



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANA LUIZA SILVA

**PLANEJAMENTO E TRIAGEM VIRTUAL DE INIBIDORES DA
ENZIMA ARGINASE DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS***

Londrina
2024

MARIANA LUIZA SILVA

**PLANEJAMENTO E TRIAGEM VIRTUAL DE INIBIDORES DA
ENZIMA ARGINASE DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS***

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Marcelle de Lima
Ferreira Bispo
Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Cristina Perez

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M333p Silva, Mariana Luiza .
PLANEJAMENTO E TRIAGEM VIRTUAL DE INIBIDORES DA ENZIMA ARGINASE DE LEISHMANIA AMAZONENSIS / Mariana Luiza Silva. - Londrina, 2024.
82 f. : il.

Orientador: Marcelle de Lima Ferreira Bispo.
Coorientador: Carla Cristina Perez.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Docagem molecular - Tese. 2. ADMET - Tese. 3. Imidazopiridinas - Tese. 4. Leishmanioses - Tese. I. Bispo, Marcelle de Lima Ferreira . II. Perez, Carla Cristina . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

MARIANA LUIZA SILVA

**PLANEJAMENTO E TRIAGEM VIRTUAL DE INIBIDORES DA
ENZIMA ARGINASE DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS***

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Carla Cristina Perez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Nilton Syoga Arakawa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Luis Fernando Cabeça
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
- UTFPR

Londrina, 23 de fevereiro de 2024.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pois sem ele não poderia ter as oportunidades e dádivas que tive durante todo o período do mestrado.

Á minha família que não mediu esforços para me apoiar durante minha caminhada.

Aos meus amigos que seguiram e enfrentaram todos os obstáculos comigo até o final.

Á minha orientadora Marcelle de Lima Ferreira Bispo e minha co-orientadora Carla Cristina Perez que além de amigas, me acompanharam em cada passo e me fizeram crescer muito pessoal e profissionalmente.

E aos meus companheiros do Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais (LaSMMed) que me proporcionaram momentos incríveis e de muito aprendizado.

RESUMO

SILVA, Mariana Luiza. **Planejamento e triagem virtual de inibidores da enzima arginase de *Leishmania amazonensis***. 2024. p. 72. Qualificação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania spp.*, transmitidas por insetos flebotomíneos. Pode se apresentar em diversas formas clínicas, como cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV). A sua prevalência global é alarmante, com 600 mil a 1 milhão de novos casos de LC e cerca de 50.000 a 90.000 novos casos de LV anualmente, resultando em 20.000 a 30.000 mortes. Nas Américas, foram notificados entre 2001 e 2021, 1.105.545 casos de LC e LMC, além de 69.665 casos de LV, sendo o Brasil responsável por 93% dessas notificações. O tratamento atual enfrenta desafios significativos, como poucos fármacos disponíveis, sendo a maioria deles injetáveis. Além disso, já há a presença de cepas resistentes. Diante desse cenário, a necessidade de descoberta de novos fármacos é evidenciada, e o emprego de estratégias como a docagem molecular surge como uma abordagem promissora, levando a redução de custo e tempo deste processo. Neste contexto, a arginase, um alvo relevante para a leishmaniose, destaca-se como uma macromolécula chave no metabolismo do parasito, sendo sua inibição um caminho promissor na descoberta de novos fármacos. Portanto, este estudo visa a descoberta de potenciais inibidores de arginase de *Leishmania amazonensis* (LaARG), empregando a técnica de docagem molecular. Para isso, foi realizado o planejamento de 100 novos derivados baseados em três compostos previamente identificados por nosso grupo de pesquisa, sendo dois deles contendo o núcleo indólico, o **LMed27** e **LMed36**, e uma tiazolidinona **R-S LMed47** utilizando estratégias como bioisosterismo, hibridação e simplificação molecular. Os derivados e o alvo molecular (LaARG) foram adequadamente preparados para o cálculo computacional, utilizando ferramentas como o Discovery Studio, Marvin Sketch e Chemdraw. O processo de docagem foi conduzido no sítio ativo da LaARG, considerando o centro dos íons manganês como âncora. O protocolo foi validado por meio da metodologia de escala e consenso através do cálculo do *Root Mean Square Deviation* (RMSD), e a análise das interações e a seleção dos compostos foram realizadas utilizando o software Pymol. Além disso, os análogos foram submetidos à análise de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, utilizando ferramentas como o SwissADME, ADMETlab e STOPtox, utilizadas para prever a absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade destes compostos. Os resultados revelaram a seleção de 10 compostos promissores, todos da classe das tetraimidazopiridinas hibridizadas com a tiazolidinona. Seis destes passaram pela etapa de validação, sendo que, dentre esses, as substâncias **61 (R)** e **57 (R)** destacaram-se por apresentarem as melhores interações com LaARG, tanto pelas interações com os íons quanto pela quantidade de interações por ligação de hidrogênio. Além disso, a substância **57 (R)** se sobressaiu nas análises ADMET e de fármaco-similaridade, indicando seu potencial como um inibidor eficaz e farmacologicamente viável para o tratamento da leishmaniose. Como perspectivas, pretende-se sintetizar e avaliar *in vitro* o potencial antileishmania das substâncias selecionadas.

Palavras-chave: Docagem molecular, ADMET, imidazopiridinas, leishmaniose.

Abstract

SILVA, Mariana Luiza. **Design and virtual screening of *Leishmania amazonensis* arginase enzyme inhibitors**. 2024. p. 72. Master Qualification (Master in Chemistry) – Exact Sciences Center, Department of Chemistry, State University of Londrina, Londrina, 2024.

Leishmaniasis are parasitic diseases caused by the protozoan of the genus *Leishmania* spp., transmitted by phlebotomine insects. They can manifest in different clinical forms, such as cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL) and visceral (VL). The global prevalence is alarming, with 600,000 to 1 million new cases of CL and approximately 50,000 to 90,000 new cases of VL annually, resulting in 20,000 to 30,000 deaths. Between 2001 and 2021 in the Americas, 1,105,545 cases of CL and MCL and 69,665 cases of VL have been reported, with Brazil being responsible for 93% of these notifications. Current treatment faces significant challenges: few available drugs, most of which are injectable, and the emergence of drug-resistant strains. In this scenario, the need for new drug discovery is evident, and using strategies such as molecular docking is proving to be a promising approach, leading to cost and time reductions in this process. In this context, arginase, a relevant target for leishmaniasis, stands out as a critical macromolecule in the parasite's metabolism, and its inhibition holds promise for discovering new drugs. Therefore, this study aims to discover potential *Leishmania amazonensis* (LaARG) arginase inhibitors using molecular docking. For this purpose, 100 new derivatives were designed based on three compounds previously identified by our research group, two of which contain the indole ring, **LMed27** and **LMed36**, and a thiazolidinone **R-S LMed47**, using strategies such as bioisosterism, molecular hybridization, and molecular simplification. The derivatives and the molecular target (LaARG) were adequately prepared for computational calculations using Discovery Studio, Marvin Sketch, and Chemdraw tools. The docking process was carried out in the active site of LaARG, considering the center of manganese ions as an anchor. The protocol was validated through a scale methodology and consensus through Root Mean Square Deviation (RMSD) calculation, and the analysis of interactions and the selection of compounds were performed using the Pymol software. Additionally, the analogs were analyzed for physicochemical and pharmacokinetic properties using tools such as SwissADME, ADMETlab, and STOPTox to predict these compounds' absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity. The results allowed the selection of 10 promising compounds, all belonging to the class of imidazopyridines hybridized with thiazolidinone. Six of them underwent the validation phase, among which compounds **61 (R)** and **57 (R)** stood out for showing the best interactions with LaARG in terms of interactions with ions and the number of hydrogen bonds. Furthermore, compound **57 (R)** excelled in ADMET and drug-likeness analyses, indicating its potential as an effective and pharmacologically viable inhibitor for leishmaniasis treatment. As a perspective, it is intended to synthesize and evaluate *in vitro* the anti-*Leishmania* potential of the selected compounds.

Word-keys: molecular *docking*, ADMET, imidazopyridines, leishmaniasis.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> spp.	17
Figura 2. Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses	19
Figura 3. Representação cristalográfica da estrutura trimérica de ARG de <i>L. mexicana</i>	20
Figura 4. Conversão da L-arginina em L-ornitina pela Arginase.....	21
Figura 5. Proposta de mecanismo para a conversão da L-arginina em L-ornitina pela arginase auxiliada pelos aminoácidos do bolsão catalítico.	21
Figura 6. Metabolismo da L-arginina nos macrófagos do hospedeiro e efeito da inibição da arginase.	23
Figura 7. Etapas da descoberta e desenvolvimento de fármacos	25
Figura 8. Representação da busca da pose de menor energia realizada pelo programa Gold pelo algoritmo genético.....	26
Figura 9. Planejamento estrutural dos nove análogos da eflornitina (I-IX).	30
Figura 10. Planejamento dos derivados de cinamidas (X-XVIII).....	32
Figura 11. Planejamento dos análogos XX-XXVIII.	33
Figura 12. Potenciais inibidores identificados previamente por nosso grupo de pesquisa em uma triagem virtual frente a LaARG.....	37
Figura 13. Planejamento dos 100 possíveis novos inibidores de LaARG a partir das quatro substâncias selecionadas em trabalhos anteriores.....	38
Figura 14. Indois e tiazolidinonas com atividade frente à cepas de <i>Leishmania</i> spp.	40
Figura 15. Híbridos planejados (10-17)	41
Figura 16. Atividade frente a <i>L. amazonensis</i> do composto V.....	42
Figura 17. Bioisóstero planejados (19-63).....	42
Figura 18. Atividade do composto Py333 frente à <i>L. donavani</i>	43
Figura 19. Planejamento dos derivados (18) a partir da simplificação e hibridação molecular.....	43
Figura 20. Representação da metodologia de escala.	45
Figura 21. Substâncias selecionadas a partir da metodologia de escala.	47
Figura 22. Sobreposição dos melhores RMSDs das substâncias.	49
Figura 23. Interações entre 61 (R) e a LaARG.....	52
Figura 24. Interações entre a 57 (R) e a LaARG.....	53

Figura 25. Interações entre 55 (R) e a LaARG.....	54
Figura 26. Interações entre 54 (R) e a LaARG.....	55
Figura 27. Interações entre 55 (S) e a LaARG.....	56
Figura 28. Sobreposição entre os enantiômeros 55 (S) e 55 (R)	56
Figura 29. Interações entre 61 (S) e a LaARG.....	57
Figura 30. Sobreposição dos enantiômeros 61 (S) e 61 (R)	58
Figura 31. Comparação entre as substâncias protótipo (LMed47 R e S) e das duas melhores novas substâncias triadas 61 (R) e 57 (R)	58
Figura 32. Encaixe das substâncias 61 (R) e 57 (R) no sítio ativo.....	60
Figura 33. Gráfico de biodisponibilidade das 6 melhores substâncias.....	61
Figura 34. Análise por fragmentos da toxicidade aguda oral das substâncias selecionadas.....	68
Figura 35. Análise por fragmentos da toxicidade aguda dérmica das substâncias selecionadas.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das substâncias após a realização da escala.	46
Tabela 2. Validação das substâncias selecionadas por RMSD.	48
Tabela 3. Função escolhida para análise das interações.	50
Tabela 4. Classificação das substâncias de acordo com as interações.	52
Tabela 5. Propriedades físico-químicas das 6 melhores substâncias.....	62
Tabela 6. Parâmetros de fármaco-similaridade dos compostos selecionados.....	63
Tabela 7. Propriedades farmacocinéticas previstas para as substâncias selecionadas.	64
Tabela 8. Fármacos substratos ou não das isoformas CYP2C9 e CYP2C19.....	65
Tabela 9. Alerta de toxicidade através dos fragmentos das estruturas das substâncias selecionadas.	66
Tabela 10. Potenciais de toxicidade aguda dos compostos selecionados nos 6 compartimentos analisados.....	67
Tabela 11. Acessibilidade sintética das substâncias selecionadas.....	70

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo para classificação das substâncias pela metodologia de escala.	72
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Interações realizadas por cada substância com o alvo molecular.....51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	LEISHMANIOSES	16
1.2	ARGINASE: CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E CATALÍTICAS	19
1.3	TÉCNICAS IN SILICO APLICADAS PARA A DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS.....	24
1.3.1	Docagem molecular	25
1.3.2	Gold: O programa de docagem molecular utilizado	26
1.3.3	Predição <i>in silico</i> de parâmetros relacionados a Absorção, Distribuição, Metabolismo, Eliminação e Toxicidade (ADMET)	28
1.4	INIBIDORES DE ARGINASE DE <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i>	30
2	OBJETIVOS	36
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1	PLANEJAMENTO, DESENHO E OTIMIZAÇÃO DE NOVOS ANÁLOGOS COM POTENCIAL DE INIBIÇÃO FRENTE A ENZIMA LAARG	37
3.2	TRIAGEM VIRTUAL	44
3.2.1	Classificação e validação do protocolo de docagem molecular	44
3.2.2	Análise das interações intermoleculares dos novos compostos	50
3.3	ANÁLISE DA ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO, ELIMINAÇÃO E TOXICIDADE DAS SUBSTÂNCIAS SELECIONADAS	60
4	METODOLOGIA	71
4.1	PREPARAÇÃO DA ESTRUTURA DO ALVO MOLECULAR (LAARG)	71
4.2	PREPARAÇÃO DOS LIGANTES	71
4.3	DOCAGEM MOLECULAR DAS SUBSTÂNCIAS PROPOSTAS.....	71
4.3.1	Metodologia de classificação e validação do protocolo de docagem molecular.....	72
4.3.2	Análise dos resultados das docagens moleculares	72
4.4	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS PROPRIEDADES DE ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO E TOXICIDADE (ADMET).....	72
5	CONCLUSÃO	74
6	Referências	75

Lista de Abreviaturas

B-ARG – Arginase bovina

CADD – *Computer-Aided Drug Design*, Métodos computacionais de desenho de fármacos

CI₅₀ – Concentração necessária de uma substância para inibir 50% o processo ou componente biológico

CYP – Enzimas do citocromo P

ENOs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

Gold - *Genetic Optimization for Ligand Docking*, programa de docagem molecular

HsARG – Arginase humana

LaARG – Arginase de *Leishmania amazonensis*

LaSMMed – Laboratório de síntese de moléculas medicinais

LBDD – *Ligand Base Drug Design*, Desenho de fármacos baseados em ligantes

LC – Leishmaniose cutânea

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LmARG – Arginase de *Leishmania mexicana*

LV – Leishmaniose visceral

MM - massa molecular

PDB – *Protein data bank*, banco de proteínas

RMSD – *Root Mean Square Deviation*, desvio quadrático médio

SBDD – *Structure Based Drug Design*, Desenho de fármacos baseados na estrutura

TPSA - *Topological polar surface area*, área de superfície polar topológica

VS – *Virtual Screening*, triagem virtual

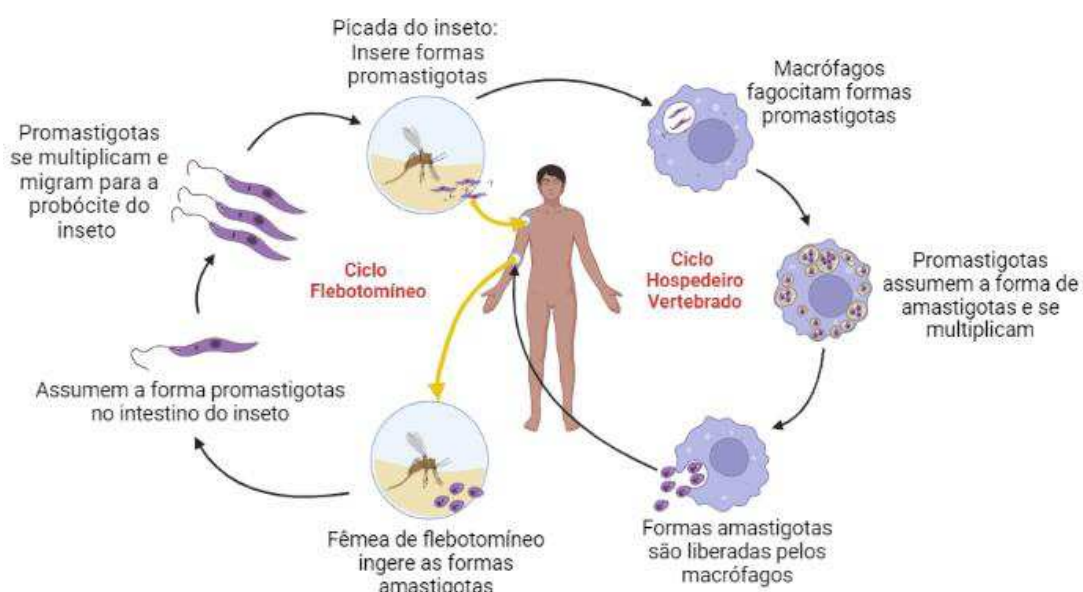
1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias que podem ser causadas por mais de vinte diferentes espécies do protozoário do gênero *Leishmania*. São consideradas doenças tropicais negligenciadas, pois afetam populações vulneráveis, de países considerados mais pobres e com dificuldades no acesso aos serviços de saúde (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019).

Os parasitos são transmitidos por fêmeas de insetos infectados, denominados flebotomíneos, pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo ou ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo. O ciclo de vida do parasito é considerado digenético, ou seja, envolve dois hospedeiros diferentes, sendo um deles os insetos, e outros, os mamíferos como cães, raposas, marsupiais e seres humanos. Nos hospedeiros humanos, os parasitos vivem e se multiplicam nas células fagocitárias. O inseto insere formas promastigotas de *Leishmania* no sangue de um hospedeiro sadio, e quando as células fagocitárias tentam eliminá-las, elas se diferenciam em formas amastigotas, que se multiplicam dentro da própria célula. Quando um inseto pica o hospedeiro infectado, ele ingere as amastigotas, que no interior do seu intestino, se transformam em formas promastigotas, migram para a probóscide do inseto e são eliminadas quando o flebotomíneo pica um novo hospedeiro (Figura 1) (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2023).

Figura 1. Ciclo de vida do parasito *Leishmania spp.*



Fonte: Própria autora, criado pelo Biorender.

As manifestações clínicas da leishmaniose são determinadas pela espécie do parasita envolvido e da localização em que se encontram os fagócitos infectados por eles. Dessa forma, a doença pode apresentar três manifestações clínicas: a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucocutânea (LMC) e a leishmaniose visceral (LV) (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2023).

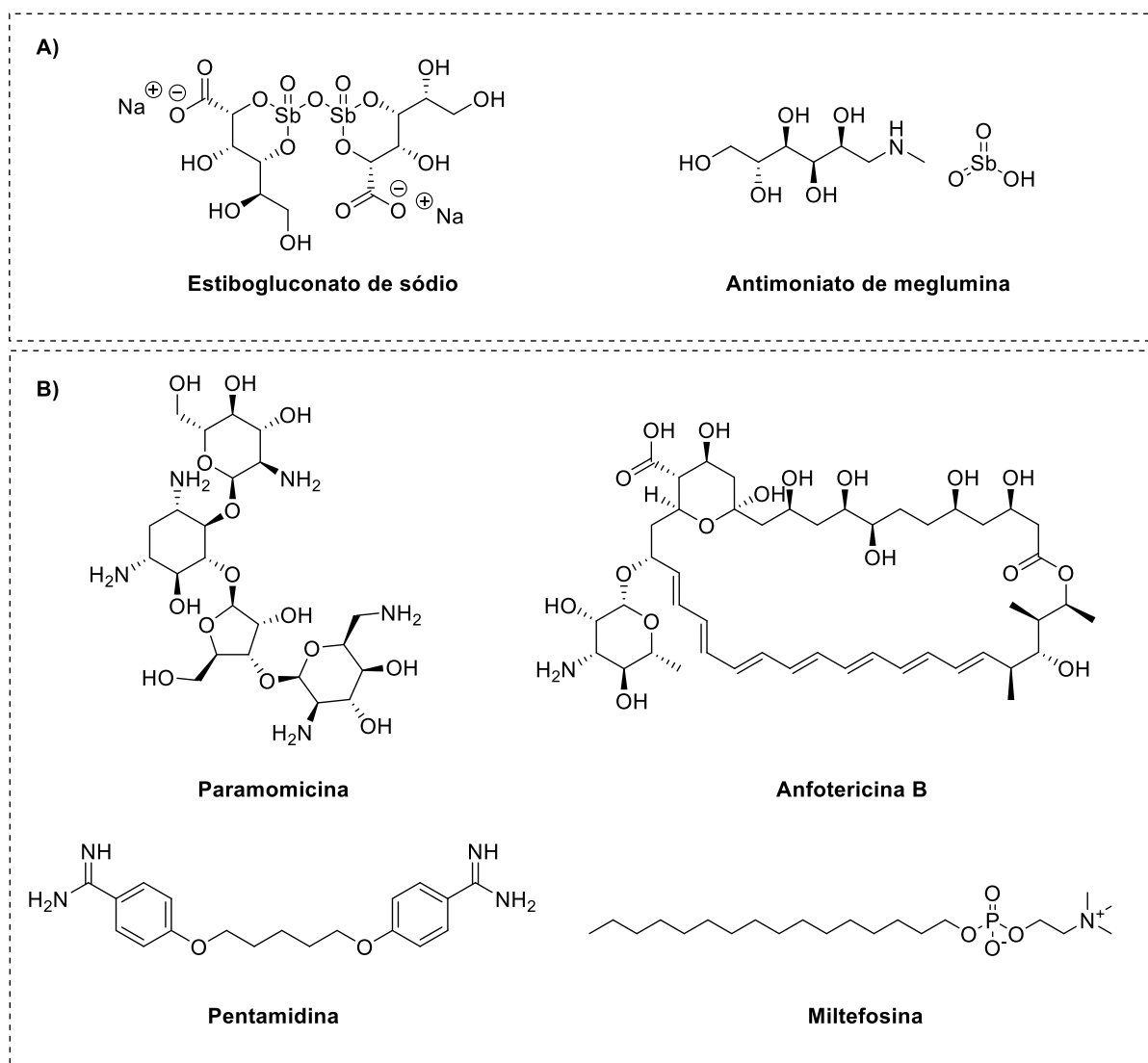
No caso da LC, os fagócitos se encontram próximos à pele e às mucosas, estando envolvidas principalmente as espécies *L. aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. tropica* (PACE, 2014), que provocam lesões na pele que podem resultar em úlceras, normalmente indolores, circulares e rasas. Essas condições podem persistir por longos períodos, e ocasionalmente levar a desfiguração (MANDEL; BENNETT; DOLIN, 2010).

Na LMC, os parasitos têm a capacidade de se deslocar para o sistema linfático ou hematológico, afetando principalmente as mucosas do nariz, boca e garganta. Isso resulta em lesões e, em casos graves, pode levar à destruição completa dessas mucosas (MANDEL; BENNETT; DOLIN, 2010); WHO, 2023). Essa forma é causada principalmente pelas espécies de *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis* e *L. peruviana* (PACE, 2014).

