,97
34	0,33	0,01	0,54	-0,54	-0,18	0,84	-0,23	175,91
35	0,26	0,19	0,55	-0,50	-0,16	0,88	-0,43	-38,05
36	0,28	0,07	0,54	-0,52	-0,15	0,87	-0,32	174,13
37	0,35	0,03	0,56	-0,54	-0,20	0,86	-0,26	-178,96
38	0,35	-0,01	0,50	-0,52	-0,16	0,85	-0,24	-175,21
39	0,33	0,01	0,53	-0,53	-0,17	0,85	-0,25	-174,05
40	0,37	-0,01	0,54	-0,53	-0,18	0,86	-0,25	176,00

Compostoss	A2	A3	A4	D1	D2	D3	D4
NF	178,74	-0,36	179,71	1,36	1,39	1,35	5,93
1	179,96	0,08	-179,88	1,52	1,38	1,35	6,02
2	-179,96	-0,12	179,96	1,52	1,38	1,35	6,04
3	178,48	-0,25	179,62	1,52	1,38	1,35	6,02
4	-179,00	0,12	-179,91	1,35	1,38	1,35	5,87
5	-178,39	0,09	-179,58	1,35	1,39	1,35	5,94
6	178,34	-0,11	179,81	1,52	1,38	1,35	6,02
7	179,60	0,02	179,90	1,35	1,38	1,35	5,87
8	-179,80	0,23	179,77	1,36	1,39	1,35	5,93
9	-177,19	0,28	-179,63	1,36	1,39	1,35	5,93
10	-178,44	0,12	-179,69	1,53	1,38	1,35	6,03
11	176,38	-0,80	179,79	1,36	1,38	1,35	5,93
12	179,53	0,00	179,67	1,52	1,38	1,35	6,04
13	-179,32	-0,05	-179,75	1,36	1,39	1,35	5,95
15	178,40	-0,42	179,80	1,35	1,38	1,35	5,92
16	175,98	-0,36	179,76	1,36	1,39	1,35	5,93
17	176,99	-0,43	179,56	1,36	1,39	1,35	5,94
18	-175,35	0,66	-179,16	1,36	1,39	1,35	5,92
19	-176,86	0,50	-179,83	1,36	1,39	1,35	5,94
20	179,61	-0,27	179,61	1,52	1,38	1,35	6,03
21	-79,85	0,00	179,83	1,36	1,39	1,35	5,93
22	-180,00	0,00	180,00	1,36	1,39	1,35	5,94
23	176,70	0,52	179,31	1,36	1,39	1,35	5,93
24	174,49	-0,67	179,33	1,36	1,39	1,35	5,93
25	176,66	-0,51	179,50	1,36	1,39	1,35	5,95
26	-177,01	0,54	-179,77	1,36	1,39	1,35	5,93
27	177,69	-0,09	179,71	1,36	1,39	1,35	5,95
28	-176,00	0,75	-179,73	1,36	1,39	1,35	5,93
29	176,41	-0,46	179,36	1,36	1,39	1,35	5,93
30	-178,08	0,17	-179,81	1,36	1,39	1,35	5,94
32	-177,06	0,33	-179,64	1,36	1,39	1,35	5,93
33	177,90	-0,21	-179,93	1,36	1,39	1,35	5,93
34	-175,52	0,61	-179,04	1,36	1,39	1,35	5,91
35	167,27	-2,09	179,29	1,36	1,39	1,35	5,63
36	179,20	-0,18	-179,88	1,36	1,39	1,35	5,94
37	-178,48	0,34	-179,74	1,53	1,38	1,35	6,04
38	-175,32	0,77	-179,30	1,36	1,39	1,35	5,93
39	-177,82	0,39	-179,97	1,36	1,39	1,35	5,93
40	177,32	-0,34	179,95	1,36	1,39	1,35	5,93

ANEXO 10 – GRAFICOS DE DISPERSÃO DOS DESCRITORES MOLECULARES CALCULADOS *VERSUS* ATIVIDADE BIOLOGICA (PIC₅₀) FRENTE A FORMA PROMASTIGOTA DE *L. (L.) INFANTUM*





**ANEXO 11 -VALORES ABSOLUTOS DE COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO
DE PEARSON PARA O CONJUNTO T E L**