A LV, também conhecida como calazar, é causada por *L. donovani*, *L. infantum* e *L. infantum chagasi* (PACE, 2014), sendo a forma mais grave da doença, causando febre, perda de peso, anemia e hepatoesplenomegalia (WHO, 2023). Caso não seja adequadamente tratada, pode levar à morte em 95% dos casos (MANDEL; BENNETT; DOLIN, 2010).

Estima-se que existem entre 600 mil e 1 milhão de novos casos de LC e cerca de 50.000 a 90.000 novos casos de LV, em todo o mundo anualmente, sendo responsáveis por 20.000 a 30.000 mortes por ano (WHO, 2023). Cerca de 45,69% dos países do mundo são consideradas áreas endêmicas para leishmaniose cutânea e 40,61% para leishmaniose visceral, afetando principalmente países em desenvolvimento. Entre os anos de 2001 e 2021, foram registrados 1.105.545 casos de LC e LMC nas Américas, juntamente com 69.665 casos de LV somente no ano de 2021 (WHO, 2023). Nesse mesmo ano, foram reportados 37.786 novos casos de LC e LMC, além de aproximadamente 2.000 casos de VL, sendo que 93,5% desses foram notificados pelo Brasil (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2022). A pandemia de COVID-19 teve um impacto significativo nas notificações de casos, resultando em uma redução de cerca de 21% nos novos casos relatados à OMS entre 2019 e 2021. No entanto, mesmo diante dessa redução, os números de casos de leishmaniose continuam sendo alarmantes. Além disso, a pandemia tem prejudicado a detecção e o tratamento precoce de doenças, o que representa um desafio adicional para o controle da leishmaniose (ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ, 2023).

Além da taxa de mortalidade elevada, um dos grandes problemas enfrentados no combate à leishmaniose é a escassez de medicamentos, sobretudo daqueles administrados por via oral, além de suas elevadas toxicidades que levam a efeitos adversos graves, tais como pancreatite, distúrbios cardiológicos, anemia e nefrotoxicidade (VAN VOORHIS, 1990). Os fármacos de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes: antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio (Figura 2a), a classe mais barata de tratamento. Entretanto, existem algumas outras opções de segunda escolha, tais como a anfotericina B, a pentamidina e a paromicina, todos estes de aplicação endovenosa e, apenas um fármaco de administração oral, a miltefosina (Figura 2b). Como a maioria dos medicamentos é de uso parenteral e requer um rigoroso acompanhamento médico, juntamente à elevada toxicidade dos medicamentos, é comum o abandono do tratamento pelo paciente, levando ao processo de resistência parasitária (SINGH; SIVAKUMAR, 2004).

Figura 2. Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses

Fonte: Própria autora. A) *Tratamento de primeira escolha.* B) *Tratamento de segunda escolha.*

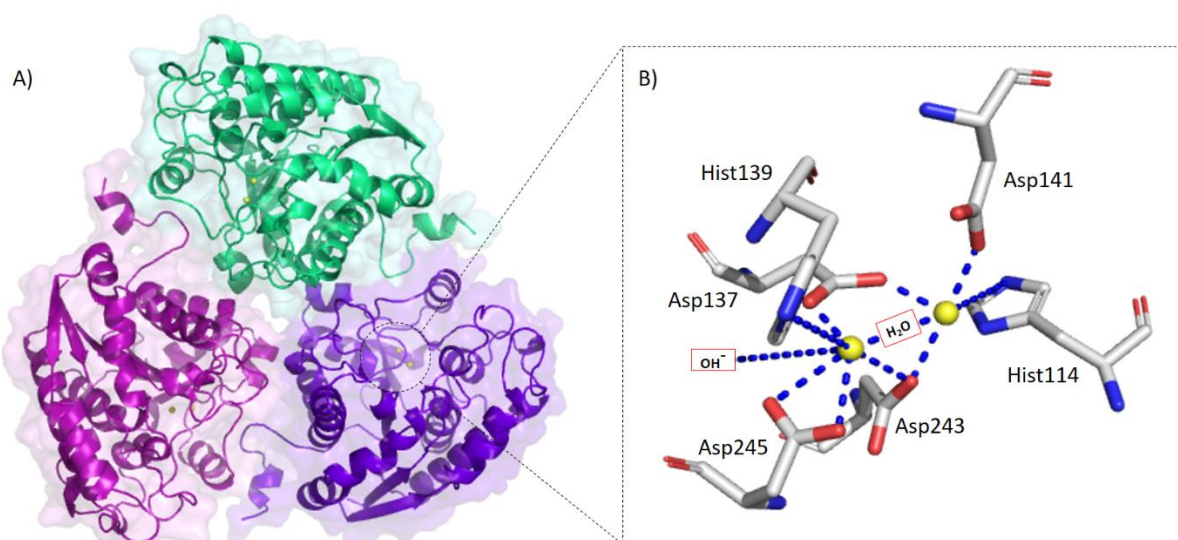
Devido aos grandes problemas encontrados no tratamento das leishmanioses e aos diversos obstáculos ocasionados pela falta de investimentos para o desenvolvimento de novos fármacos eficazes e seguros para combatê-las, faz-se necessária a descoberta de novas substâncias bioativas com potencial antileishmania.

1.2 ARGINASE: CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E CATALÍTICAS

Na busca por alvos moleculares importantes para o controle das leishmanioses, um dos alvos que se destaca é a enzima Arginase (ARG, E.C. 3.5.3.1), devido ao seu papel fundamental em rotas metabólicas dos seres vivos (Figura 3a).

Trata-se de uma metaloenzima dependente de manganês (Mn^{2+}), cuja estrutura é composta por três monômeros estabilizados entre si por pontes salinas e ligações de hidrogênio, ou seja, é uma enzima trimérica. Cada um destes monômeros carrega um sítio ativo, que é composto pelo par de íons Mn^{2+} , coordenados de forma octaédrica por dois resíduos de histidina (His114 e His139), quatro resíduos de aspartato (Asp137, Asp141, Asp243 e Asp245) e dois ligantes não proteicos, um íon hidróxido na forma cataliticamente ativa e uma molécula de água (Figura 3b) (D'ANTONIO et al., 2013).

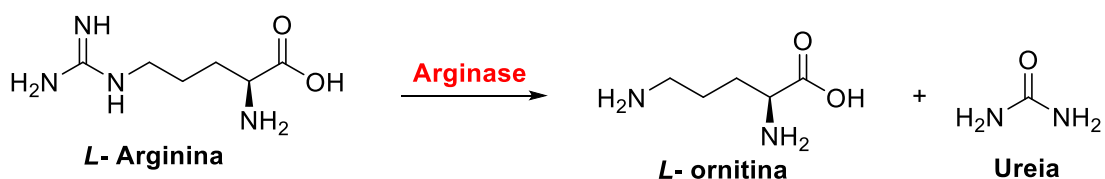
Figura 3. Representação cristalográfica da estrutura trimérica de ARG de *L. mexicana*.



Fonte: Própria autora. Protein Data Bank (PDB) ID: 4ITY (D'ANTONIO et al., 2013). Legenda: A) As três subunidades foram representadas por cores diferentes: subunidade A (em verde), subunidade B (em rosa) e subunidade C (em roxo). Por fim, os íons Mn^{2+} estão representados por esferas amarelas. B) Representação da coordenação octaédrica dos íons Mn^{2+} (linhas pontilhadas azuis), estando o íon hidróxido e a água representados em quadrados com bordas vermelhas.

ARG é a enzima inicial na via de biossíntese das poliaminas em *Leishmania spp*, desempenhando o papel de catalisar a hidrólise da L-arginina, resultando na produção de L-ornitina e ureia (D'ANTONIO et al., 2013) (Figura 4). As poliaminas são importantes precursores da tripanotona, um composto antioxidante, que tem como função a neutralização de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidos pelos macrófagos para impedir a proliferação do patógeno (FEITOSA et al., 2019).

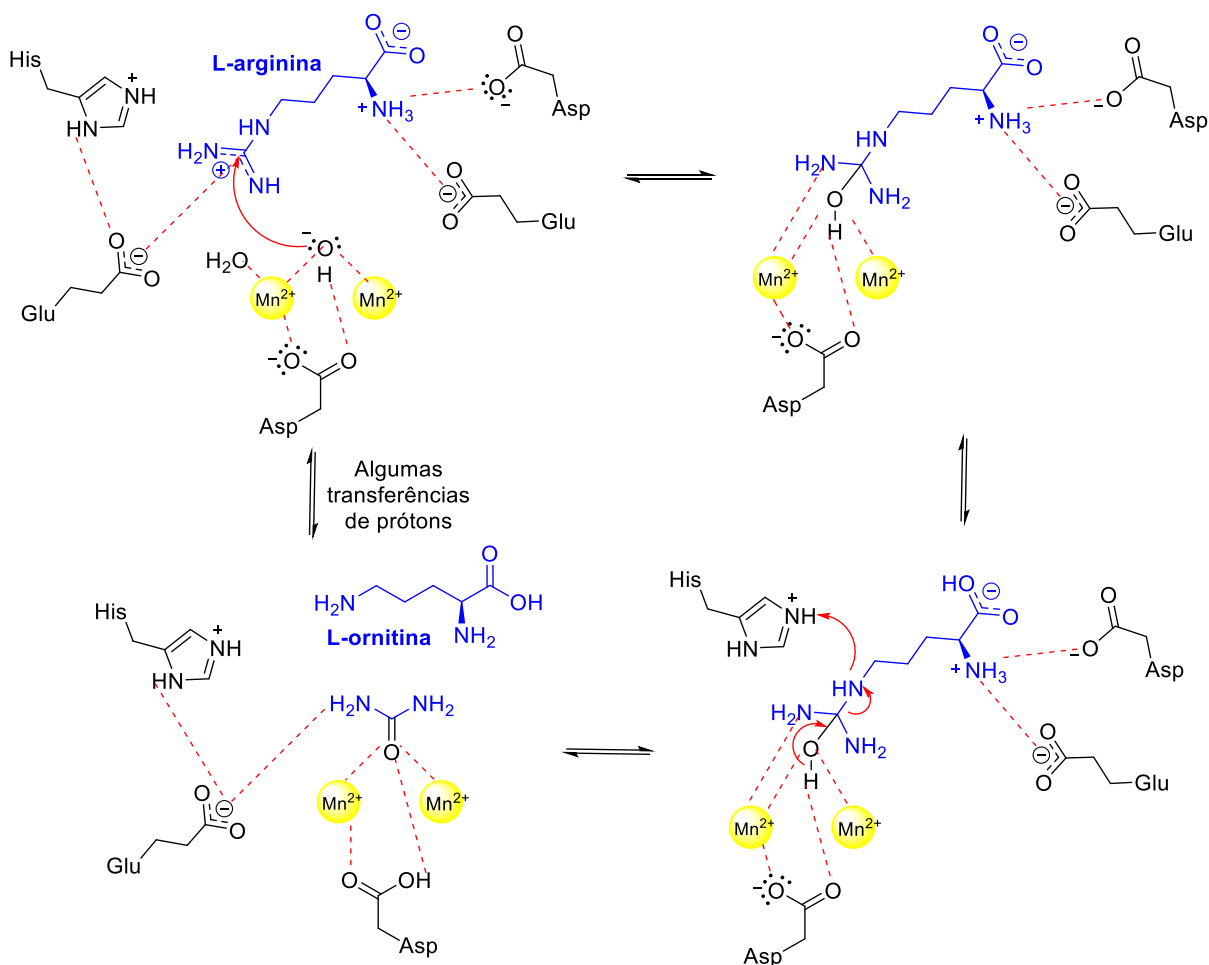
Figura 4. Conversão da L-arginina em L-ornitina pela Arginase.



Fonte: Própria autora.

O ciclo de formação da L-ornitina (Figura 5) se inicia a partir da ativação de uma molécula de água pelos íons Mn^{2+} , formando uma ponte metálica com o íon hidróxido. A cadeia lateral de um resíduo de glutamato pertencente ao sítio ativo da enzima, forma uma ponte salina com o carbono da porção guanidina da L-arginina, que favorece o alinhamento e direcionamento para o ataque nucleofílico, que ocorre a partir do íon hidróxido. A L-arginina é ainda estabilizada por interações a partir de sua cadeia principal e por resíduos de aspartato e glutamato presentes no sítio. Após o ataque nucleofílico, é formado um intermediário tetraédrico, estabilizado pelos íons Mn^{2+} , que finalmente colapsa, com auxílio de um resíduo de histidina, formando a ureia e a L-ornitina, substrato necessário para a formação das poliaminas. Todos os resíduos de aminoácidos presentes no bolsão catalítico participam diretamente do mecanismo de formação da L-ornitina, ou indiretamente, favorecendo o direcionamento e posicionamento da L-arginina (DI COSTANZO et al., 2005; CLEMENTE et al., 2020).

Figura 5. Proposta de mecanismo para a conversão da L-arginina em L-ornitina pela arginase auxiliada pelos aminoácidos do bolsão catalítico.



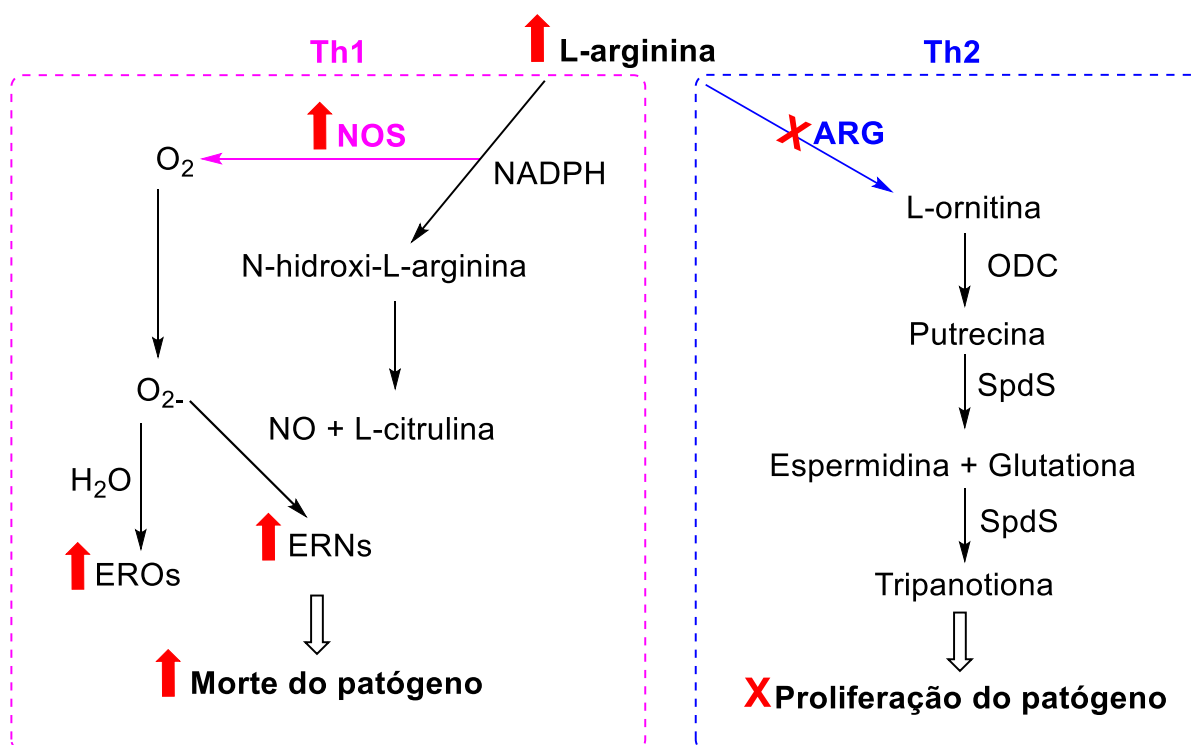
Fonte: Própria autora. Adaptado de: DI COSTANZO et al. 2005. Legenda: Em esferas amarelas os íons Mn^{2+} , em linhas tracejadas vermelhas as interações.

Esta enzima se faz presente tanto nos parasitos do gênero *Leishmania* quanto em mamíferos, como os seres humanos. Ambas possuem características estruturais similares, principalmente relacionadas ao sítio ativo que é altamente conservado, possuindo mecanismos catalíticos similares. Apesar de algumas semelhanças, estas enzimas também apresentam grandes diferenças. Em humanos foram encontradas duas isoformas de arginase (I e II). ARG I é predominantemente encontrada no fígado, enquanto a ARG II é encontrada em tecidos extra-hepáticos, como rins e intestino delgado. Por outro lado, a arginase de *Leishmania* spp. (LARG) é encontrada nos glicossomas, organelas exclusivas dos protozoários. Fora a localização, existem algumas diferenças na estrutura primária destas enzimas. De acordo com D'Antonio et al. (2013), o alinhamento proteico entre a arginase de *L. mexicana* (LmARG) e ARG I tem uma identidade de apenas 40%, ou seja, apenas

40% dos aminoácidos de ambos são correspondentes e na mesma posição, enquanto que há apenas 38,8% de similaridade nos estudos realizados por Camargo et al. 2021, esta porcentagem indica que alguns aminoácidos da sequência da LmARG podem ter a mesma função dos aminoácidos da ARG I, porém não são os mesmos (D'ANTONIO et al., 2013; CAMARGO et al., 2022).

A inibição da arginase é relevante não apenas para impedir a formação das poliaminas, mas também porque esta enzima compete diretamente com a óxido nítrico sintase (NOS) pelo substrato L-arginina. Enquanto a ARG converte a L-arginina em ureia e L-ornitina, a NOS oxida a L-arginina em L-citrulina e promove a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que levam à morte do parasito. A regulação destas enzimas é influenciada pelas citocinas secretadas pelas células Th1 e Th2, que induzem a NOS e a ARG, respectivamente (Figura 6) (COLOTTI; ILARI, 2011).

Figura 6. Metabolismo da L-arginina nos macrófagos do hospedeiro e efeito da inibição da arginase.



Fonte: Própria autora. Legenda: Ornitina dextricarboxilase (ODC), Espermidina sintase (SpdS), setas e X em vermelho: efeito da inibição da arginase, no quadrado rosa: efeito da resposta mediada por células Th1, em azul: resposta mediada por células Th2.

Conseqüentemente, ao inibir a ARG, o substrato fica completamente disponível para a NOS, resultando em uma maior produção de EROs e ERNs, o que facilita a morte do parasita. Dessa forma, a ARG torna-se um alvo de grande interesse para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial terapêutico na luta contra a infecção parasitária.

1.3 TÉCNICAS *IN SILICO* APLICADAS PARA A DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

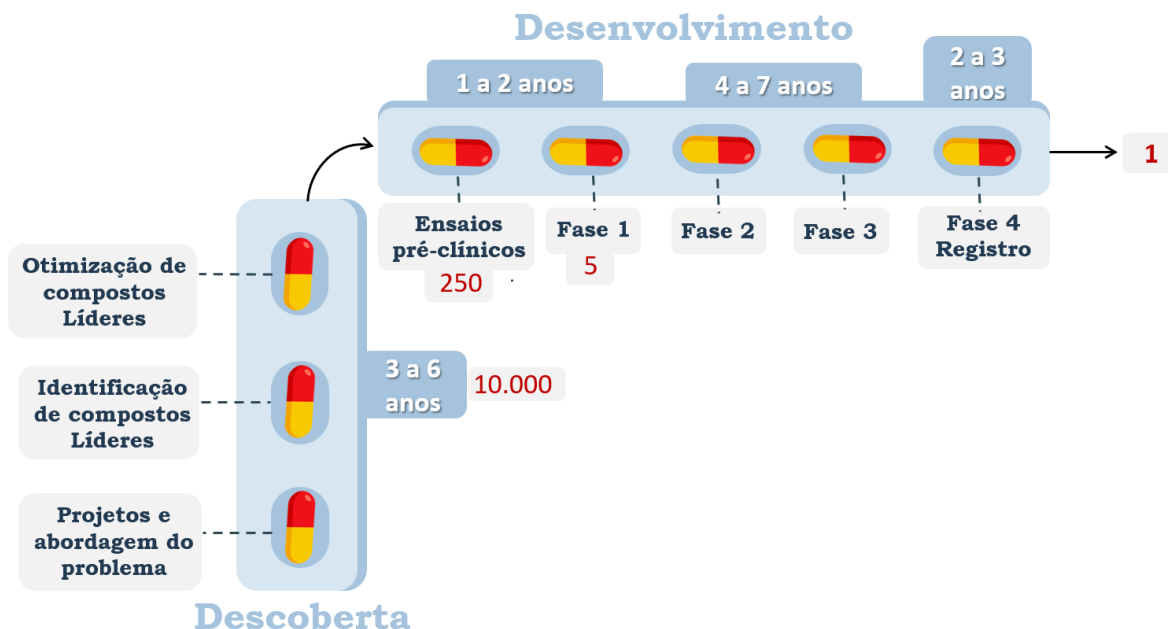
São muitas as etapas de descoberta e desenvolvimento até que um fármaco chegue ao mercado. Nas primeiras etapas da descoberta estão envolvidos a escolha do projeto e a abordagem do problema, onde os estudos sobre a doença e suas possíveis soluções devem ser extensamente abordados (DIAS *et al.*, 2013).

Em seguida, há a tentativa de resolução desta enfermidade através da procura por substâncias capazes de combater a doença. Para isso, normalmente, são necessários síntese e testagem *in vitro* destas substâncias. Assim, faz-se possível a identificação de compostos líderes, que novamente são testados e otimizados, a fim de gerar melhores resultados. Nestas etapas, estão envolvidos mais de 10 mil compostos e têm duração aproximada de 3 a 6 anos. Cerca de 250 destes compostos conseguem atingir as primeiras etapas do desenvolvimento, onde são realizados teste *in vivo* para verificar o perfil de toxicidade e confirmação da atividade destas substâncias (DIAS *et al.*, 2013).

A primeira etapa de estudos em humanos então é iniciada (Fase 1), com apenas 5 compostos dos 250, tendo uma duração de mais ou menos 1 a 2 anos. Nessa fase serão utilizados indivíduos que não possuem a doença, para que sejam avaliadas a segurança e a tolerância destes candidatos a fármacos. Em seguida, ocorrem os ensaios clínicos de Fase 2, em seres humanos com a doença, para identificar a dose e comprovar a eficácia. Em seguida, acontece a Fase 3, onde os candidatos a fármacos serão avaliados em populações grandes e diversas, com duração de 4 a 7 anos. Por fim, tem-se a fase de registro, com duração de 2 a 3 anos, que apenas 1 fármaco consegue atingir. Ademais, este novo fármaco será acompanhado durante todo seu tempo de mercado pela farmacovigilância, denominada Fase 4, a fim de identificar possíveis efeitos a longo prazo (Figura 7)

(DIAS *et al.*, 2013).

Figura 7. Etapas da descoberta e desenvolvimento de fármacos



Fonte: Própria autora.

1.3.1 Docagem molecular

Tendo em vista a complexidade do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, sobretudo no que diz respeito a sua longa duração, alto custo e baixas taxas de sucesso, uma excelente estratégia empregada para suplantar essas dificuldades é a descoberta de novos fármacos auxiliados por computadores (do inglês *computer-aided drug discovery* - CADD). Dentro da CADD, uma das abordagens que se destaca é o desenvolvimento de fármacos baseado na estrutura (do inglês *Structure-based drug design* – SBDD), no qual o interesse está voltado principalmente ao conhecimento da estrutura do alvo molecular e de seus possíveis ligantes (MACALINO *et al.*, 2015).

Dentro da SBDD, algumas vertentes podem ser utilizadas, tais como a construção de um modelo farmacofórico, onde pequenos fragmentos da estrutura do alvo são analisados e há a produção de um inibidor que apresenta complementaridade com estes fragmentos, e a triagem virtual (*virtual screening* - VS), que permite realizar uma triagem em uma biblioteca de compostos (quimioteca) por meio de métodos e modelos computacionais, onde se encaixa a metodologia do docagem molecular, cuja

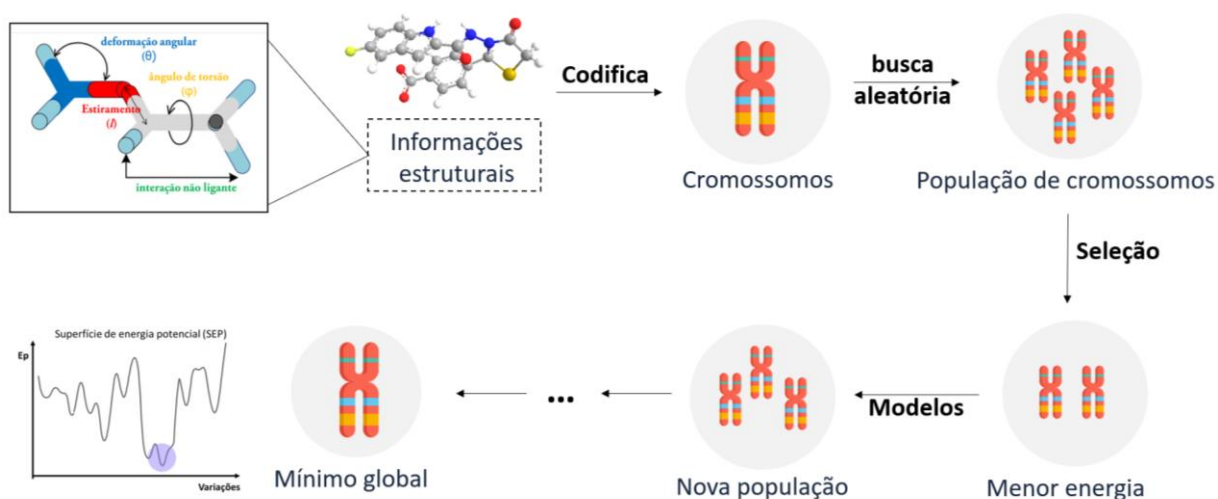
principal função é a de prever e compreender o reconhecimento molecular (MACALINO *et al.*, 2015).

A VS por docagem molecular pode ser realizada por diversos programas. Estes programas se baseiam em duas etapas principais para a análise dos complexos ligante-alvo molecular: a previsão da conformação do ligante, bem como sua posição e orientação dentro dos locais de interação, referida como "pose", e a afinidade de ligação entre o ligante-alvo molecular, definida pela "pontuação" (MENG *et al.*, 2011).

1.3.2 Gold: O programa de docagem molecular utilizado

Cada programa de *docagem* utiliza um algoritmo específico para a etapa de busca, e um exemplo notável é o algoritmo genético, empregado, por exemplo, pelo programa *Genetic Optimization for Ligand Docking* (GOLD). Este método estocástico, inspirado na teoria da evolução de Darwin, codifica os graus de liberdade do ligante em cadeias binárias chamadas de genes, que, por sua vez, são organizados em cromossomos, ou seja, um aglomerado de informações estruturais. Semelhante ao que ocorre na biologia, o processo de mutação induz mudanças de pose aleatórias, enquanto o *crossover* transfere informações estruturais entre diferentes poses, resultando na geração de uma população de cromossomos, que representam novas conformações do ligante. A seleção dos cromossomos de menor energia dentro dessa população serve como base para gerar novas populações sucessivas, culminando na busca por uma pose do ligante com a menor energia global (Figura 8) (MENG *et al.*, 2011).

Figura 8. Representação da busca da pose de menor energia realizada pelo programa Gold pelo algoritmo genético.



Fonte: Própria autora.

Existem diferentes funções de pontuação que estimam a afinidade entre ligante-alvo com o objetivo de diferenciar as poses corretas das incorretas, ou de ligantes de compostos inativos. São divididas em quatro tipos principais, as baseadas em campo de força, empíricas, baseadas em conhecimento e as híbridas. As funções de pontuação baseadas em campo de força utilizam princípios físico-químicos, como interações de van der Waals, eletrostáticas e termos de solvatação, para calcular a energia de interação entre o ligante e o receptor. Um exemplo é a função Goldscore do programa GOLD (MENG et al., 2011).

Por outro lado, as funções de pontuação empíricas são derivadas de dados experimentais e ajustadas para descrever a afinidade de ligação observada em conjuntos de complexos ligante-receptor conhecidos como, por exemplo, a função Chemscore do GOLD. As funções baseadas em conhecimento têm semelhança com a anterior, pois utilizam dados experimentais sobre a interação alvo-ligante, porém utilizam do apoio da estatística para categorizar e selecionar os dados que aparecem com maior frequência. Um exemplo é a função *Astex Statistical Potential* (ASP) do GOLD. Por fim, algumas funções como *Piecewise Linear Potential* (ChemPLP) do GOLD, utilizam um ou mais algoritmos, portanto são consideradas funções do tipo híbridas. Estas funções, ao final são medidas gerando um resultado de pontuação chamado de “fitness score” (MENG et al., 2011).

Essas abordagens plurais permitem explorar extensivamente o espaço conformacional, tornando possível a identificação de candidatos promissores para inibidores de proteínas-alvo. Entretanto, também demonstram a necessidade de se

conhecer profundamente as características estruturais tanto do ligante, quanto do alvo molecular.

1.3.3 Predição *in silico* de parâmetros relacionados a Absorção, Distribuição, Metabolismo, Eliminação e Toxicidade (ADMET)

Além da interação com o alvo molecular de interesse, é essencial que uma molécula tenha acesso facilitado a este alvo e em concentrações adequadas para exercer sua atividade terapêutica.

A aplicação de métodos *in silico*, baseados em estudos de referência como as Regras de Lipinski, que estabeleceu critérios para compostos oralmente ativos, é uma ferramenta valiosa nesse processo (LIPINSKI et al., 2001). Plataformas como o SwissADME podem ser excelentes instrumentos de previsão não só de parâmetros físico-químicos das moléculas, como também de propriedades farmacocinéticas. Utilizando um conjunto de dados é possível prever através desta plataforma se um determinado composto tem similaridade com os fármacos já comercializados, ou seja, suas propriedades de fármaco-similaridade (do inglês "drug-likeness") em termos de permeabilidade pelas membranas e, conseqüentemente, absorção por via oral. Assim, a probabilidade deste composto se destacar nas outras fases do desenvolvimento é muito maior (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

A biodisponibilidade é o principal parâmetro avaliado, pois determina quanto daquela substância está disponível para atingir o alvo terapêutico. Assim, uma estratégia interessante é o emprego de filtros para identificar compostos com alta probabilidade de serem bem absorvidos e, portanto, candidatos a fármacos orais. Dois dos principais filtros utilizados são conhecidos como a "Regra dos Cinco de Lipinski" e as extensões de Verber. Lipinski et al. (2001) estabeleceram cinco critérios para fármaco-similaridade: o log P deve ser inferior a 5, menos de 10 átomos aceptores de ligação de hidrogênio, menos de 5 átomos doadores de ligações de hidrogênio, a massa molecular inferior a 500 Daltons. Todos estes critérios balanceados fornecem à substância maior possibilidade de atravessar as membranas celulares, principalmente as das microvilosidades intestinais, onde a maioria dos fármacos é absorvido em maior extensão (LIPINSKI et al., 2001).

Ao analisar a biodisponibilidade de mais de 1100 compostos, inclusive em

metodologias *in vitro*, Veber et al. (2002) perceberam que a biodisponibilidade é principalmente afetada pela capacidade da substância em atravessar as membranas celulares e de se ligar a proteínas do metabolismo como, por exemplo, as do citocromo P (CYP), e até mesmo proteínas plasmáticas responsáveis pelo transporte para a depuração (VEBER et al., 2002).

Pela análise, foram estabelecidos padrões moleculares que complementavam as regras propostas por Lipinski, sendo criado um limite mais rigoroso para a polaridade dos compostos, sendo que a área de superfície polar topológica (em inglês: *topological polar surface area* - TPSA) deve ser menor que 140 Å², já que substâncias muito polares tendem a ser mais solúveis em água, devido às interações intermoleculares e, com isso, podem ter dificuldade em atravessar membranas celulares lipídicas (VEBER et al., 2002)..

Além disso, foi estabelecido um controle maior sobre o limite de ligações rotacionáveis, já que compostos excessivamente rígidos podem ter dificuldade em se adaptar às mudanças conformacionais necessárias para interagir com seus alvos no organismo e aqueles muito flexíveis podem apresentar diferentes conformações, ou seja, podem não conseguir manter a orientação correta para desempenhar sua função terapêutica. Somado a isso, o número de ligações rotacionáveis tem um efeito negativo na permeação pelas membranas celulares, pois a presença de ligações rotacionáveis aumenta a entropia conformacional da molécula, tornando-a mais flexível e menos propensa a adotar a conformação necessária para a absorção e, portanto, as ligações flexíveis não devem ser superiores a 10 (VEBER et al., 2002).

É possível prever a farmacocinética dos ligantes em diversas plataformas, todas novamente relacionadas às propriedades físico-químicas, como a capacidade da molécula em ser permeável à pele, medida em coeficiente de permeabilidade pela pele (Kp), que está correlacionado com tamanho molecular e lipofilicidade, assim como a absorção gastrointestinal humana passiva (em inglês: *passive human gastrointestinal absorption* - HIA) e permeação da barreira hematoencefálica (*blood-brain barrier* - BBB). Também é possível determinar a propensão de uma determinada molécula ser substrato ou inibidor de proteínas que governam comportamentos farmacocinéticos como, por exemplo, a glicoproteína de permeabilidade-P (P-gp), que tem função no efluxo dos fármacos da parede das membranas intestinais para o lúmen, ou no transporte de substâncias para o sistema nervoso central (SNC). Por fim, ainda há as enzimas do citocromo P450 (CYP), que fazem a biotransformação

metabólica, ou seja, realizam reações de oxi-redução nos compostos, tornando-os mais solúveis, conseqüentemente mais propensos a sofrer a eliminação junto a urina (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Já a toxicidade pode ser avaliada de diferentes formas por cada programa, porém a maioria deles considera os fragmentos moleculares para apresentar alertas ou não de toxicidade de acordo com os fragmentos já relatados anteriormente na literatura (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

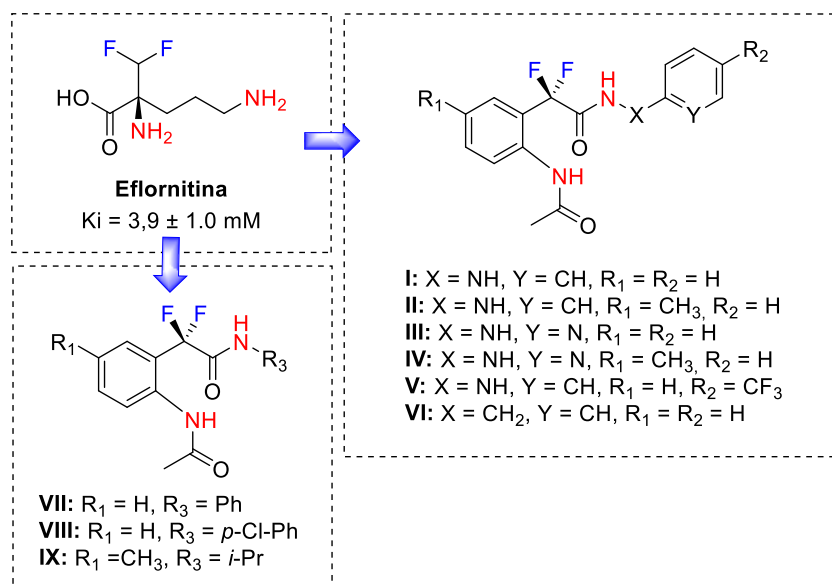
A estimativa precoce das propriedades de absorção, distribuição, eliminação e toxicidade (ADMET) na fase de descoberta de fármacos é crucial, uma vez que reduz drasticamente a fração de falha relacionada à farmacocinética nas outras fases do desenvolvimento.

1.4 INIBIDORES DE ARGINASE DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

Entre os anos de 2019 e 2023, diversos autores têm estudado possíveis inibidores da arginase de *Leishmania amazonensis* (LaARG). Alguns desses estudos incorporam análises computacionais, que somadas aos experimentos in vitro, fortalecem a evidência da eficácia dessa enzima como um alvo promissor na busca por novos fármacos anti-Leishmania.

Em estudos conduzidos por Crizanto de Lima et al. (2019) alguns compostos α,α -difluorohidrazidas e α,α -difluoramidas foram avaliados frente a LaARG. Tais substâncias foram propostas a partir da identificação da eflornitina, utilizada no tratamento da tripanossomíase africana (doença do sono), que apresentou capacidade de inibir a enzima ornitina dextracarboxilase (ODC), também presente na via de biossíntese das polaminas. Sendo assim, a estrutura da eflornitina serviu como modelo para o planejamento de nove novos análogos (I-IX) (Figura 9) (CRIZANTO DE LIMA et al., 2019).

Figura 9. Planejamento estrutural dos nove análogos da eflornitina (I-IX).



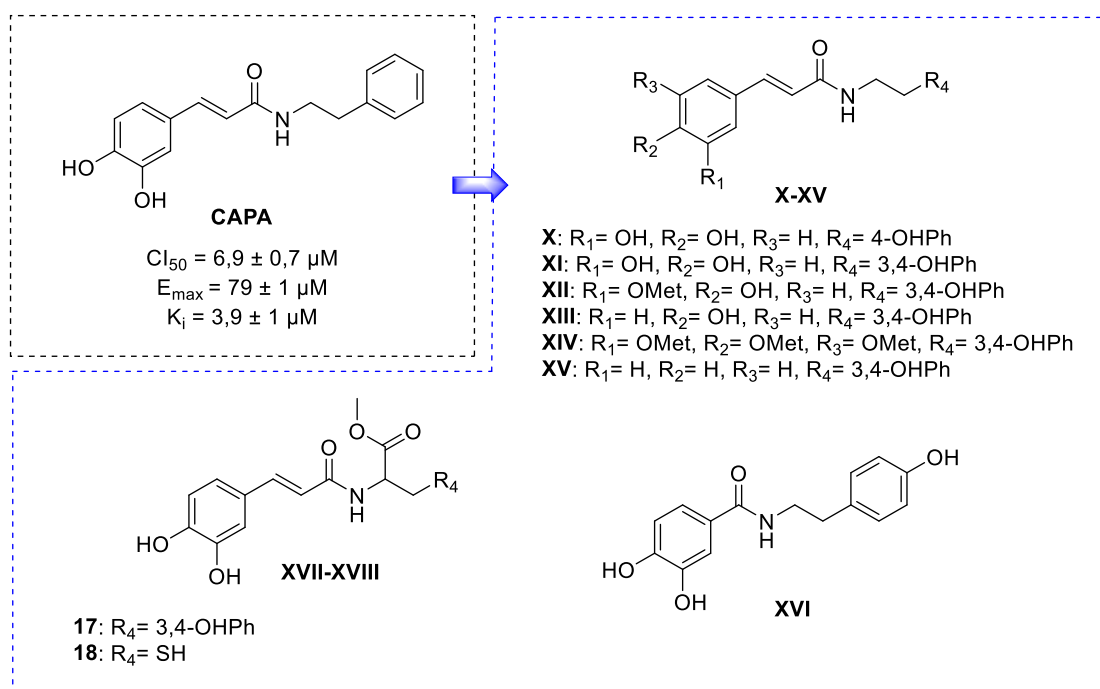
Fonte: Própria autora. *Legenda: Em azul: flúor mantido, em vermelho: grupos nitrogenados utilizados de modelo.*

Entre os compostos, **I**, **II**, **V** e **VI** apresentaram atividade inibitória frente a LaARG com valores superiores a 70%, enquanto os compostos **I** e **II** apresentaram uma concentração inibitória para reduzir pela metade a atividade enzimática (CI_{50}) de $12 \pm 2 \mu\text{M}$ e $CI_{50} = 12 \pm 3 \mu\text{M}$, respectivamente, sendo mais potentes do que os compostos **V** ($CI_{50} = 38 \pm 2 \mu\text{M}$) e **VI** ($CI_{50} = 37 \pm 6 \mu\text{M}$). Estudos cinéticos evidenciaram que apenas **I** inibiu competitivamente a arginase, já os demais mostraram um mecanismo de inibição mista. No teste fenotípico de inibição do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* apenas o composto **I** apresentou uma dose menor que $100 \mu\text{M}$ capaz de matar 50% do parasita ($CE_{50} = 12,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$).

Para a compreensão do modo de interação do análogo mais promissor (**I**) com o alvo molecular, foi realizado o estudo de docagem molecular com a arginase de *L. mexicana* (LmARG), pois é a única estrutura disponível no PDB com inibidor co-cristalizado. O composto **I** interagiu significativamente com o resíduo de His139 do bolsão catalítico através da porção fenilhidrazina de **I** por um empilhamento $\pi\text{-}\pi$, além de interações por ligação de hidrogênio entre o resíduo de Asp194 e os dois átomos de nitrogênio também presentes na porção fenilhidrazina e o nitrogênio do grupo acetamida. Com o mesmo resíduo de Asp194, houve uma interação de halogênio com os átomos de flúor. Além disso, outro estudo foi conduzido para avaliar as interações do composto **I** na ARG I humana (HsARG), no qual foram observadas interações semelhantes, porém com uma desfavorável com os íons Mn^{2+} , o que poderia indicar que **I** não interage tão bem com a enzima humana.

Estudos de Da Silva et al. (2020) tiveram como foco a investigação de nove derivados de cinamidas (**X-XVIII**) (Figura 10) como inibidores de LaARG. Essa seleção foi realizada com base em trabalhos anteriores, onde dezenove compostos foram projetados, sintetizados e avaliados frente à arginase bovina (B-ARG). Dentre esses, onze apresentaram inibição maior do que 50% a 100 μM e ainda o ácido cafeico fenetilamida (CAPA) se destacou, pois além de obter bons resultados de inibição da B-ARG não inibiu a HsARG (Figura 10) (DA SILVA et al., 2020).

Figura 10. Planejamento dos derivados de cinamidas (**X-XVIII**)



Fonte: Própria autora. *Legenda: em vermelho: porção cinamida; em azul os derivados de X-XVIII e seus substituintes.*

Os valores de Cl_{50} obtidos para os compostos variaram de $1,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (análogo **XV**) a $17,8 \pm 3,2 \mu\text{M}$ (análogo **XVI**), destacando-se os compostos **XI** ($Cl_{50} = 1,8 \pm 0,1$), **XIII** ($Cl_{50} = 2,5 \pm 0,2$), **XIV** ($Cl_{50} = 2,34 \pm 0,9$) e **XV** ($Cl_{50} = 1,3 \pm 0,1$), que apresentaram os melhores valores de Cl_{50} . O estudo cinético identificou o **CAPA** e os análogos **XIII** e **XIV** como inibidores competitivos, o **XV** com mecanismo de inibição misto e o **11** como não competitivo. Ao analisar os valores da constante de inibição (K_i), os compostos **XIV** e **XV** apresentaram maior afinidade pela LaARG ($K_i = 1,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ e $K_i = 1,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$, respectivamente), porém os resultados estatísticos mostraram que não diferiram significativamente do K_i do **CAPA** ($K_i = 3,9 \pm 1 \mu\text{M}$). Ao

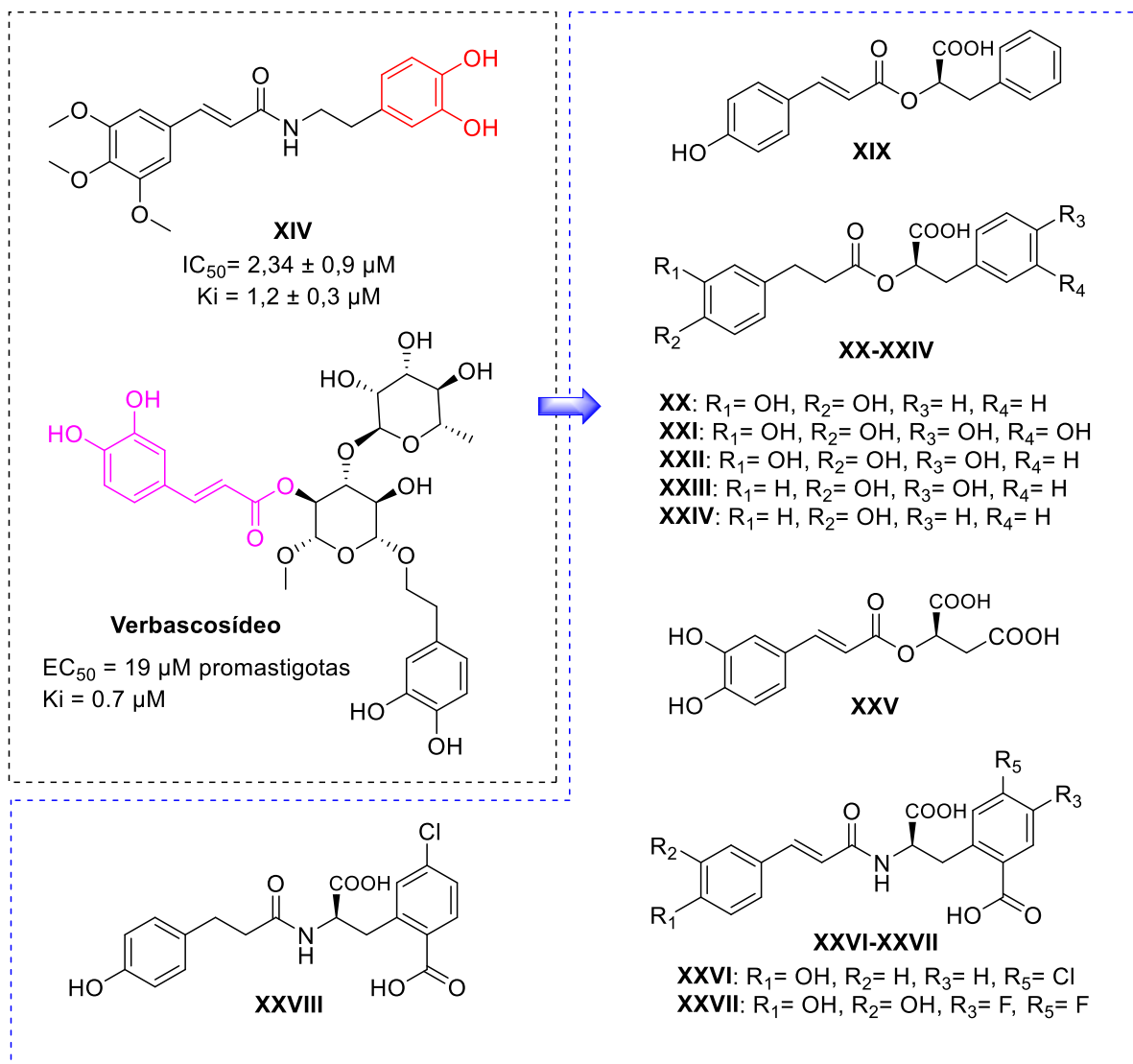
comparar os resultados obtidos em ensaios de inibição fenotípica de promastigotas de *L. amazonensis* e de *L. bovis* dos dois compostos (**XIV** e **XV**), **XIV** apresentou maior índice de seletividade (81) para a LaARG que o **XV** (30).