Descritores	Coeficiente		Descritores	Coeficiente	
	Pearson			Pearson	
	<i>L</i>	<i>T</i>		<i>L</i>	<i>T</i>
Platt index	0,323	0,629	Stereo double bond count	0,176	0,063
Randic index	0,275	0,627	Aliphatic ring count	0,138	0,211
Balaban index	0,089	0,302	Aromatic ring count	0,032	0,284
Harary index	0,118	0,512	Carbo ring count	0,176	0,063
Hyper wiener index	0,300	0,628	Carboaliphatic ring count	0,052	0,234
Szeged index	0,235	0,596	Carboaromatic ring count	0,075	0,045
Wiener index	0,246	0,603	Fused aromatic ring count	0,075	0,045
Wiener polarity	0,047	0,424	Fused ring count	0,205	0,052
Cyclomatic number	0,056	0,272	Hetero ring count	0,164	0,083
fsp3	0,350	0,331	Heteroaromatic ring count	0,038	0,219
Donor count	0,129	0,251	Largest ring system size	0,075	0,045
Donor sites	0,129	0,251	Largest ring system size	0,075	0,045
Acceptor count	0,307	0,356	Ring count	0,056	0,272
Acceptor sites	0,231	0,255	Ring system count	0,087	0,276
Aliphatic atom count	0,326	0,343	RMN C	0,198	0,080
Aliphatic bond count	0,320	0,403	RMN H8	0,240	0,070
Aromatic atom count	0,137	0,221	RMN H6	0,048	0,100
Aromatic bond count	0,131	0,220	ASA	0,222	0,614
Atom count	0,290	0,629	ASA+	0,259	0,554
Bond count	0,285	0,633	ASA-	0,004	0,376
Chain atom count	0,252	0,341	ASAH	0,284	0,711
Chain bond count	0,247	0,417	ASAP	0,253	0,499
Chiral center count	0,011	0,200	PSA	0,380	0,491
Ring atom count	0,059	0,287	avdW	0,277	0,622
Ring bond count	0,054	0,285	vdW	0,248	0,622

Descritores	Coeficiente Pearson		Descritores	Coeficiente Pearson	
	<i>L</i>	<i>T</i>		<i>L</i>	<i>T</i>
Rotatable bond count	0,291	0,559	vdwR	0,240	0,072
Molar Refractivity (MR)	0,182	0,594	ASAR	0,219	0,633
Dreiding	0,032	0,291	A1	0,218	0,604
Pi energy	0,215	0,008	A2	0,063	0,252
N° Atoms	0,295	0,629	A3	0,057	0,147
MM	0,147	0,547	A4	0,093	0,041
LopP	0,279	0,700	D1	0,217	0,254
logD2	0,264	0,696	D2	0,138	0,125
logD7	0,267	0,703	D3	0,035	0,281
logD10	0,270	0,767	D4	0,043	0,153
HOMOkcal	0,041	0,199			
LUMOkcal	0,160	0,357			
gap	0,149	0,144			
x	0,075	0,165			
y	0,051	0,091			
z	0,086	0,152			
Mtotal	0,378	0,183			
CHELPG_C13	0,256	0,067			
CHELPG_C10	0,239	0,054			
CHELPG_C9	0,136	0,025			
CHELPG_C8	0,028	0,075			
CHELPG_O1	0,011	0,629			
CHELPG_5N	0,199	0,002			
CHELPG_N (-NO2)	0,019	0,020			
CHELPG_N6	0,073	0,037			

ANEXO 12 - SCRIPT UTILIZADO PARA CÁLCULO DO COEFICIENTE DE TANIMOTO

```

### calcular coeficiente de Tanimoto a partir de arquivos .mol2 das moléculas usando
programa babel, criando arquivo .csv com as moléculas, atividades e similaridade. (
lembrar de aplicar equação para calcular SALI)

#!/bin/bash
rm arestasok.csv
echo "Molécula1, Molécula2;Tipo,Tanimoto, atividade1, atividade2" > arestasok.csv
awk '{print $1}' $1 > colunamol
for i in `more colunamol`
do
for j in `more colunamol`
do
line1=`sed -n /${i}/= < $1`
line2=`sed -n /${j}/= < $1`
if [ "$line1" -lt "$line2" ]
then
echo "${i}_${j}" > compare
tani=$(babel $i,mol2 $j,mol2 -ofpt | grep "Tanimoto from" | awk '{print $6}')
ativ1=`sed -n "${line1}p" $1 | awk '{print $2}`
ativ2=`sed -n "${line2}p" $1 | awk '{print $2}`
echo "$line1;$line2;Undirected;$tani;$ativ1;$ativ2" >> arestaresutado.csv
fi
done
done
perl -ni,bak -e "print unless /;/" arestaresutado.csv

```