Sendo assim, as interações intermoleculares do composto mais seletivo **XIV** com o alvo molecular LaARG (PDB ID: 4IU1, (D'ANTONIO et al., 2013)) foram analisadas após realização de docagem molecular. Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre as hidroxilas do anel catecol de **XIV** e os resíduos de His141 e, também nesta subunidade, um empilhamento π - π com a His126. Além disso, a subunidade amida realizou uma interação por ligação de hidrogênio com a Lys136.

Para maior compreensão das razões que permitiam a maior afinidade à LaARG deste composto, foram realizadas simulações de dinâmica molecular, onde pôde-se perceber a maior estabilidade do complexo **XIV**/LaARG em relação ao **XIV**/B-ARG. Ademais, a análise de flutuação média quadrática (do inglês *Root Mean Square Fluctuation* - RMSF) indicou que o complexo **XIV**/B-ARG apresentou resíduos altamente flutuantes no sítio ativo, além do próprio ligante, demonstrando menor estabilidade, que pode estar diretamente relacionada à menor afinidade.

Com base nos resultados positivos obtidos por Da Silva et al. (2020) relacionados ao grupamento catecol, e considerando o efeito inibitório dos compostos diidroxicinâmicos como o verbascosídeo, encontrado na planta medicinal *Stachytarpheta cayennensis*, utilizada no tratamento de leishmaniose no Brasil (MAQUIAVELI et al., 2016), Come et al. (2022) realizaram o planejamento de dez novos análogos (**XX-XXVIII**), dos quais três (**XXVI**, **XXVII** e **XXVIII**) foram biossintetizados por *Escherichia coli* (Figura 11).

Figura 11. Planejamento dos análogos **XX-XXVIII**.



Fonte: Própria autora. *Legenda:* Em rosa: o grupamento dihidroxicinâmicos, em vermelho: o grupamento catecol e no quadrado azul os derivados propostos.

Cinco destes análogos apresentaram inibição da LaARG, com CI_{50} que variaram de $1,9 \mu M$ (composto **XXII**) até $36,2 \mu M$ (composto **XXV**). Os compostos que não continham o grupamento catecol foram inativos ou tiveram inibição fraca, enquanto, dentre aqueles que continham tal grupo, **XX** ($CI_{50} = 2,8 \pm 0,9 \mu M$), **XXI** ($CI_{50} = 3 \pm 0,2 \mu M$) e **XXII** ($CI_{50} = 1,9 \pm 0,7 \mu M$) foram identificados como os inibidores mais potentes. Estudos de cinética enzimática identificaram mecanismos de inibição não-competitiva para estes três derivados, entretanto o único composto cinamida que apresentou atividade ($CI_{50} = 5,5 \pm 0,5 \mu M$) com inibição competitiva foi o **XXVII** ($K_i = 4,6 \pm 1,7 \mu M$).

Em seguida, para fins de compreensão do mecanismo competitivo, foi

realizada a docagem molecular na LaARG com o composto **XXVII**. Assim, foi possível observar interações do grupamento catecol com os íons Mn^{2+} e interações por ligação de hidrogênio entre as hidroxilas deste grupo com resíduos de Thr257 e Glu288, demonstrando a importância desta subunidade para o reconhecimento molecular. Foram observadas ainda interações por ligação de hidrogênio entre o grupamento carboxilato do anel benzênico do ligante com resíduos de Thr148, Val149 e Ser150. Por fim, os anéis aromáticos permitiram um empilhamento π - π com His139 e His154. Para maiores informações foi realizada a dinâmica molecular do complexo **XXVII**/LaARG, que se mostrou estável desde o início dos cálculos até 300 ns, não apresentando flutuações significativas, e ainda validou-se as interações significativas do composto **XXVII** encontradas nos estudos de docagem, indicando que o composto pode atuar como um inibidor efetivo da LaARG.

2 OBJETIVOS

Selecionar potenciais inibidores de arginase de *Leishmania amazonensis* (LaARG) por meio de triagem virtual baseada em docagem molecular, bem como avaliar as suas propriedades físico-químicas e de absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (ADMET) e, por fim, sintetizá-los para validação de suas atividades de inibição enzimática e fenotípicas *in vitro*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

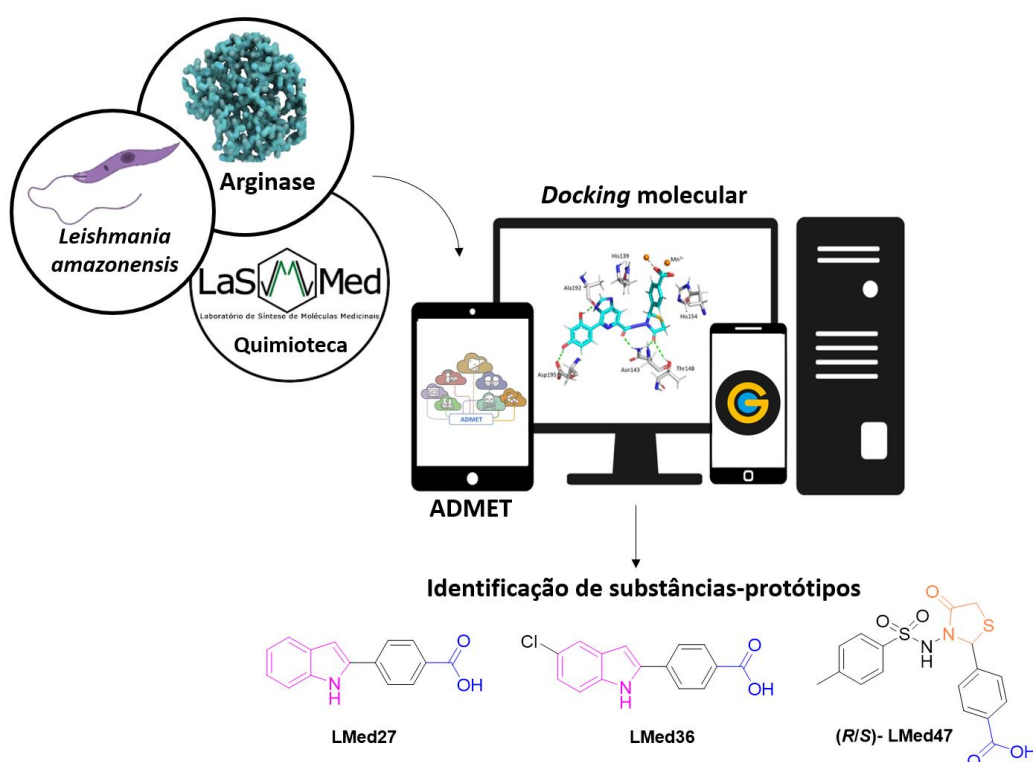
- ✓ Planejar novos potenciais inibidores de LaARG utilizando as estruturas das substâncias-protótipo selecionadas em triagem virtual realizada previamente;
- ✓ Realizar triagem virtual baseada em docagem molecular para identificar possíveis inibidores da LaARG:
 - Estabelecer e validar o protocolo de docagem molecular;
 - Analisar as interações proteína-ligante;
- ✓ Realizar a predição *in silico* das propriedades de fármaco-similaridade, relacionadas à absorção oral, biodisponibilidade, eliminação e toxicidade a fim de identificar os análogos mais promissores;
- ✓ Selecionar as melhores substâncias para síntese, avaliação *in vitro* e simulações de dinâmica molecular.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PLANEJAMENTO, DESENHO E OTIMIZAÇÃO DE NOVOS ANÁLOGOS COM POTENCIAL DE INIBIÇÃO FRENTE A ENZIMA LAARG

Tendo em vista a relevância da ARG para o planejamento de novos fármacos antileishmania, nosso grupo de pesquisa realizou uma triagem virtual baseada em docagem molecular frente a LaARG de 66 substâncias presentes na quimioteca do Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais (LaSMMed). Essa coleção de substâncias apresenta uma grande diversidade estrutural, pertencentes a diversas classes químicas, como: indóis, oxazolidinonas, cumarinas, tioureias, tiazolidinonas e derivados semissintéticos do carvacrol. A partir desse estudo, foram identificadas quatro estruturas promissoras, sendo duas delas derivados indólicos, **LMed-27** e **LMed-36** e os dois enantiômeros da tiazolidinona **LMed-47 (R/S)**, obtida como mistura racêmica (Figura 12).

Figura 12. Potenciais inibidores identificados previamente por nosso grupo de pesquisa em uma triagem virtual frente a LaARG.

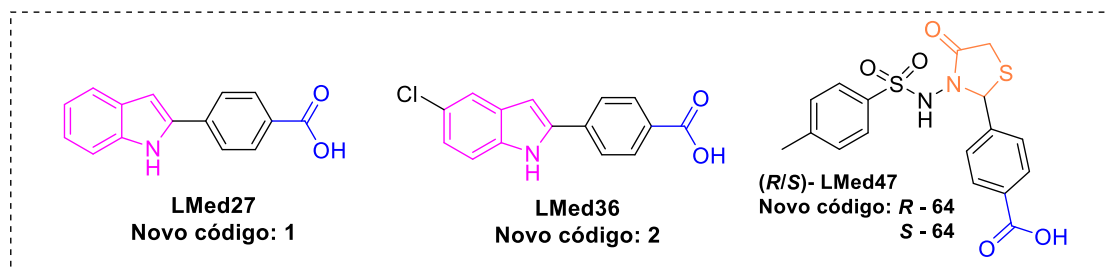


Fonte: Própria autora.

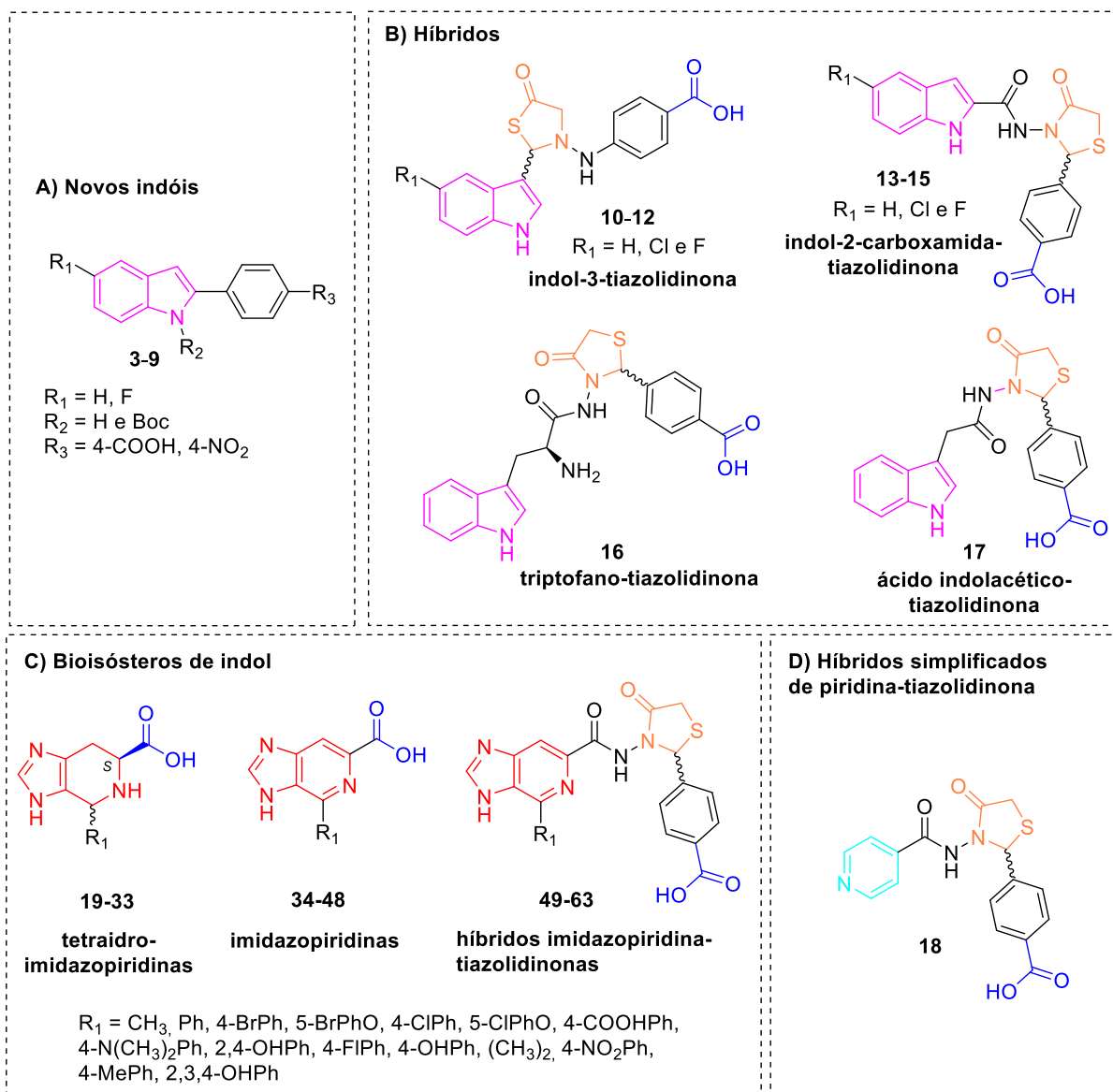
Além dos núcleos indólico (em rosa, Figura 13) e tiazolidinônico (em laranja, Figura 13), as substâncias selecionadas apresentam em comum um grupo carboxilato (em azul, Figura 13). Durante a análise das interações com o sítio ativo da LaARG, tal grupamento se mostrou importante para a estabilização do complexo, pois é capaz de coordenar com pelo menos um dos íons de Mn^{+2} , essenciais para o processo catalítico. Tendo em vista essas características estruturais relevantes identificadas, foram planejados 100 novos potenciais inibidores de LaARG, dentre os quais 66 são inéditos na literatura.

O planejamento estrutural dos potenciais inibidores foi baseado na manutenção dos possíveis grupos farmacofóricos previamente identificados (indol, tiazolidinona e carboxila), seguido da aplicação de estratégias de modificação molecular clássicas como hibridação molecular, bioisosterismo e simplificação molecular, para gerar as **100** novas estruturas, que pertencem a diferentes classes químicas, como: A) novos indóis substituídos nas posições 2, 4 do indol e 4 do anel benzóico (**3-9**); B) híbridos indol-tiazolidinona, pertencentes as classes: indol-3-tiazolidinona (**10-12**), indol-2-carboxamida-tiazolidinona (**13-15**), triptofano-tiazolidinona (**16**), ácido indolacético-tiazolidinona (**17**); C) bioisómeros de indol das classes: tetraidro-imidazopirimidinas (**18**), imidazopirimidinas (**19-33**) e híbridos imidazopirimidina-tiazolidinonas (**34-48**); D) híbridos simplificados piridina-tiazolidinona (**49-63**) e ainda, para fins de comparação os compostos **LMed 27 (1)**, **LMed 36 (2)**, **LMed 47 R (64 (R))** e **LMed 47 R (64 (S))** (Figura 13) (Tabela 1 – Apêndice A).

Figura 13. Planejamento dos 100 possíveis novos inibidores de LaARG a partir das quatro substâncias selecionadas em trabalhos anteriores.



Planejamento
estrutural

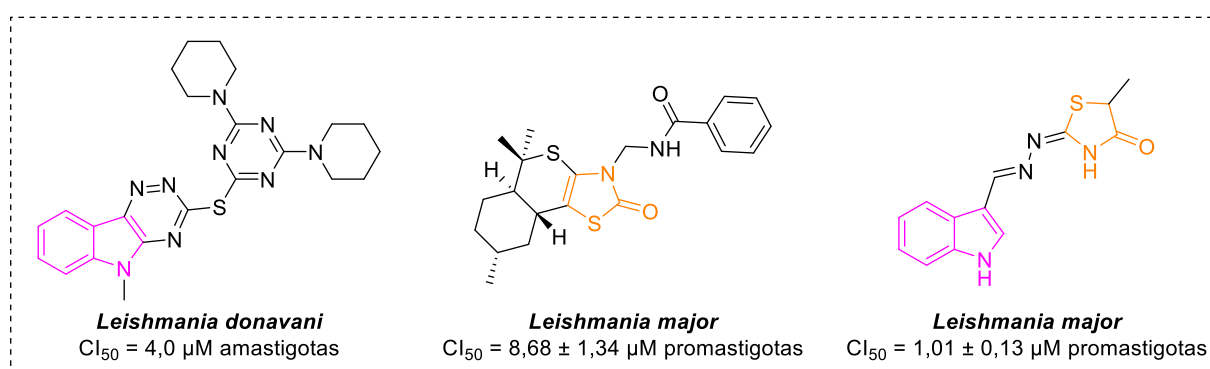


Fonte: Própria autora. Legenda: Em rosa: núcleo indólico; em laranja: núcleo tiazolidinônico, em azul: carboxila; em vermelho: núcleo imidazopiridina e seus isómeros e em ciano: piridina.

O grupamento indólico é um importante sistema heterocíclico que apresenta diversas atividades biológicas comprovadas, inclusive já foram relatadas

substâncias contendo esse núcleo com atividade inibitória frente a cepas de *L. donavani* (Figura 14) (GUPTA et al., 2010), além disso, o núcleo indólico apresenta uma ampla versatilidade sintética, pois pode ser facilmente modificado e funcionalizado em várias posições do anel. Assim como os indóis, as tiazolidinonas, heterociclos compostos por um átomo de enxofre e de nitrogênio, também apresentam uma variedade de atividade biológica, tendo sido descritas recentemente como potenciais inibidores de *L. major* (Figura 14) (SCHADICH et al., 2020). As tiazolidinonas podem servir como intermediários valiosos na síntese de moléculas complexas, sua versatilidade química permite a criação de estruturas mais complexas e funcionalizadas (ROSY P et al., 2019). Além disso, também foram relatados por Schadich et al. 2020 diversos híbridos indol-tiazolidinona que inclusive apresentam melhor atividade frente a *L. major* que seus núcleos separados (Figura 14).

Figura 14. Indoís e tiazolidinonas com atividade frente à cepas de *Leishmania spp.*



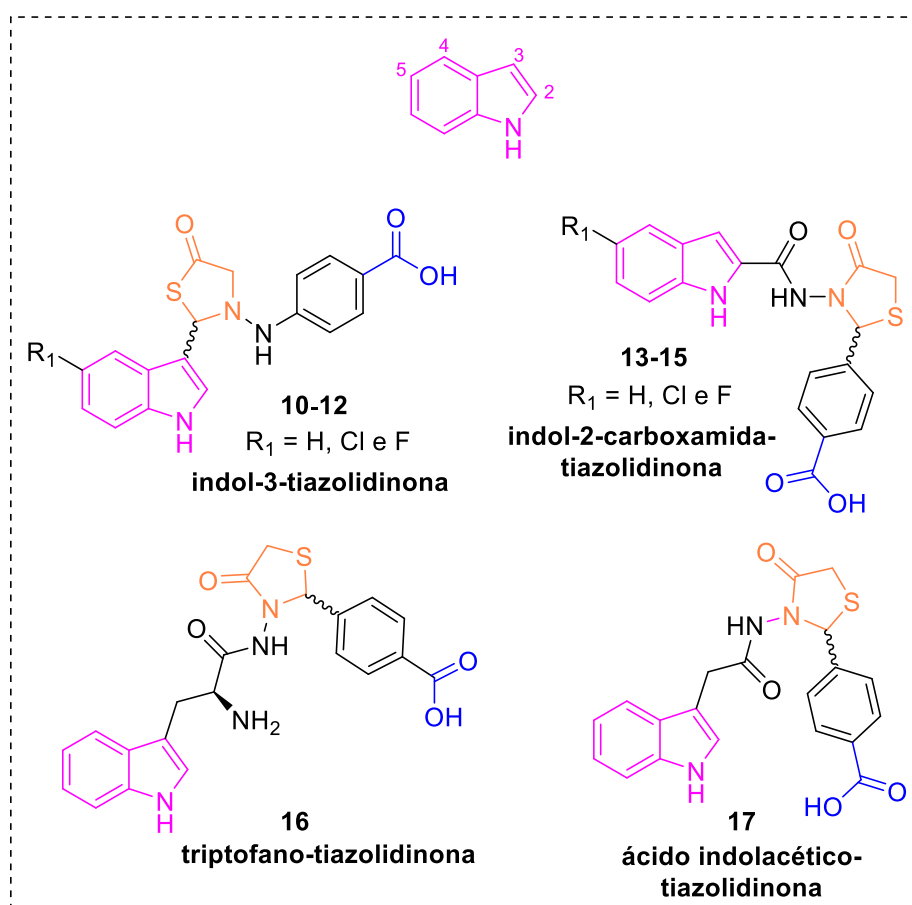
Fonte: Própria autora. *Legenda: em rosa: núcleo indólico e em laranja: tiazolidinona.*

A hibridação molecular é uma estratégia largamente utilizada na descoberta de novos fármacos, que se baseia na identificação de subunidades farmacofóricas em duas ou mais moléculas com atividade relacionada. A partir disso, as subunidades são fundidas, diretamente ou utilizando um espaçador, gerando então novas substâncias. Sendo assim, a hibridação pode explorar o melhor de ambos os grupamentos (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

Por esse motivo, foram propostos quatro conjuntos de híbridos indóis-tiazolidinonas, sinteticamente viáveis, gerando as seguintes classes: indol-3-tiazolidinonas (**10-12**), onde a tiazolidinona (**R/S-LMed 47**) está ligada diretamente a posição 3 do núcleo indólico diferentemente substituído na posição 5; indol-2-carboxamida-tiazolidinonas (**13-15**), nas quais o núcleo indólico com diversos

substituintes na posição 5, também está ligado a um espaçador peptídico na posição 2, onde está ligada a tiazolidinona **R/S-LMed 47**; triptofano-tiazolidinonas (**16**), onde o núcleo indólico está substituído na posição 3 por um espaçador (S)-2-aminobutano-carboxamida ao qual está ligada a tiazolidinona e, por fim, os ácido indolacético-tiazolidinonas (**17**), que apresentam um espaçador de butano-carboxamida entre a posição 3 do indol e a tiazolidinona. É válido ressaltar que em todas as classes, a carboxila foi mantida para promover possíveis interações com os íons Mn^{2+} , como observado para **R/S-LMed 47** (Figura 15).

Figura 15. Híbridos planejados (**10-17**)



Fonte: Própria autora. *Legenda: em rosa: núcleo indólico e em laranja: tiazolidinona, em azul: grupamento carboxila.*

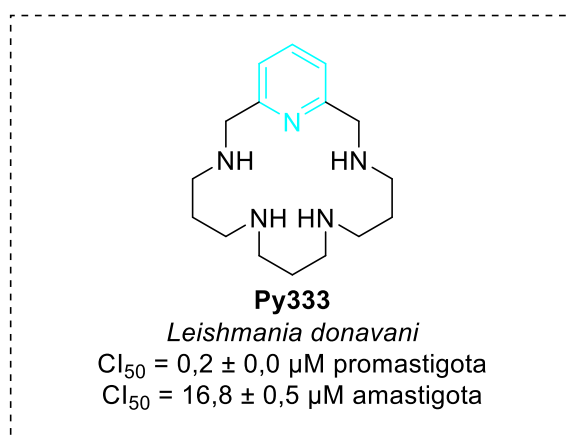
A segunda estratégia utilizada para planejar outras classes de substâncias foi o bioisosterismo, que consiste na substituição de um átomo ou grupo funcional de uma molécula por outro que apresenta propriedades químicas ou físicas semelhantes, com o objetivo de otimizar as propriedades farmacológicas de um composto, como

Fonte: Própria autora. *Legenda: Em vermelho: bioisósteros do núcleo indólico, em azul: porção ácido carboxílico, em laranja: tiazolidinona.*

Outra estratégia utilizada foi a simplificação molecular, na qual o núcleo imidazopiridina foi substituído pelo piridínico. Esta estratégia consiste na redução estrutural de moléculas complexas, preservando suas características essenciais, a fim de criar análogos mais simples e, portanto, mais sintetizáveis (BARREIRO, 2002).

A piridina é um heterociclo de seis membros substituído com apenas um átomo de nitrogênio, conhecido por estar presente na estrutura de diferentes fármacos, porém sua atividade frente a outros microrganismos como a *L. amazonensis* ainda não foi investigada a fundo. Há apenas relatos de alguns derivados piridínicos com atividade frente a cepas de *L. donavani* (Figura 18) (MARTÍN-MONTES et al., 2023).

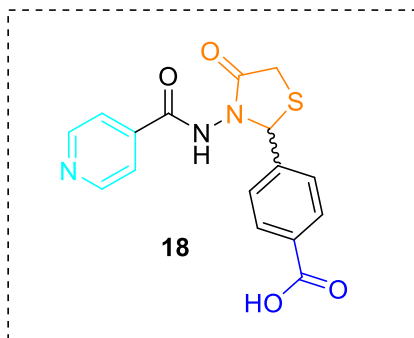
Figura 18. Atividade do composto Py333 frente à *L. donavani*.



Fonte: Própria autora. *Legenda: Em azul claro: núcleo piridínico.*

Por este motivo, a investigação deste núcleo frente a LaARG é uma nova perspectiva que pode ser explorada. Assim, nesse trabalho, foram analisados dois derivados híbridos (**18 (R)** e **18 (S)**) da tiazolidinona **R/S-LMed 47** com o núcleo piridínico (Figura 19).

Figura 19. Planejamento dos derivados (**18**) a partir da simplificação e hibridação molecular.



Fonte: Própria autora. *Legenda: Em azul claro: núcleo piridínico, em laranja: tiazolidinona e em azul escuro: porção ácido carboxílico.*

Ao todo foram planejados **100** novos ligantes, cuja a numeração das substâncias (**1-64**) já estão incluídos os estereoisômeros de cada classe com o mesmo código, como demonstrado na Tabela 1 (Apêndice A). Assim todos os ligantes foram desenhados no *software* Marvin Scketch (v. 2023), onde foram pesquisados e considerados todos os tautômeros e estados de ionização de maior abundância no pH fisiológico (7,4), para que não ocorresse troca de configuração, as substâncias foram salvas em 3D no formato SYBYL (*.mol2). Assim, as energias dos ligantes foram minimizadas por mecânica molecular, utilizando o campo de força MMFF94 e, por fim, novamente salvas em .mol2 para serem utilizadas na etapa de docagem molecular.

3.2 TRIAGEM VIRTUAL

3.2.1 Classificação e validação do protocolo de docagem molecular

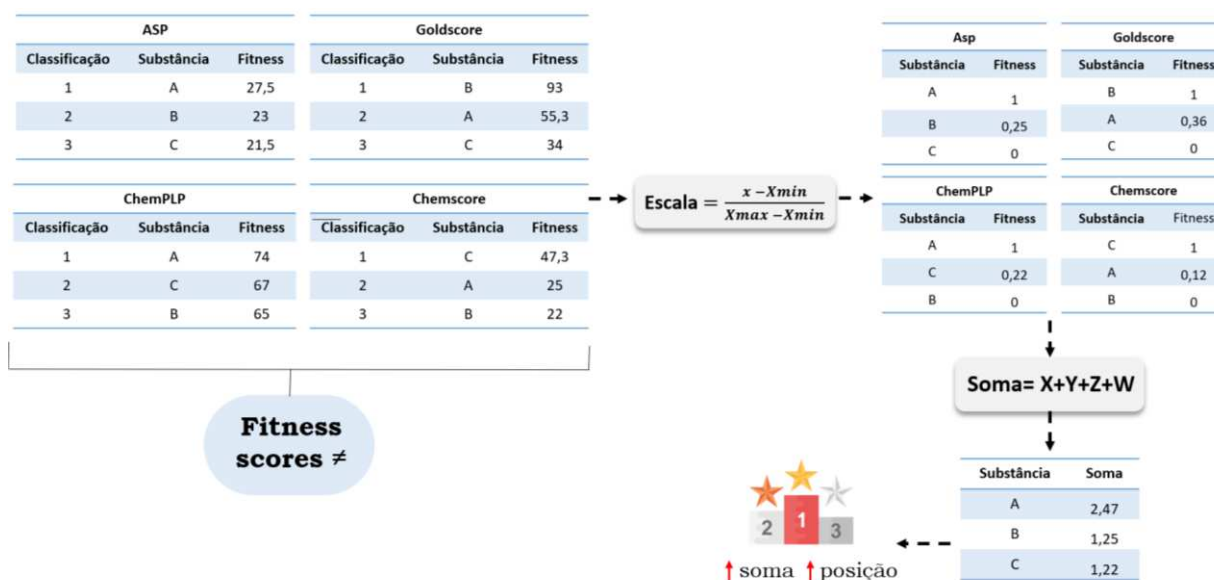
O modelo tridimensional da LaARG foi criado por homologia, utilizando como referência a estrutura tridimensional da enzima LmARG (PDB ID: 4IU1, conforme descrito por D'Antonio et al., 2013). Isso se deve à falta de disponibilidade da estrutura tridimensional da LaARG no Protein Data Bank (PDB), sendo que apenas as estruturas da LmARG e ARG I estão disponíveis. E ainda, ao realizar o processo de docking molecular com a LmARG, foi observada uma seleção de ligantes diferente daquela obtida com a LaARG (ver Apêndice A – Tabela 2). Esse resultado sugere que, apesar da similaridade entre as enzimas, a escolha dos ligantes pode ser afetada ao se utilizar uma enzima diferente da própria LaARG.

Sendo assim, na estrutura de LaARG criada por homologia, não há um

ligante co-cristalizado para que se possa realizar uma validação do protocolo de docagem molecular por redocagem. Assim, por se tratar de uma triagem envolvendo uma grande quantidade de ligantes, optou-se por adotar a metodologia de escala, como descrito por (Wiggers et al. (2011) para fazer a classificação dos ligantes levando em conta as quatro funções de pontuação do programa GOLD (ChemPLP, Chemscore, Goldscore e ASP).

Como cada uma das funções de pontuação fornece um resultado de *fitness score* diferente, a comparação entre elas é dificultada. Portanto, o objetivo da metodologia de escala é a aproximação dos conjuntos de resultados alcançados por cada função. Sendo assim, a equação de escala (Figura 20) é aplicada considerando o maior e o menor *fitness score* da função e o *fitness* obtido pela substância na mesma, gerando uma nova classificação. Os resultados obtidos para cada função são somados e os ligantes são então classificados em ordem decrescente, sendo os ligantes que obtêm os maiores valores de somatória classificados em primeiro lugar (WIGGERS et al., 2011).

Figura 20. Representação da metodologia de escala.



Fonte: Própria autora.

Assim sendo, a docagem molecular dos novos ligantes planejados foi realizada no modelo de LaARG, construído por homologia, utilizando as coordenadas no centro dos íons Mn^{2+} , com 50 corridas interativas e um raio de 20 angstroms. Os 104 compostos e seus tautômeros (totalizando 157 estruturas) foram classificados de

acordo com os *fitness scores* em cada uma das quatro funções. Para a aplicação da metodologia de escala foram consideradas apenas a solução com maior *fitness score* de cada estrutura, ou seja, foram desconsideradas as outras 49 soluções derivadas das 50 corridas. Como o conjunto de substâncias avaliado era grande, optou-se por selecionar apenas 10% do total de substâncias triadas, ou seja, as 10 melhores substâncias (Tabela 1).

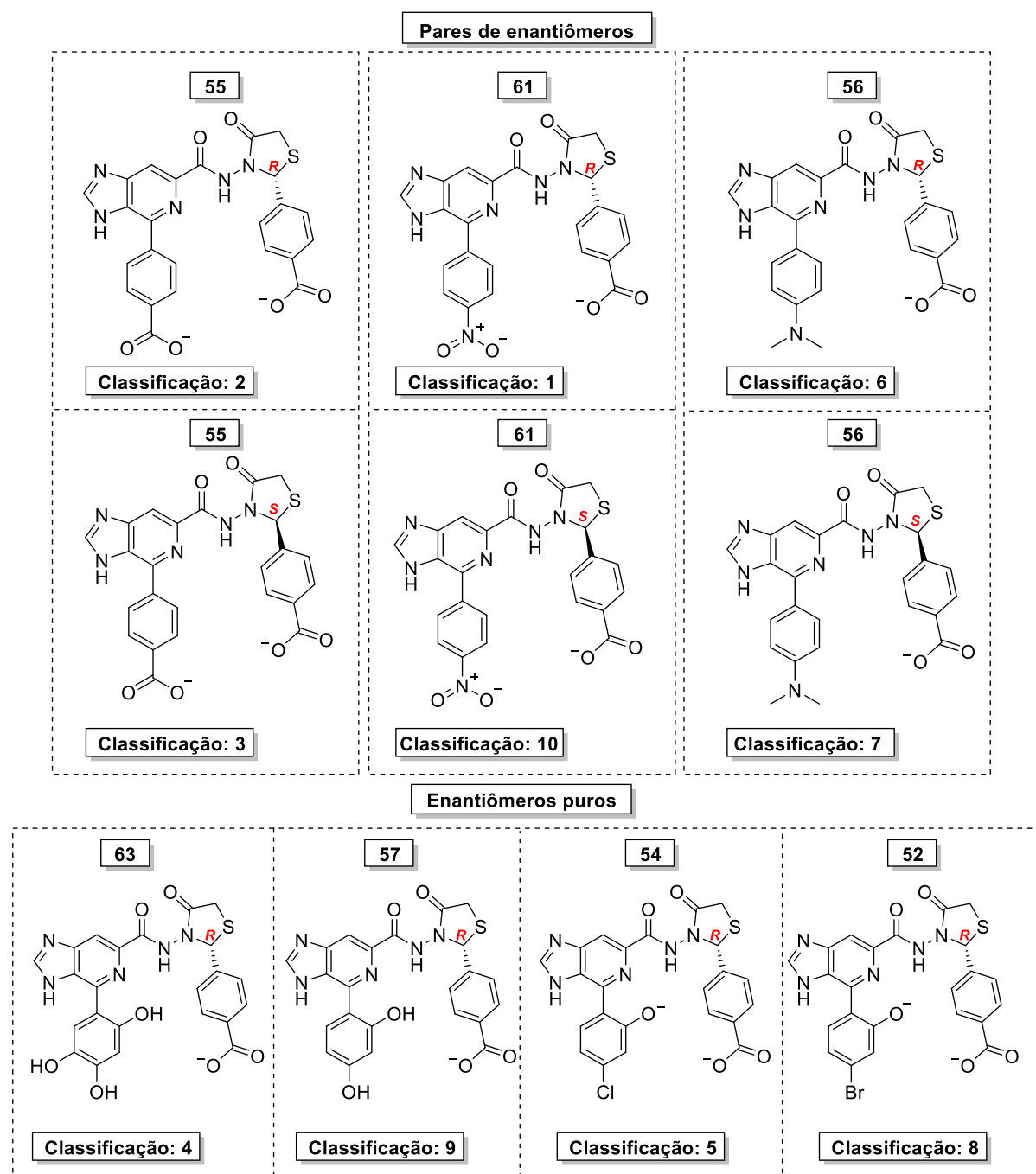
Tabela 1. Classificação das substâncias após a realização da escala.

Classificação	Substância
1	61 (R)
2	55 (R)
3	55 (S)
4	63 (R)
5	54 (R)
6	56 (R)
7	56 (S)
8	52 (R)
9	57 (R)
10	61 (S)

Fonte: Própria autora.

As 10 melhores substâncias são da classe das tetraimidazopiridinas hibridizadas com a tiazolidinona (**LMed47**), substituídas com grupamentos polares, como a carboxila, o grupo nitro e a amina terciária, hidroxilas e halogênios, que certamente contribuíram para maiores interações com o alvo, por isso apresentaram resultados de *fitness* superiores. Dentre elas, estão três pares de enantiômeros, o **55 (S)** e **55 (R)**, **61 (R)** e **61 (S)**, e **56 (S)** e **56 (R)**. As quatro substâncias que se apresentaram na classificação como enantiômeros puros são todas *R*, as contendo hidroxilas, a **63 (R)** e a **57 (R)** e dois derivados de salicilatos, porém substituídos com halogênios diferentes o **52 (R)** e **54 (R)** (Figura 21).

Figura 21. Substâncias selecionadas a partir da metodologia de escala.



Fonte: Própria autora.

Após aplicar a metodologia de escala, os dez primeiros ligantes da classificação final também foram selecionados para validação do protocolo de docagem molecular. A validação foi realizada através da busca por consenso entre pelo menos duas funções de pontuação para cada um dos 10 ligantes. Para isso, os valores de RMSD foram calculados para cada ligante, pareando-se com outro (dois a dois), sendo considerado consenso quando o RMSD entre as poses foi menor do que 2,00 Å. Esta avaliação foi realizada com base em estudos de Tuccinardi et. al 2014,

que sobrepõe funções de programas diferentes, porém, para validar nossos resultados comparamos as funções de um mesmo programa (TUCCINARDI et al., 2014) (Tabela 2).

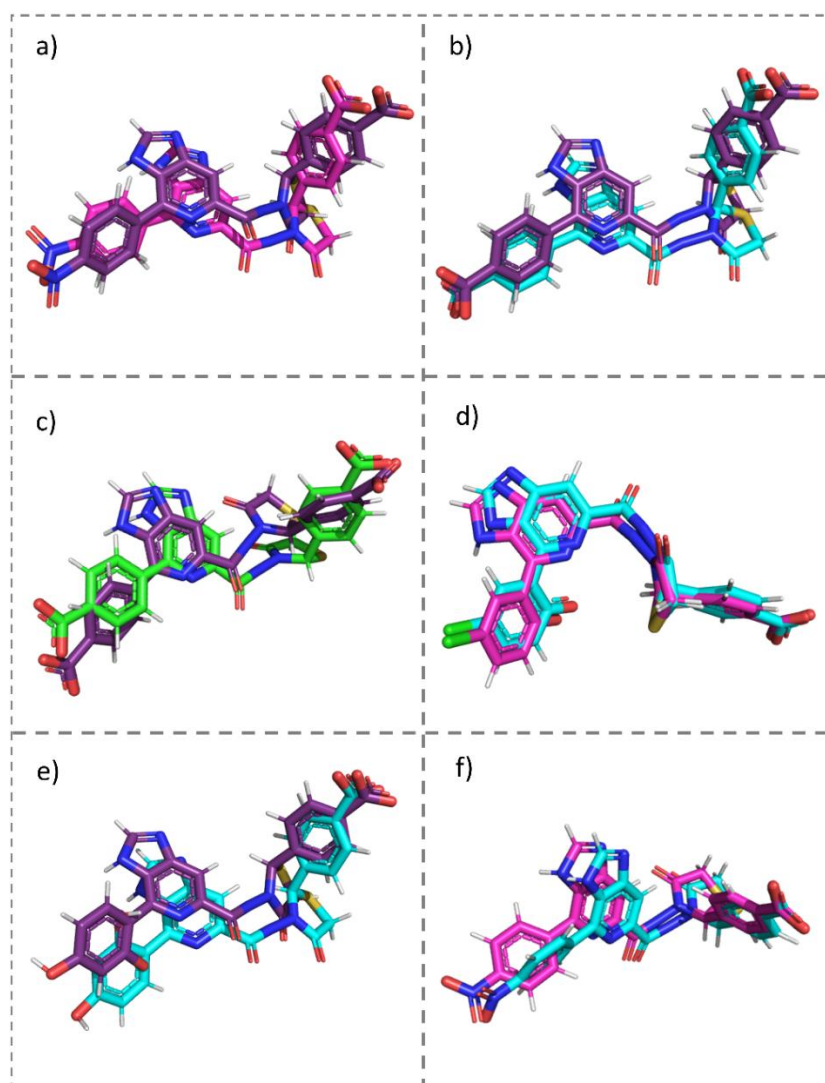
Tabela 2. Validação das substâncias selecionadas por RMSD.

Classificação	Substâncias	RMSD (Å)					
		ChemPLP x GoldScore	ChemPLP x ChemS core	ChemPLP x ASP	GoldScore x ChemScore	GoldScore x ASP	ChemS core x ASP
1	61 (R)	5,58	5,05	4,70	1,60	3,41	3,01
2	55 (R)	1,37	6,66	3,90	7,18	3,82	8,01
3	55 (S)	6,45	6,35	5,58	2,07	1,60	1,73
4	63 (R)	2,14	4,29	9,41	5,24	9,56	9,70
5	54 (R)	7,90	0,60	5,35	7,99	6,54	5,15
6	56 (R)	5,68	12,05	4,11	12,22	4,66	10,42
7	56 (S)	3,99	12,85	12,34	12,95	13,36	10,54
8	52 (R)	7,73	9,03	9,10	9,88	6,09	13,20
9	57 (R)	1,90	12,96	8,52	12,40	8,85	15,18
10	61 (S)	2,18	1,05	12,94	1,88	12,72	12,48

Fonte: Própria autora. Legenda: Em negrito e sublinhado os RMSD menores que 2 Å obtidos por cada substância.

A análise das sobreposições das poses das funções que obtiveram consenso corrobora os resultados obtidos de RMSD, demonstrando que, dentre todas, a **54 (R)** (Figura 22 - d) apresenta um menor desvio entre átomos, sobrepondo praticamente todos os anéis, exceto o da tetraimidazopiridina, com leve desvio. Seguida pela **61 (S)** (Figura 22 – f), onde apenas o anel substituído pelo grupamento nitro apresenta um maior deslocamento, o que não ocorre na **55 (R)** (Figura 22 – b), onde ambos os anéis substituídos com o carboxilato apresentam pareamento satisfatório, porém seus outros anéis apresentam desvios de átomos maiores que o anterior, por isso seu valor de RMSD é um pouco maior. A **61 (S)** (Figura 22 – a) e **55 (S)** (Figura 22 – c) apresentam RMSD muito próximos, esta pequena diferença pode ser exemplificada pelo maior alinhamento entre o anel substituído pelo grupo nitro de **61 (S)** comparado com o anel substituído pelo carboxilato de **55 (S)**. E por fim, a **57 (R)** (Figura 22 – e), com maior RMSD devido à falta de alinhamento dos anéis, sendo a porção do carboxilato da tiazolidinona a única mais próxima.

Figura 22. Sobreposição dos melhores RMSDs das substâncias.



Fonte: Própria autora. *Legenda: a) 61 (R), b) 55 (R), c) 55 (S), d) 54 (R), e) 57 (R) e f) 61 (S). Em azul: pose obtida em ChemPLP, em rosa: ChemScore, em verde: ASP e em roxo: GoldScore.*

Apenas quatro substâncias não obtiveram consenso entre nenhum par de função, são elas a **63 (R)**, **56 (R)**, **56 (S)** e **52 (R)**, que foram então descartadas das análises e da triagem. Quatro outras substâncias obtiveram consenso entre ChemPLP e GoldScore (**55 (R)** e **57 (R)**), e ChemPLP e ChemScore (**54 (R)** e **61 (S)**), sendo assim, para a análise destas, a função ChemPLP foi escolhida. Por fim, a **61 (R)** obteve consenso entre GoldScore e ChemScore, enquanto a **55 (S)** entre GoldScore e ASP, e também entre ChemScore e ASP, este último com valor maior, portanto sendo considerado o primeiro par de função. Assim, para as substâncias **61 (S)** e **55 (S)** a função escolhida para análise das interações foi a GoldScore (Tabela 3).

Tabela 3. Função escolhida para análise das interações.

Classificação	Substância	Função escolhida
1	61 (<i>R</i>)	GoldScore
2	55 (<i>R</i>)	ChemPLP
3	55 (<i>S</i>)	Goldscore
4	54 (<i>R</i>)	ChemPLP
5	57 (<i>R</i>)	ChemPLP
6	61 (<i>R</i>)	ChemPLP

Fonte: Própria autora.

3.2.2 Análise das interações intermoleculares dos novos compostos

Os seis compostos selecionados foram submetidos à análise das interações intermoleculares com o alvo molecular (LaARG). Isso permitiu a dedução do provável mecanismo molecular de ação e a reclassificação das moléculas com base nas interações mais robustas, facilitando a identificação do composto mais promissor do conjunto selecionado. Além da força das interações, a classificação das substâncias levou em consideração sua relevância. Portanto, as posições mais elevadas foram atribuídas às substâncias que apresentavam interações com os cofatores e aminoácidos-chave importantes para o processo catalítico ou para o reconhecimento molecular, ou seja, os íons Mn^{2+} (MnA e MnB), as histidinas (His114 e His139) e os aspartatos (Asp137, Asp141, Asp243 e Asp245) presentes no sítio ativo.

Dentre eles, os compostos **61 (R)** e **55 (S)** apresentaram duas interações com os íons Mn^{2+} . No entanto, enquanto o primeiro realiza três interações de hidrogênio com dois resíduos de aminoácidos da cadeia do monômero (**A**), o segundo **55 (S)**, estabelece somente interações de hidrogênio com um resíduo do monômero **B**. Por esse motivo, o **61 (R)** recebeu uma classificação superior, ocupando a primeira posição, enquanto o **55 (S)** ficou em uma posição inferior (Quadro 1).

Quadro 1. Interações realizadas por cada substância com o alvo molecular.

Aminoácidos	Substâncias					
	61 (R)	55 (R)	55 (S)	54 (R)	57 (R)	61 (S)
Mn A						
Mn B						
His139						
His154						
Ala192						
Val193						
Asp195						
Asn143						
Thr148						
Val149						
Lys198						
Val259						
Pro258						
Arg312 (B)						
Total	12	8	13	10	11	11

Íon-metálica
 Pi-pi
 Pi-álquil
 Orbitais pi (carboxila-fenil)
 Hidrogênio
 Pi-enxofre
 Pi-sigma
 Hidrogênio não convencional

Fonte: Própria autora. *Legenda: Em negrito os aminoácidos e íons envolvidos com o mecanismo catalítico.*

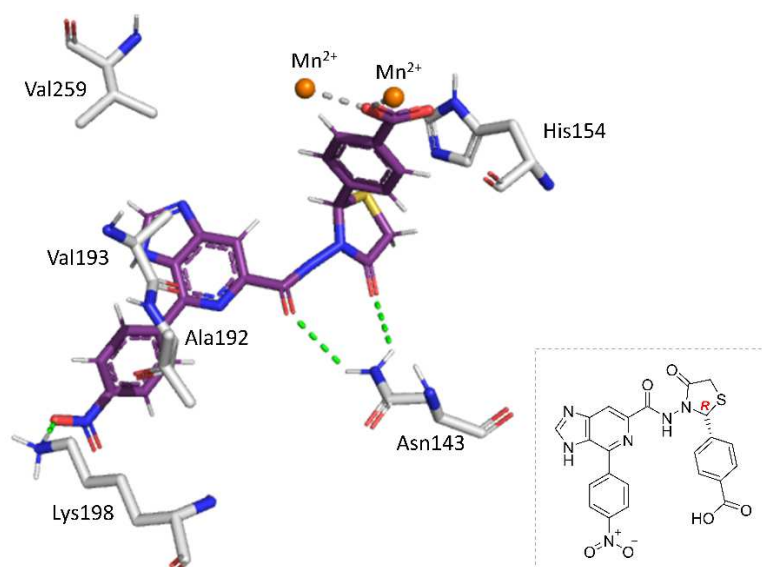
Todas as outras substâncias fizeram uma interação com o íon MnB e interações com a His139 presente no bolsão catalítico, portanto o segundo critério de classificação envolveu a quantidade de interações por ligação de hidrogênio. Deste modo, a segunda posição foi ocupada pela **57 (R)**, com 5 interações, seguida da **55 (R)**, com 4 e da **54 (R)**, com 2. Como a **61 (S)** não realizou nenhuma interação por ligação de hidrogênio convencional, ela foi classificada como última. Por fim, a **55 (S)** foi classificada como penúltima, devido aos motivos já apresentados (Tabela 4).

Tabela 4. Classificação das substâncias de acordo com as interações.

Classificação	Substâncias
1	61 (R)
2	57 (R)
3	55 (R)
4	54 (R)
5	55 (S)
6	61 (S)

Fonte: Própria autora.

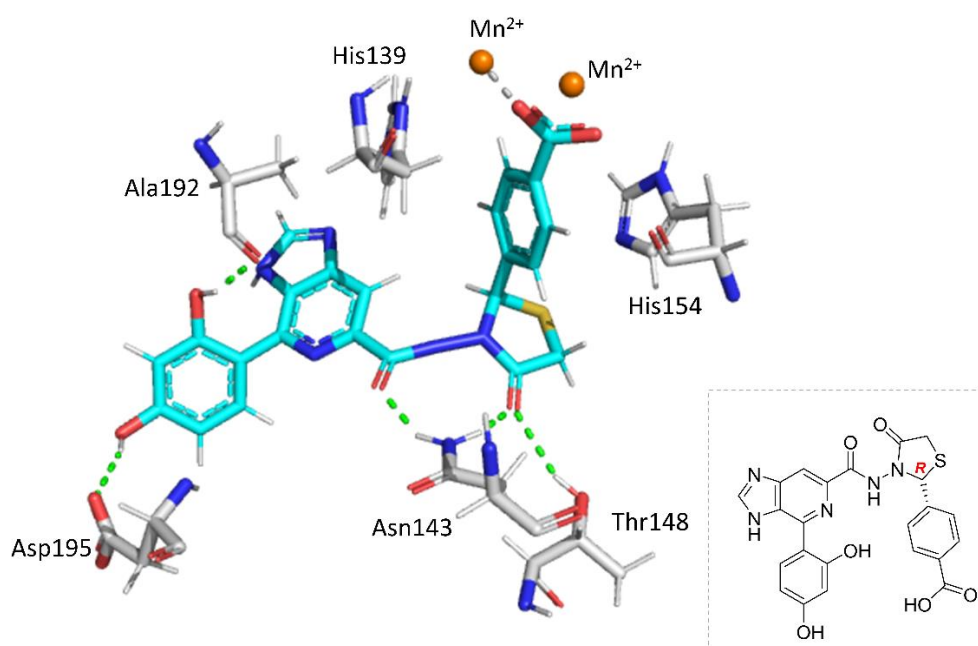
Assim como o composto modelo **LMed 47**, todas as substâncias interagiram com os íons Mn^{2+} a partir da carboxila da tiazolidinona. O primeiro colocado, **61 (R)** (Figura 23), apesar de não interagir com nenhum outro resíduo de aminoácido do bolsão catalítico, interage com ambos os íons Mn^{2+} . A carbonila da tiazolidinona e o núcleo hibridizado imidazopiridina permitiram a interação por ligação de hidrogênio com um resíduo de Asn143, assim como o grupo nitro com a Lys198. A imidazopiridina foi importante para interações hidrofóbicas do tipo π -alquil com a Val259 e entre orbitais π das carboxilas da Val193 e Ala192 e os orbitais π da tetraimidazopiridina. Finalmente, a posição do anel tiazolidinônico possibilitou interações hidrofóbicas do tipo π - π e π -enxofre com a His154.

Figura 23. Interações entre **61 (R)** e a LaARG.

Fonte: Própria autora. *Legenda: em cinza as interações com os íons Mn^{2+} , em verde: interações por ligação de hidrogênio.*

A segunda colocada, **57 (R)** (Figura 24), realizou apenas uma interação com o íon Mn^{2+} , porém apresentou interação do tipo π - π com o resíduo de histidina do bolsão catalítico (His139) a partir do seu anel aromático da porção tiazolidinona. Da mesma forma que a **61 (R)**, os oxigênios das carbonilas do espaçador peptídico e a do anel tiazolidinônico possibilitaram interações por ligação de hidrogênio com Asn143. Este último ainda realizou uma interação do mesmo tipo com a Thr148. Ademais, as hidroxilas substituintes do anel aromático forneceram duas interações por ligação de hidrogênio a mais, com o resíduo de Asp195 e Ala192. Este último resíduo também realiza interação do tipo π -alquil com o anel imidazopiridina. E, por fim, assim como para **61 (R)**, o anel tiazolidinônico participa de interações hidrofóbicas do tipo π -enxofre e π - π com a His154.

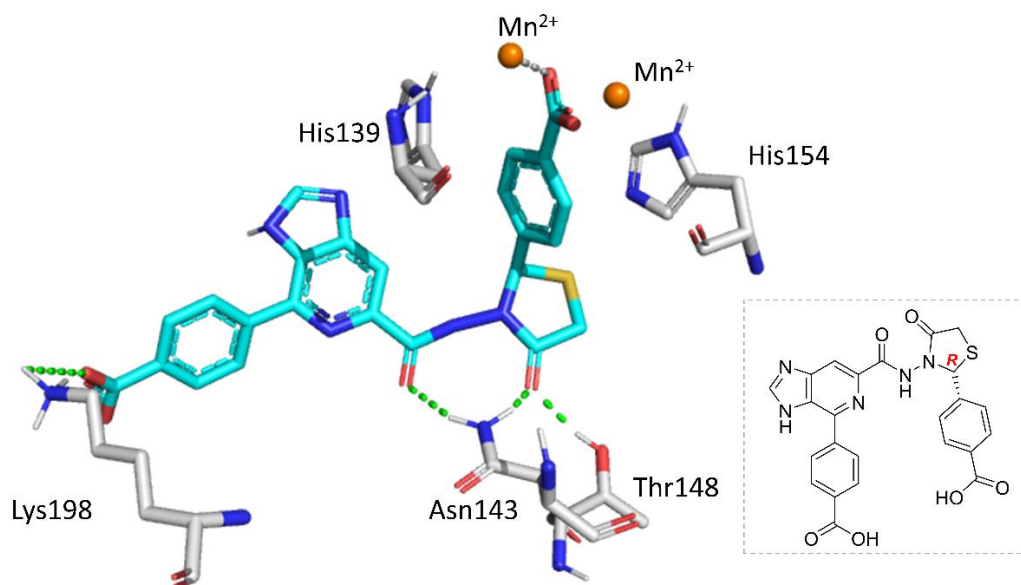
Figura 24. Interações entre a **57 (R)** e a LaARG.



Fonte: Própria autora. *Legenda: em cinza as interações com os íons Mn^{2+} , em verde: interações por ligação de hidrogênio.*

A única diferença entre as interações da segunda (**57 (R)**) e da terceira colocada **55 (R)** (Figura 25) é derivada justamente da substituição do anel aromático, pois, enquanto as hidroxilas permitiam duas interações por ligação de hidrogênio com os aminoácidos Ala192 e Asp195, a carboxila provoca um deslocamento na posição do anel, possibilitando então, apenas uma interação com a Lys198, e ainda devido a este deslocamento a interação hidrofóbica com a Ala192 também não ocorre.

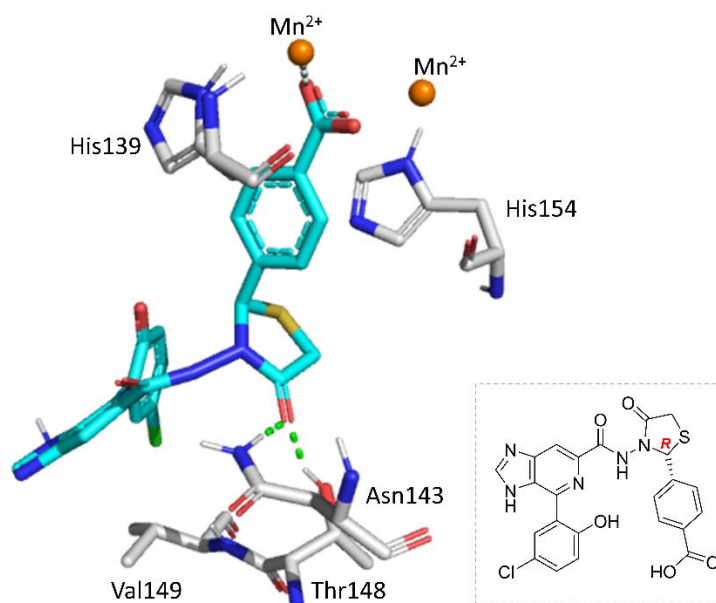
Figura 25. Interações entre **55 (R)** e a LaARG.



Fonte: Própria autora. *Legenda: em cinza as interações com os íons Mn²⁺, em verde: interações de hidrogênio.*

Ao contrário dos outros ligantes, a substituição do anel aromático do **54 (R)** (Figura 26) não favoreceu nenhuma interação por ligação de hidrogênio com resíduos próximos. Este composto fez interações também a partir da carboxila do anel tiazolidinônico com o íon Mn²⁺, e o anel aromático desta parte também permitiu interações hidrofóbicas do tipo π-π com His139 e Hist154. Também, com este último resíduo, foi observada uma interação do tipo π-enxofre com o enxofre presente no anel tiazolidinônico. A carbonila deste mesmo anel possibilitou duas interações por ligação de hidrogênio com Thr148 e Asn143. Por fim, o núcleo imidazopiridina realizou quatro interações hidrofóbicas do tipo π-álquil com o resíduo de Val149, uma delas com envolvimento do átomo de cloro.

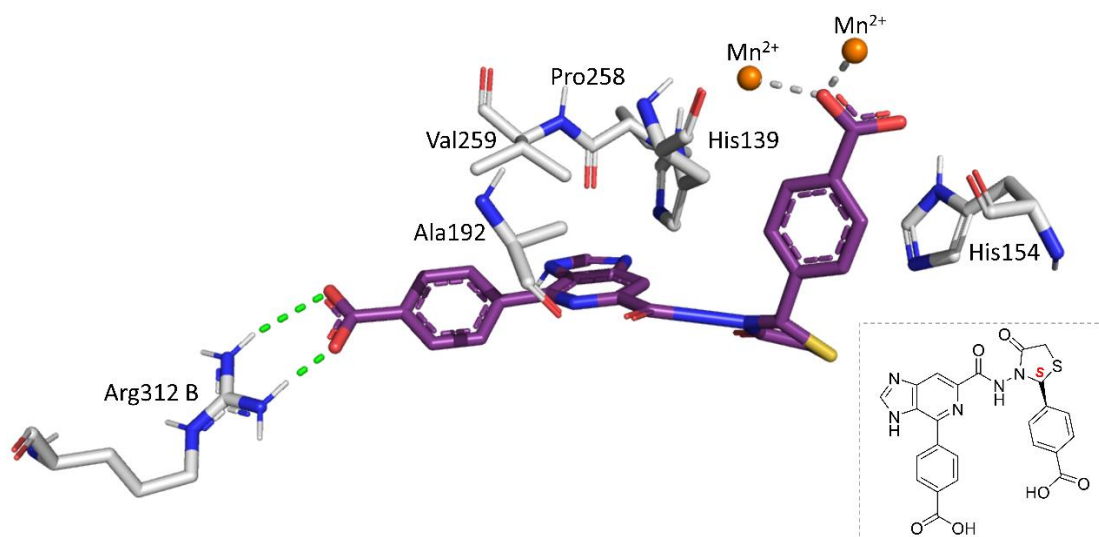
Figura 26. Interações entre **54 (R)** e a LaARG.



Fonte: Própria autora. *Legenda: em cinza as interações com os íons Mn^{2+} , em verde: interações de hidrogênio.*

O **55 (S)** (Figura 27) interagiu com os dois íons Mn^{2+} através do carboxilato e com o resíduo catalítico His139 através de uma interação por ligação de hidrogênio não convencional pela carbonila do espaçador do híbrido. Assim como a maioria, interagiu com a His154 a partir de interações hidrofóbicas do tipo π - π com o anel aromático e π -enxofre com o enxofre do anel tiazolidinônico. A conformação quase plana deste ligante proporcionou cinco interações π -alquil com o anel imidazopiridínico, três com a Val259, uma com a Ala192 e uma com a Pro258. Com este último, também observou-se uma interação de orbitais π , entre a carbonila da prolina e o anel imidazopiridina. E, por fim, esta conformação também permitiu uma interação entre o carboxilato da imidazopiridina e um resíduo de aminoácido Arg132 do monômero B.

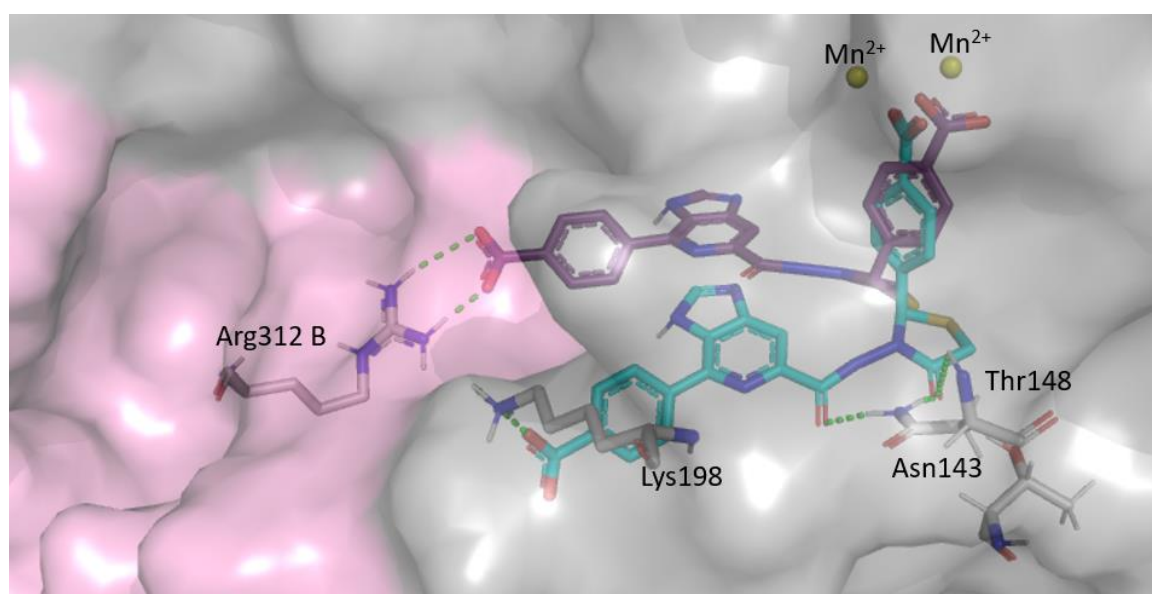
Figura 27. Interações entre **55 (S)** e a LaARG.



Fonte: Própria autora. *Legenda: em cinza as interações com os íons Mn^{2+} , em verde: interações de hidrogênio.*

Ao sobrepor-se a **55 (S)** com seu enantiômero **55 (R)** (Figura 28) pode-se perceber como a configuração interfere diretamente no posicionamento do anel. Também é possível observar que o deslocamento do anel imidazopiridínico da **55 (S)** deixa a molécula mais plana, ou seja, menos compacta, permitindo o alcance do monômero B, o que não acontece na **55 (R)**.

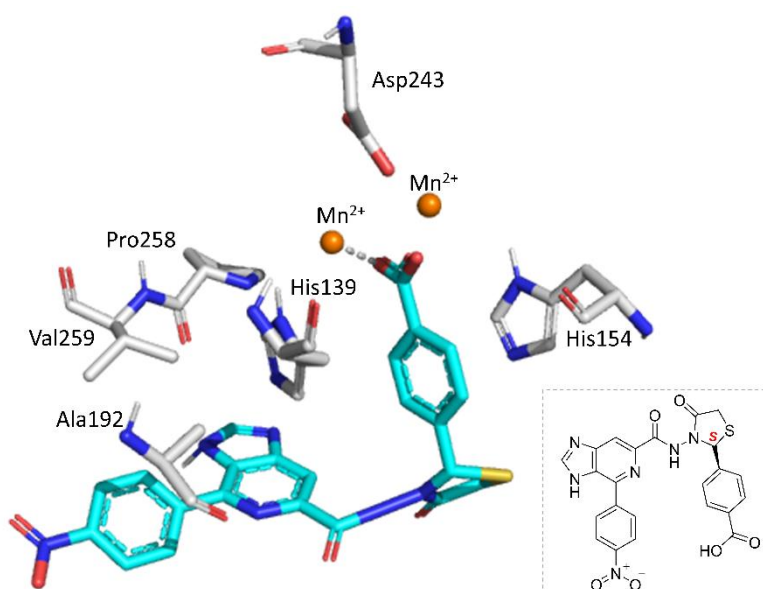
Figura 28. Sobreposição entre os enantiômeros **55 (S)** e **55 (R)**.



Fonte: Própria autora. *Legenda: em superfície cinza a cadeia A, cadeia B representada pela superfície rosa, em roxo o ligante **55 (S)** e em azul o **55 (R)**, em verde as interações de hidrogênio.*

O último colocado dentre os 6 compostos foi o **61 (S)** (Figura 29), apresentando uma interação com o íon Mn^{2+} através da carboxila. Como os demais, também apresentou interações hidrofóbicas do tipo π - π com o anel aromático e π -enxofre com o enxofre do anel tiazolidinônico. Este composto não realizou nenhuma interação por ligação de hidrogênio convencional com o alvo, porém fez uma interação por ligação de hidrogênio não convencional entre a carbonila da prolina e o hidrogênio não polar da imidazopiridina localizado no carbono 2 do anel tiazolidinônico. Apesar disso, a posição do anel imidazopiridina permitiu interações hidrofóbicas do tipo empilhamento π - π com a histidina catalítica (His139), bem como quatro interações π -alquil, duas com a Val259 e duas com a Ala192.

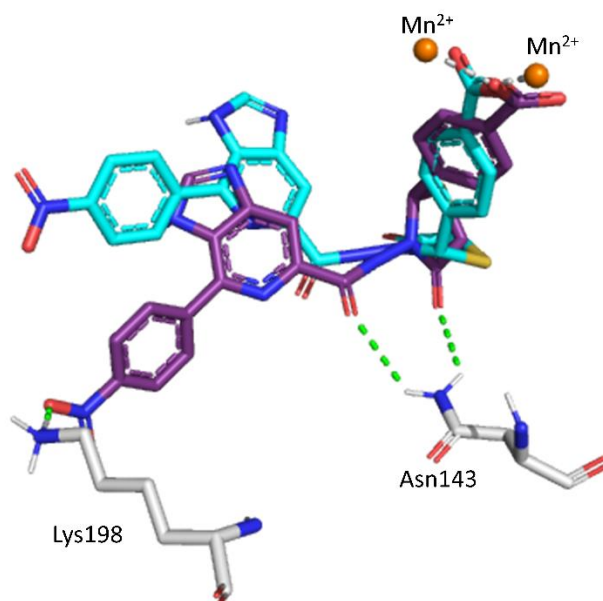
Figura 29. Interações entre **61 (S)** e a LaARG.



Fonte: Própria autora. *Legenda: em cinza as interações com os íons Mn^{2+} , em verde: interações de hidrogênio.*

Pela sobreposição dos enantiômeros **61 (S)** e **61 (R)** é possível compreender por que o enantiômero S realiza interação por ligação de hidrogênio com o alvo enquanto o R não realiza tais interações (Figura 30). A posição das carbonilas de **61 (R)** favorece estas interações com a Asn143, bem como a posição do anel imidazopiridínico, que proporciona ao grupo nitro uma distância favorável para interagir com a Lys198, o que não ocorre com a **61 (S)**, no qual as carbonilas estão voltadas para uma face oposta aos hidrogênios da Asn143 e o grupo nitro está a uma longa distância da Lys198.

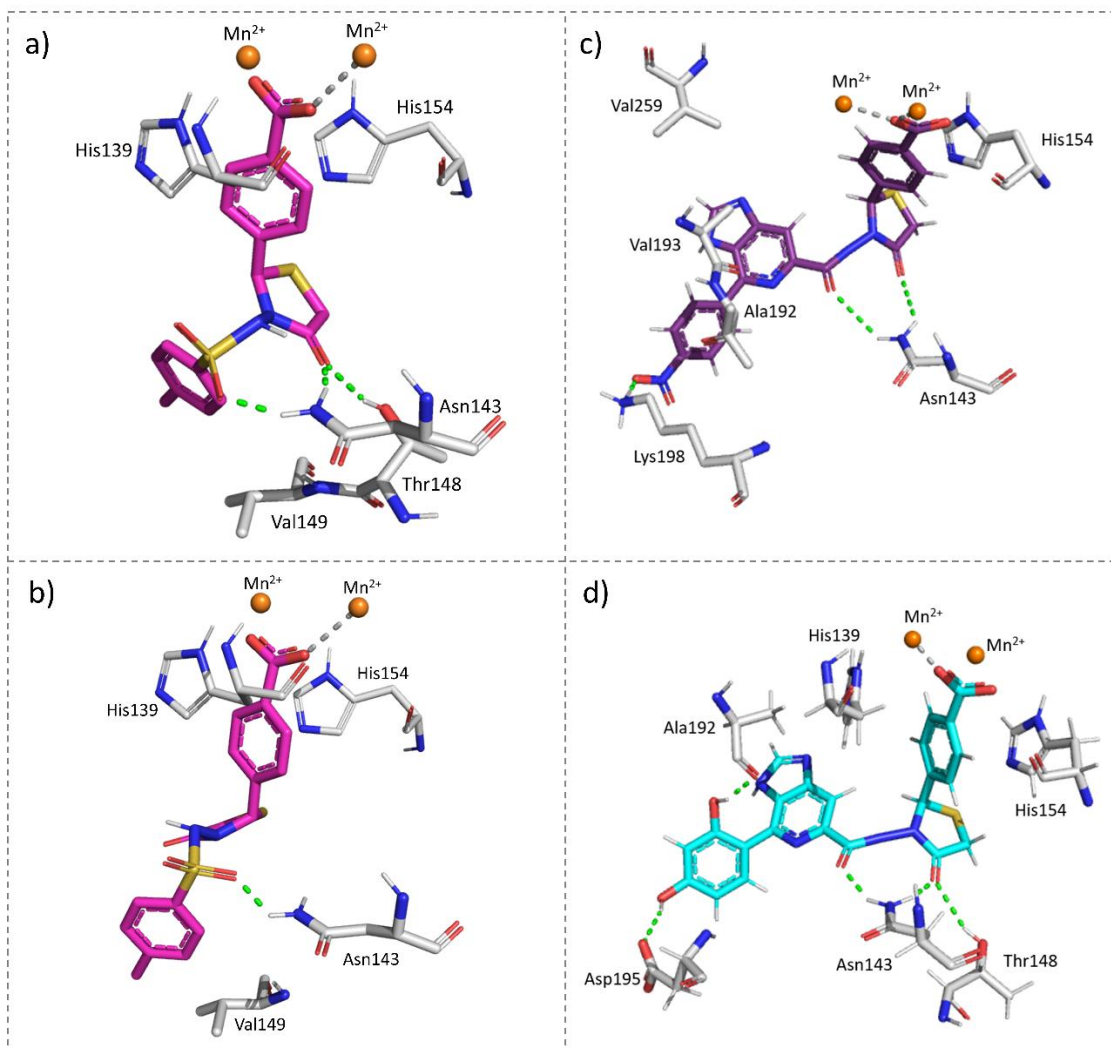
Figura 30. Sobreposição dos enantiômeros **61 (S)** e **61 (R)**.



Fonte: Própria autora. *Legenda: Em roxo, o ligante **61 (R)** e em azul, o **61 (S)**. As interações de hidrogênio estão representadas em linhas pontilhadas de coloração verde e as interações com os íons Mn^{2+} em cinza.*

Ao se comparar as duas primeiras colocadas da triagem virtual anteriormente realizada (**LMed47 R** e **S**) com os novos ligantes (**61 (R)** e **57 (R)**), percebe-se que os últimos realizaram maiores quantidades de interações com o alvo (Figura 31). A carboxila ligada ao anel fenila na posição 2 do núcleo tiazolidinona, que foi mantido nas novas séries planejadas, parece repetir o padrão de interação, interagindo com os íons manganês e resíduos de histidinas.

Figura 31. Comparação entre as substâncias protótipo (**LMed47 R** e **S**) e das duas melhores novas substâncias triadas **61 (R)** e **57 (R)**.

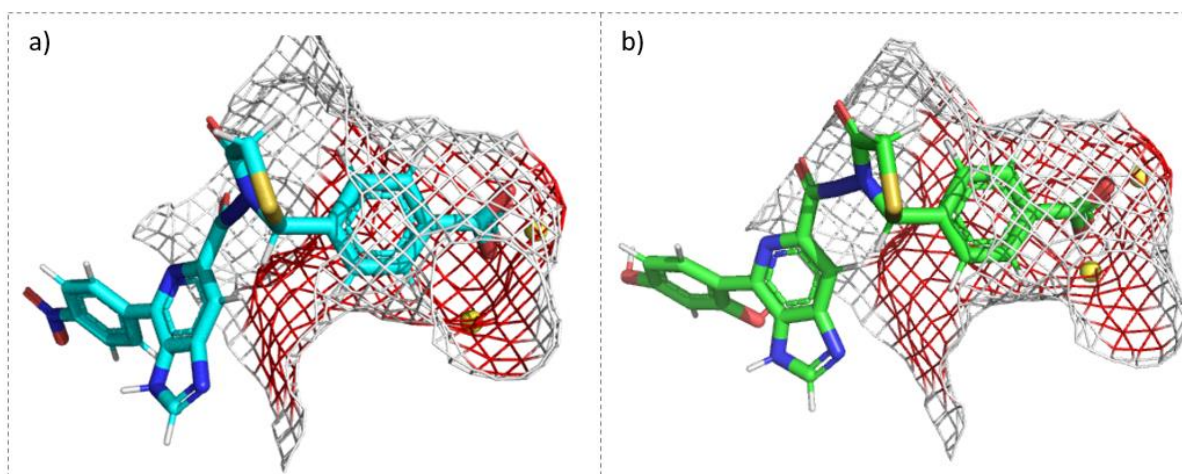


Fonte: Própria autora. *Legenda: a) LMed47 S, b) LMed47 R, c) 61 (R) e d) 57 (R), em laranja íons Mn^{2+} , em azul as poses do ligante em ChemPLP, em rosa poses obtidas do ligante na função Chemscore, em roxo as poses do ligante em Goldscore, linhas pontilhadas em verde representam as interações de hidrogênio e cinzas interações com os metais.*

A posição do carboxilato da **61 (R)** permitiu uma interação com os dois íons Mn^{2+} , o que não ocorreu nas substâncias-protótipo. A hibridação molecular, principalmente na região entre a carboxila do anel aromático com a imidazopiridina facilitou interações por ligação de hidrogênio nas novas substâncias, o que ocorreu em menor proporção nas substâncias-protótipo devido à posição das tiocarbonilas. Com a **57 (R)** fica evidente que o alongamento da cadeia e a adição de grupamentos polares passíveis de realizar interação por ligação de hidrogênio foi benéfica para o reconhecimento ligante-alvo molecular, visto que aumentou significativamente a quantidade delas.

Como as substâncias aumentaram significativamente em extensão e volume, comparado aos protótipos, uma preocupação era se elas caberiam no sítio ativo, já que os resíduos catalíticos ocupam uma área de aproximadamente 15 Å². Para isso, foram analisadas as áreas ocupadas pelas duas primeiras substâncias a **61 (R)** e a **57 (R)** (Figura 32).

Figura 32. Encaixe das substâncias **61 (R)** e **57 (R)** no sítio ativo.



Fonte: Própria autora. *Legenda: a) 61 (R) e b) 57 (R). Representado pela rede vermelha estão os aminoácidos que compõe o sítio catalítico da LaARG.*

Porém esta preocupação foi extinta, já que a principal aproximação do bolsão catalítico é feita justamente pelo carboxilato e pelo anel aromático. Sendo assim, foi constatado que não só as substâncias cabem no sítio catalítico, como suas substituições permitem interações com outras partes do alvo molecular, que pode contribuir para a ancoragem destas substâncias no sítio ativo.

3.3 ANÁLISE DA ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO, ELIMINAÇÃO E TOXICIDADE DAS SUBSTÂNCIAS SELECIONADAS

Utilizando a plataforma online SwissADME, foi possível realizar a predição acerca da biodisponibilidade oral das estruturas selecionadas a partir de 6 parâmetros: lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação, que são representados graficamente pelo painel de biodisponibilidade (Figura 30), onde a área ocupada pela substância triada deve estar dentro dos limites dos eixos do gráfico determinada pelos seis descritores para ser considerada uma molécula com

características fármaco-similares.

Como todas as 6 melhores substâncias triadas são da mesma classe de compostos, e a única diferença é o grupo substituinte, elas apresentam grande similaridade entre as propriedades físico-químicas, principalmente nas relacionadas a área de superfície polar topológica (em inglês: *topological polar surface area* - TPSA), massa molecular (MM), número de ligações rotacionáveis e de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, logaritmo da solubilidade em água (logS) e o logaritmo do coeficiente de partição óleo-água (log P). Sendo assim, o gráfico relacionado a biodisponibilidade foi semelhante para todas elas (Figura 33).

Figura 33. Gráfico de biodisponibilidade das 6 melhores substâncias.



Fonte: SwissADME. *Legenda: Área rosa, parâmetros de flexibilidade, lipossolubilidade, insaturação, insolubilidade em água e tamanho e polaridade dos fármacos orais já comercializados. Em vermelho, estes seis parâmetros encontrados nas substâncias triadas.*

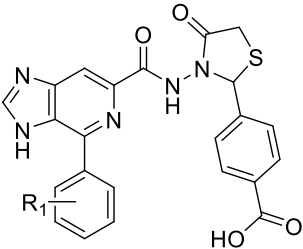
A área em rosa do gráfico representa a faixa ideal para cada propriedade, porém não indica que se os compostos ultrapassarem essa área não podem ser considerados promissores. Para que atinjam os parâmetros ideais de flexibilidade, os compostos não devem apresentar mais que 9 ligações rotacionáveis, em relação a saturação a fração de carbonos na hibridação sp^3 não deve ser inferior a 0,25, para a polaridade, o TPSA da substância deve estar entre 20 e 130 \AA^2 , em relação ao tamanho a MM deve estar entre 150 e 500 g mol^{-1} , por fim, para a solubilidade, o logS não deve ser superior a 6 e a lipossolubilidade deve estar entre -0,7 e 5.

Como a maioria das ligações dos compostos são duplas ou ciclos, os compostos não são tão flexíveis, portanto, esse descritor ficou dentro do limite, por esse motivo também, o número de insaturações é elevado, extrapolando a área limite.

O tamanho das moléculas é semelhante e ficou dentro dos parâmetros aceitáveis, bem como a solubilidade e insolubilidade dos compostos, medidos principalmente pelo logP. Como as substâncias apresentam muitos grupamentos polares era esperado que elas tivessem esses parâmetros fora da área limite.

Ao analisar os dados específicos de cada substância, percebe-se que as massas moleculares delas variam de 489,46 a 502,46 g mol⁻¹, com uma alta TPSA, de 167,44 a 190,20 Å², com 8 a 9 aceptores de hidrogênio e de 1 a 3 doadores, as ligações rotativas estão entre 6 e 7 no total, com logP de consenso entre 1,48 e 2,41, sendo pouco a moderadamente solúvel em água (Tabela 5).

Tabela 5. Propriedades físico-químicas das 6 melhores substâncias.



Classificação	Substância	R ₁	MM (g.mol ⁻¹)	Propriedades Físico-químicas					
				Lig. rotacionais	Nº de aceptores	Nº de doadores	TPSA (Å ²)	Log P	Classe de Solubilidade
1	61 (R)	4-NO ₂	502,46	7	9	1	190,20	1,5	Pouco
2	57 (R)	2,4-OH	489,46	6	9	3	184,84	1,49	Moderada
3	55 (R)	4-COO H	500,46	7	9	1	184,51	1,48	Pouco
4	54 (R)	2-OH- 5-Cl	506,90	6	8	1	167,44	2,41	Pouco
5	55 (S)	4-COO H	500,46	7	9	1	184,51	1,48	Pouco
6	61 (S)	4-NO ₂	502,46	7	9	1	190,20	1,5	Pouco

Fonte: Própria autora.

Dentre todas, a substância **57 (R)** foi a que apresentou os melhores parâmetros físico-químicos, principalmente por ter uma solubilidade em água melhor

do que os outros compostos. Este parâmetro está fortemente associado às duas hidroxilas substituintes, pois apresentam maiores possibilidades de interação com as moléculas de água. Ademais, o valor de logP para essa molécula não é o maior, e esta apresenta massa molecular menor e possui maior quantidade de átomos doadores de ligação de hidrogênio, contribuindo para maior solubilidade em água.

Os compostos selecionados apresentaram algumas violações das regras de Lipinski e Veber, o que já era esperado, principalmente, pelo tamanho elevado das estruturas e da presença dos grupamentos polares (Tabela 6). Apesar disso, eles não devem ser descartados da triagem, porque é uma análise generalizada, ou seja, não são todos os compostos comercializados que seguem todas as regras e, ainda, esta previsão permite identificar problemas previamente, que podem ser contornados, como possível precipitação em testes *in vitro*.

Tabela 6. Parâmetros de fármaco-similaridade dos compostos selecionados.

Classificação	Substância	R ₁	Lipinski	Drug-likeness		
				Tipo de violação	Veber	Tipo de violação
1	61 (R)	4-NO ₂	Sim	MM>500	Sim	TPSA>140
2	57 (R)	2,4-OH	Não	-	Sim	TPSA>140
3	55 (R)	4-COOH	Sim	MM>500	Sim	TPSA>140
4	54 (R)	2-OH-5-Cl	Sim	MM>500	Sim	TPSA>140
5	55 (S)	4-COOH	Sim	MM>500	Sim	TPSA>140
6	61 (S)	4-NO ₂	Sim	MM>500	Sim	TPSA>140

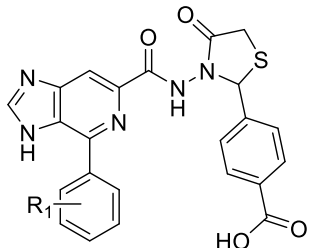
Fonte: Própria autora. *Legenda: Sim: indica algum tipo de violação à regra, não: não houve violação da regra.*

Como foi indicado anteriormente a **57 (R)** foi a substância que apresentou melhores parâmetros físico-químicos dentre as triadas, e isso interfere diretamente na sua capacidade de similaridade com os fármacos, visto que ela foi a única substância que não violou a regra de Lipinski. Apesar das outras substâncias terem violado as duas regras, foram pequenas variações como, por exemplo os enantiômeros **55 (R)** e

55 (S) que excederam apenas $0,46 \text{ g mol}^{-1}$ da massa molecular indicada (500 g mol^{-1}), ou o **61 (R)** e o **61 (S)** com massa molecular de $502,46 \text{ g mol}^{-1}$ e o **54 (R)** com $506,90 \text{ g mol}^{-1}$. A variação de TPSA foi um pouco maior, mas é justificada pela quantidade elevada de grupamentos polares das moléculas.

Os parâmetros farmacocinéticos das substâncias também foram analisados na mesma plataforma. As substâncias selecionadas apresentaram baixa absorção intestinal passiva, e isso se deve ao tamanho elevado das moléculas e a quantidade de grupamentos polares que podem impedir a passagem das substâncias pelas membranas celulares. No entanto, esta característica também é importante para que elas não atravessem a barreira hematoencefálica, o que pode indicar baixa toxicidade em nível do sistema nervoso central. Além disto, interfere na absorção pela pele, sendo a **57 (R)** a substância com $\log K_p$ mais negativo, ou seja, com menos probabilidade de permeabilidade dérmica, que pode ser explicada pelos substituintes hidroxilas, que elevam a polaridade da molécula (Tabela 7).

Tabela 7. Propriedades farmacocinéticas previstas para as substâncias selecionadas.



Farmacocinética

Classificação	Substância	R ₁	HIA	Permeação (BBB)	Log K _p (cm.s ⁻¹)	Substrato P-gp	Inibidor CYP
1	61 (R)	4-NO ₂	Baixa	Não	-7,36	Sim	CYP2C19 e CYP2C9
2	57 (R)	2,4-OH	Baixa	Não	-7,67	Não	Não
3	55 (R)	4-COOH	Baixa	Não	-7,57	Sim	CYP2C19
4	54 (R)	2-OH-5-Cl	Baixa	Não	-7,08	Não	CYP2C19 e CYP2C9
5	55 (S)	4-COOH	Baixa	Não	-7,57	Não	CYP2C19
6	61 (S)	4-NO ₂	Baixa	Não	-7,36	Sim	CYP2C19 e

Fonte: Própria autora. *Legenda: Sim: indica probabilidade positiva, não: indica probabilidade negativa.*

Com relação ao metabolismo, novamente, a **57 (R)** apresenta propriedades superiores às outras moléculas, pois é a única substância cuja previsão não indica inibição de nenhuma CYP, ou seja, provavelmente não terá problemas com administração concomitante desta substância com outras metabolizadas por estas enzimas. Somado a isto, ela não é substrato da P-gp, o que indica que o alcance ao sistema nervoso central é muito pouco provável e que sua biodisponibilidade é superior pois evita o efluxo celular na direção do lúmen intestinal, o que não ocorre com as substâncias **61 (R)**, **55 (R)** e **61 (S)** que podem atuar como substratos e podem inibir algumas CYPs. Apesar da **54 (R)** e **55 (S)** não serem substrato da P-gp, elas podem inibir enzimas do citocromo-P.

Cabe ressaltar que a maioria dos medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose é de via parenteral, com exceção da miltefosina. Assim, o metabolismo de primeira passagem é evitado, ou seja, estes medicamentos não sofrem biotransformação realizadas pelas enzimas CYP no fígado antes de serem absorvidos pelo intestino. Ademais, ainda não há grandes informações sobre as vias de metabolização e eliminação destes medicamentos na literatura, principalmente da miltefosina, o medicamento mais novo. Assim, foi realizada uma previsão destes medicamentos serem ou não substrato das isoformas da CYP a partir da plataforma ADMETLab (<http://admet.scbdd.com/>) (Tabela 8), com estes dados é possível comparar se as substâncias selecionadas poderiam interferir na biodisponibilidade dos outros fármacos utilizados no tratamento.

Tabela 8. Fármacos substratos ou não das isoformas CYP2C9 e CYP2C19.

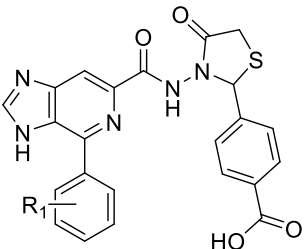
Substância	Substrato CYP2C9	Substrato CYP2C19
Paramomicina	Não	Não
Anfotericina B	Não	Não
Miltefosina	Sim	Não
Estibogluconato de sódio	Não	Não
Antimoniato de meglumina	Não	Não
Pentamidina	Não	Sim

Fonte: Própria autora. *Legenda: Sim indica probabilidade positiva, não indica probabilidade negativa de atuarem como substrato dessas isoformas de CYP.*

Sendo assim, as substâncias **61 (R)**, **54 (R)** e **61 (S)** provavelmente não poderiam ser usadas concomitantemente com a miltefosina e a pentamidina, enquanto as substâncias **55 (R)** e **55 (S)** não poderão ser usadas juntamente com a pentamidina, pois elas poderiam prejudicar a metabolização destes fármacos pelas enzimas CYP2C9 e CYP2C19.

A toxicidade das substâncias selecionadas começou a ser avaliada ainda no SwissADME através do parâmetro “PAINS”, que descreve alertas para fragmentos dos compostos promíscuos. Ou seja, são moléculas contendo subestruturas que mostram resposta potente em ensaios, independentemente da proteína alvo, resultando em um falso positivo (BAELL; HOLLOWAY, 2010). E, ainda, o parâmetro “Brenk”, que mostra fragmentos identificados como tóxicos, metabolicamente instáveis, bastante reativos ou com problemas na farmacocinética (Tabela 9) (BRENK et al., 2008).

Tabela 9. Alerta de toxicidade através dos fragmentos das estruturas das substâncias selecionadas.



Alertas estruturais				
Classificação	Substância	R₁	Alerta PAINS	Alerta Brenk
1	61 (R)	4-NO ₂	0	2, Grupo nitro e Oxigênio e nitrogênio em ligação simples
2	57 (R)	2,4-OH	0	0
3	55 (R)	4-COOH	0	0
4	54 (R)	2-OH-5-Cl	0	0
5	55 (S)	4-COOH	0	0
6	61 (S)	4-NO ₂	0	2, Grupo nitro e Oxigênio e nitrogênio em ligação simples

Fonte: Própria autora.

Apenas os dois enantiômeros contendo o grupamento nitro **61 (R)** e **61 (S)** apresentaram alerta de toxicidade, devido ao próprio grupo nitro que, de acordo com Brenk et al. (2008) tem potencial mutagênico e pela ligação simples envolvendo nitrogênio e oxigênio que pode ser facilmente quebrada. Portanto, estas moléculas precisam ser avaliadas mais profundamente em testagem *in vitro*.

Além disso, os seis compostos também passaram pela investigação de seus potenciais em causar toxicidade aguda (Tabela 10), utilizando a plataforma StopTOX. Dessa forma, foi possível fazer a previsão da toxicidade oral aguda, toxicidade dérmica aguda, toxicidade aguda por inalação, irritação e corrosão da pele, irritação ocular e corrosão e sensibilização da pele, conhecida como metodologia dos “6 pack”. Esta metodologia considera dados *in vivo* recolhidos e filtrados da literatura para cada fragmento da molécula. As agências regulatórias exigem tais estudos para a aprovação de um novo medicamento, então a previsão destes parâmetros pode facilitar também este processo (BORBA et al., 2022).

Tabela 10. Potenciais de toxicidade aguda dos compostos selecionados nos 6 compartimentos analisados.

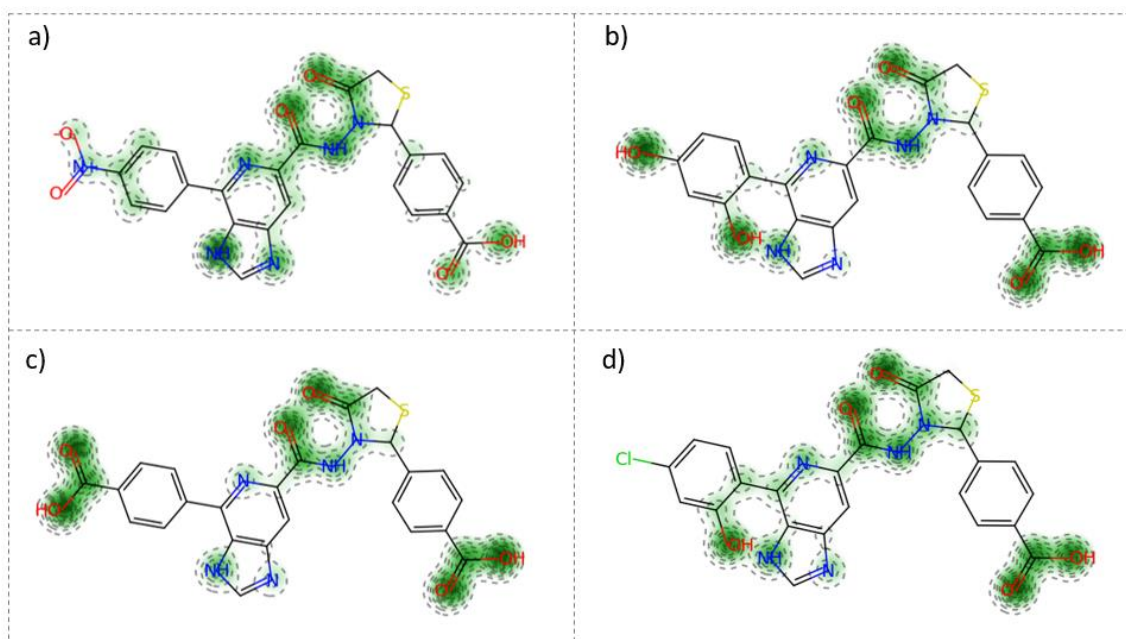
Classificação	Substância	R ₁	Toxicidade					
			Inalatória	Oral	Dérmica	Ocular	Sensibilidade na pele	Irritação e Corrosão
1	61 (R)	4-NO ₂	Não (68%)	Não (65%)	Não (67%)	Tóxico (77%)	Não (70%)	Negativa (90%)
2	57 (R)	2,4-OH	Não (77%)	Não (74%)	Não (81%)	Tóxico (83%)	Não (70%)	Negativa (80%)
3	55 (R)	4-COOH	Não (67%)	Não (62%)	Não (74%)	Tóxico (78%)	Não (80%)	Negativa (90%)
4	54 (R)	2-OH-4-Cl	Não (71%)	Não (63%)	Não (73%)	Tóxico (77%)	Não (70%)	Negativa (80%)
5	55 (S)	4-COOH	Não (67%)	Não (62%)	Não (74%)	Tóxico (78%)	Não (80%)	Negativa (90%)

6	61 (S)	4-NO ₂	Não (68%)	Não (65%)	Não (67%)	Tóxico (77%)	Não (70%)	Negativa (90%)
---	--------	-------------------	--------------	--------------	--------------	-----------------	-----------	-------------------

Fonte: Próprio autor. *Legenda: porcentagem em parêntese indica a confiabilidade de cada resultado.*

Nenhuma das moléculas apresentaram alertas de toxicidade aguda oral, o que é um excelente indicativo de que futuramente estes compostos podem ser avaliados para utilização oral. Ao analisar os fragmentos de cada uma delas, percebe-se as contribuições positivas dos grupamentos polares e ainda, nenhum dos substituintes, apresentou contribuições negativas, porém as contribuições positivas do grupo nitro da **61 (R)** e **61 (S)** (Figura 34 – a) e do substituinte cloro da **55 (S)** (Figura 34 – c) foram muito menores que as dos outros substituintes, ou seja, estas moléculas podem ter uma toxicidade um pouco maior que as outras.

Figura 34. Análise por fragmentos da toxicidade aguda oral das substâncias selecionadas.

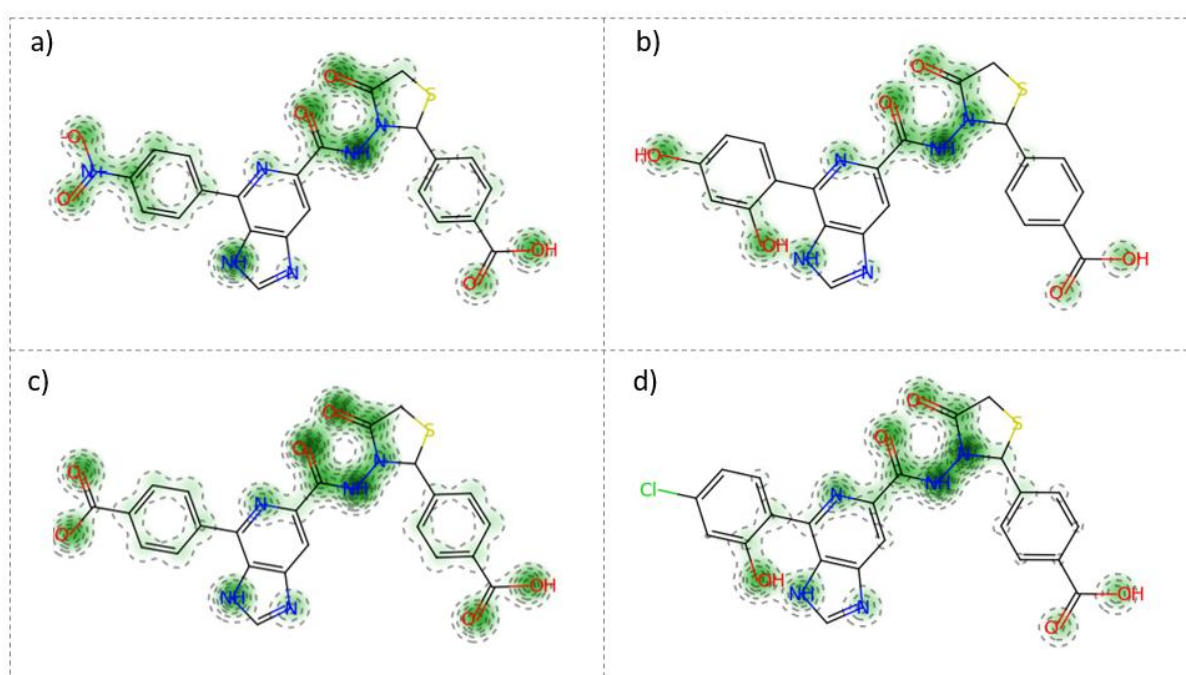


Fonte: Adaptado de StopTOX. *Legenda: Em verde: indicação das contribuições positivas para toxicidade.*

Já em relação aos alertas de toxicidade aguda dérmica, o grupo nitro das substâncias **61 (R)** e **61 (S)** (Figura 35 – a) é o grupamento que mais contribui de forma positiva, enquanto a **55 (S)** (Figura 35 – d) continua sendo a substância com

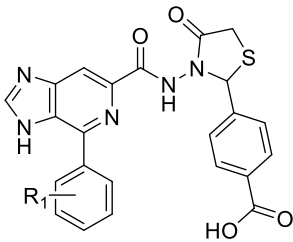
menor contribuição positiva. Sendo assim, a via dérmica pode trazer muito mais benefício aos compostos **61 (R)** e **61 (S)** do que a via oral, pois aparentemente estas moléculas apresentam menor risco de toxicidade para a via dérmica. A utilização da via dérmica pode ser interessante para o tratamento de leishmaniose cutânea, que normalmente, é causada pela espécie *L. amazonensis*, foco desse trabalho (PACE, 2014).

Figura 35. Análise por fragmentos da toxicidade aguda dérmica das substâncias selecionadas.



Fonte: Adaptado de StopTOX. Legenda: Em verde: indicação das contribuições positivas.

Por fim, como a intenção do trabalho é a identificação dos compostos mais promissores e a comprovação de sua atividade através de testagens *in vitro*, as substâncias selecionadas precisam passar pela etapa de síntese. Sendo assim foi analisada na plataforma SwissADME a acessibilidade sintética (AS) destas substâncias (Tabela 11).

Tabela 11. Acessibilidade sintética das substâncias selecionadas.


Classificação	Substância	R ₁	Acessibilidade sintética
1	61 (<i>R</i>)	4-NO ₂	4,08
2	57 (<i>R</i>)	2,4-OH	4,11
3	55 (<i>R</i>)	4-COOH	4,08
4	54 (<i>R</i>)	2-OH-5-Cl	4,01
5	55 (<i>S</i>)	4-COOH	4,08
6	61 (<i>S</i>)	4-NO ₂	4,08

Fonte: Própria autora.

A acessibilidade sintética é baseada em fragmentos das moléculas e na disponibilidade comercial deles, sendo os mais frequentemente encontrados, aqueles com alta acessibilidade e os fragmentos mais raros, baixa. Também é levado em consideração o tamanho e a complexidade, como os centros quirais e os macrocíclos, sendo por fim, o resultado variando de 1 (muito fácil) a 10 (muito difícil).

Com isso pode-se perceber que as substâncias no geral apresentam AS parecidas e não tão fácil devido ao seu tamanho e a existência de um centro quiral. A substância de menor acessibilidade sintética é a **57 (*R*)**, provavelmente pelas duas hidroxilas presentes no anel aromático que podem dificultar a ativação de algum outro substituinte necessário. Apesar disto, esta substância foi a que apresentou os melhores resultados em relação as análises ADMET, sendo assim, sua síntese é de extrema importância.

4 METODOLOGIA

4.1 PREPARAÇÃO DA ESTRUTURA DO ALVO MOLECULAR (LAARG)

Para a realização da docagem molecular, o alvo LaARG, obtido por homologia, foi devidamente preparado utilizando o programa Discovery Studio Visualizer (BIOVIA, Dassault Systèmes, v. 2021). As coordenadas utilizadas como referência no docagem molecular foram extraídas a partir da identificação do centrômero entre os íons manganês (Mn^{+2}) da cadeia **A**, sendo X: 15,586500 Y: -14,585500 Z: -3,3,909500. As outras cadeias (**B** e **C**) foram mantidas.

4.2 PREPARAÇÃO DOS LIGANTES

Os 100 ligantes e seus possíveis tautômeros e enantiômeros foram desenhados em 3D no MarvinSketch (Chemaxon, v.19.21.0). Em seguida, verificou-se o estado de ionização das estruturas em pH 7,4, com o mesmo software. As estruturas foram minimizadas energeticamente em campo de força *Merck Molecular Force Field* (MMFF94) no Chemdraw 3D (*Cambridge Computer Corporation*, v. 20.0) e foram salvas no formato SYBYL (*.mol2) para serem utilizadas na docagem molecular.

4.3 DOCAGEM MOLECULAR DAS SUBSTÂNCIAS PROPOSTAS

Utilizando o programa GOLD (*The Cambridge Crystallographic Data Centre*, v.2020.3.0), a estrutura tridimensional da LaARG obtida por homologia, teve os átomos de hidrogênio polares adicionados (7335). O centro do raio do sítio ativo foi definido como sendo o ponto médio entre os Mn^{2+} [Mn331 e Mn332], X: 13,076882 Y: -10,909235 Z: -4,977118, enquanto o raio escolhido para a análise dos ligantes foi de 20 Å, totalizando um diâmetro de encaixe de 40 Å em relação ao ponto selecionado. A docagem molecular foi realizada no modo rígido para a proteína e flexível para os ligantes, com 50 corridas interativas, nas quatro funções de pontuação disponíveis no programa GOLD (GoldScore, ChemScore, CHEMPLP e ASP), utilizando as demais configurações definidas por padrão do programa nos cálculos.

4.3.1 Metodologia de classificação e validação do protocolo de docagem molecular

A metodologia de escala, representada na Equação 1 (WIGGERS et al., 2011), foi utilizada para a seleção de 10% das 100 substâncias triadas, totalizando 10 substâncias.

Equação 1. Cálculo para classificação das substâncias pela metodologia de escala.

$$Escala = \frac{(X - Xmin)}{(Xmax - Xmin)}$$

Legenda: X é o fitness score da substância na função, Xmax é o maior fitness score alcançado na função, Xmin é o menor fitness score alcançado na função.

A validação do protocolo de docagem molecular foi realizada por consenso, que foi estabelecido com base no cálculo dos valores de desvio quadrático médio (RMSD) das poses melhores classificadas em cada função, sendo 4 poses para cada ligante, analisadas aos pares de acordo com as função (Chemscore vs ChemPLP, Chemscore vs Goldscore, Chemscore vs ASP, ChemPLP vs Goldscore, ChemPLP vs ASP, Goldscore vs ASP). O cálculo de RMSD foi realizado pelo programa Discovery Studio (Dassault systemes, v.2021) e aquelas que obtiveram valores de RMSD menores do que 2 Å foram selecionadas para análise das interações.

4.3.2 Análise dos resultados das docagens moleculares

A análise das interações entre as substâncias e a LaARG foi realizada o *software* Discovery Studio (Dassault systemes, v.2021). As imagens tridimensionais dos complexos foram geradas no Pymol (Schrödinger, v. 2.5).

4.4 ANÁLISE *IN SILICO* DAS PROPRIEDADES DE ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO E TOXICIDADE (ADMET)

Foi realizado o estudo *in silico* dos parâmetros farmacocinéticos teóricos das estruturas dos ligantes mais promissores. A biodisponibilidade oral, absorção intestinal, distribuição e metabolismo, assim como os parâmetros fármaco-

similaridade e o emprego dos filtros de Lipinsk e Veber, foram preditas utilizando a plataforma online SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) e o ADMETlab (<http://admet.scbdd.com/>), enquanto que a toxicidade aguda foi predita utilizando a metodologia de “6-pack acute toxicity tests”, empregada pela plataforma STopTOX (<https://stoptox.mml.unc.edu/>), ou seja, foram analisadas a toxicidade aguda em 6 compartimentos do organismo, a toxicidade oral e inalatória, além da irritação e corrosão ocular e ainda a toxicidade, irritação, corrosão e sensibilidade dérmica.

5 CONCLUSÃO

Este estudo cumpriu seu objetivo ao selecionar, entre 100 compostos, aqueles com maior potencial terapêutico, fornecendo ainda, uma base para futuros desenvolvimentos. A análise das modificações realizadas nos compostos planejados revelou que os derivados contendo núcleos imidazopiridinas hibridizadas com a **LMd47** apresentaram um desempenho superior, destacando-se por suas interações mais favoráveis com o alvo molecular. Notavelmente, substituintes polares, como o grupo nitro e as hidroxilas, foram identificados como contribuintes significativos para potencializar essas interações, evidenciando a importância dessas modificações na melhoria do desempenho dos compostos.

Assim, as substâncias **61 (R)** e **57 (R)** se sobressaíram por suas maiores interações com o alvo LaARG, principalmente devido à estes substituintes. Adicionalmente a substância **57 (R)** demonstrou-se superior nas análises ADMET e de fármaco-similaridade, indicando seu potencial como um possível inibidor farmacologicamente viável para o tratamento da Leishmaniose.

Ambas substâncias são inéditas na literatura, o que contribui significativamente para o avanço na busca por terapias mais eficazes, já que a diversificação do arsenal terapêutico disponível é fundamental para enfrentar os desafios associados ao tratamento dessa doença.

Como perspectivas, faz-se necessária a comprovação da atividade dos compostos selecionados a partir de testagem *in vitro* de inibição da LaARG e testes fenotípicos. Para isso, a síntese destas substâncias é indispensável, processo este que já se encontra em andamento.

6 REFERÊNCIAS

BAELL, J. B.; HOLLOWAY, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2719–2740, 8 abr. 2010.

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1172–1180, dez. 2002.

BORBA, J. V. B. et al. STopTox: An *in silico* Alternative to Animal Testing for Acute Systemic and Topical Toxicity. **Environmental Health Perspectives**, v. 130, n. 2, 1 fev. 2022.

BRENK, R. et al. Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. **ChemMedChem**, v. 3, n. 3, p. 435–444, 14 mar. 2008.

CAMARGO, P. G. et al. Thiohydantoinas as anti-leishmanial agents: *in vitro* biological evaluation and multi-target investigation by molecular docking studies. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 7, p. 3213–3222, 2022.

CLEMENTE, G. S. et al. Arginase as a potential biomarker of disease progression: A molecular imaging perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, MDPI AG, 1 ago. 2020.

COLOTTI, G.; ILARI, A. **Polyamine metabolism in Leishmania: From arginine to trypanothione**. **Amino Acids**, fev. 2011.

COME, J. A. A. DOS S. S. et al. *In Vitro* and *In Silico* Analyses of New Cinnamid and Rosmarinic Acid-Derived Compounds Biosynthesized in *Escherichia coli* as *Leishmania amazonensis* Arginase Inhibitors. **Pathogens**, v. 11, n. 9, 1 set. 2022.

CRIZANTO DE LIMA, E. et al. Phenylhydrazides as inhibitors of *Leishmania amazonensis* arginase and antileishmanial activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 17, p. 3853–3859, 1 set. 2019.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, 3 mar. 2017.

D'ANTONIO, E. L. et al. Crystal structure of arginase from *Leishmania mexicana* and implications for the inhibition of polyamine biosynthesis in parasitic infections. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 535, n. 2, p. 163–176, jul. 2013.

DA SILVA, E. R. et al. Cinnamides target *Leishmania amazonensis* arginase selectively. **Molecules**, v. 25, n. 22, 1 nov. 2020.

DIAS, L. C. et al. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1552–1556, 2013.

DI COSTANZO, L. et al. Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 37, p. 13058–13063, 13 set. 2005.

FEITOSA, L. M. et al. New pyrazolopyrimidine derivatives as *Leishmania amazonensis* arginase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 14, p. 3061–3069, 15 jul. 2019.

GUPTA, L. et al. Synthesis and biological evaluation of new [1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-ylthio-1,3,5-triazines and [1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-ylthio-pyrimidines against *Leishmania donovani*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2359–2365, jun. 2010.

KIER, L. B.; HALL, L. H. Bioisosterism: Quantitation of Structure and Property Effects. **Chemistry & Biodiversity**, v. 1, n. 1, p. 138–151, jan. 2004.

LIPINSKI, C. A. et al. **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development q settings** *Advanced Drug Delivery Reviews*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/drugdeliv>.

MACALINO, S. J. Y. et al. **Role of computer-aided drug design in modern drug discovery**. *Archives of Pharmacal Research*. Pharmaceutical Society of Korea, 22 set. 2015.

MANDEL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 303–304, maio 2010.

MAQUIAVELI, C. C. et al. Verbascoside Inhibits Promastigote Growth and Arginase Activity of *Leishmania amazonensis*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 5, p. 1459–1463, 27 maio 2016.

MARTÍN-MONTES, Á. et al. The Bioactivity of Xylene, Pyridine, and Pyrazole Aza Macrocycles against Three Representative *Leishmania* Species. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, 1 mar. 2023.

MENG, X.-Y. et al. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 1 jun. 2011. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. **Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://iris.paho.org/>>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Situação epidemiológica Leishmaniose cutânea e mucosa**. [s.l: s.n.].

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.paho.org>.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 1 nov. 2014.

ROSY P, J. et al. GREEN SYNTHESIS, BIOLOGICAL EVALUATION AND DFT CALCULATIONS OF THIAZOLIDINONE DERIVATIVES – A REVIEW. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, p. 10–20, 25 nov. 2019.

SCHADICH, E. et al. Assessing different thiazolidine and thiazole based compounds as antileishmanial scaffolds. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 23, 1 dez. 2020.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. **Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. Journal of Infection and Chemotherapy**. Springer Japan, 2004.

TUCCINARDI, T. et al. Extensive consensus docking evaluation for ligand pose prediction and virtual screening studies. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 10, p. 2980–2986, 27 out. 2014.

VAN VOORHIS, W. C. Therapy and Prophylaxis of Systemic Protozoan Infections. **Drugs**, v. 40, n. 2, p. 176–202, ago. 1990.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 6 jun. 2002.

VIEGAS-JUNIOR, C. et al. **Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes Current Medicinal Chemistry**. [s.l: s.n.].

WIGGERS, H. J. et al. Integration of ligand- and target-based virtual screening for the discovery of cruzain inhibitors. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 6–7, p. 565–578, 2011.

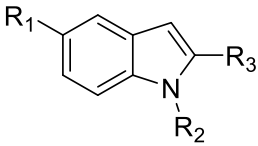
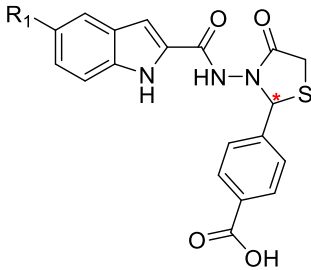
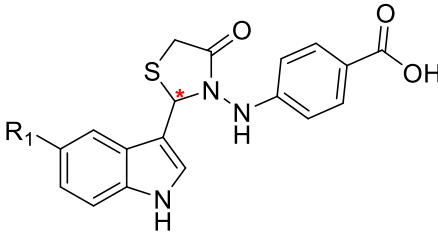
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>, acesso em: 05/01/2023

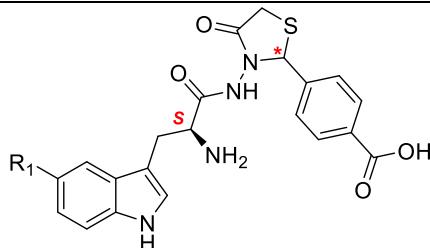
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Status of endemicity of cutaneous and visceral leishmaniasis: 2022. 2023. Disponível em: <https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html> acesso em: 10/01/2023

APÊNDICES

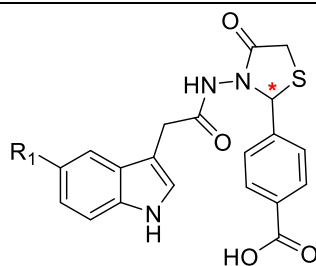
APÊNDICE A

Tabela 1. Identificação das 104 substâncias planejadas.

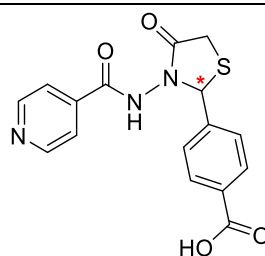
Substância	Classe	Enantiômero	R ₁	R ₂	R ₃
					
1	LMed27 (indol)	-	H	H	4-COOHPh
2	LMed36 (indol)	-	Cl	H	4-COOHPh
3	Indol	-	F	H	4-COOHPh
4	Indol	-	H	H	4-NO ₂ Ph
5	Indol	-	Cl	H	4-NO ₂ Ph
6	Indol	-	F	H	4-NO ₂ Ph
7	Indol	-	H	Boc	4-NO ₂ Ph
8	Indol	-	Cl	Boc	4-NO ₂ Ph
9	Indol	-	F	Boc	4-NO ₂ Ph
					
10 (R)	3- Indol-Tiazolidinona	10 (S)	H	-	-
11 (R)	3- Indol-Tiazolidinona	11 (S)	Cl	-	-
12 (R)	3- Indol-Tiazolidinona	12 (S)	F	-	-
					
13 (R)	2-Indol-Tiazolidinona	13 (S)	H	-	-
14 (R)	2-Indol-Tiazolidinona	14 (S)	Cl	-	-
15 (R)	2-Indol-Tiazolidinona	15 (S)	F	-	-



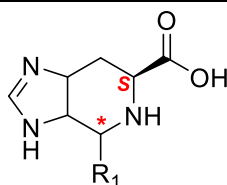
Substância	Classe	Enantiômero	R ₁	R ₂	R ₃
16 (S,R)	Triptofano-Tiazolidinona	16 (S,S)	H	-	-



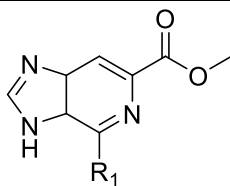
17 (R)	Ácido indol acético-Tiazolidinona	17 (S)	H	-	-
---------------	-----------------------------------	---------------	---	---	---



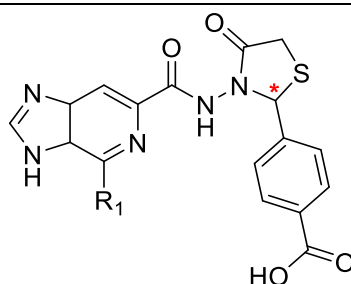
18 (R)	Pirimidina-Tiazolidinona	18 (S)	-	-	-
---------------	--------------------------	---------------	---	---	---



19 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	19 (S,S)	CH ₃	-	-
20 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	20 (S,S)	Ph	-	-
21 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	21 (S,S)	4-BrPh	-	-
22 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	22 (S,S)	2-OH-5-BrPh	-	-
23 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	23 (S,S)	4-ClPh	-	-
24 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	24 (S,S)	2-OH-5-ClPh	-	-
25 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	25 (S,S)	4-COOHPh	-	-
26 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	26 (S,S)	4-N(CH ₃) ₂ Ph	-	-
27 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	27 (S,S)	2,4-OHPh	-	-
28 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	28 (S,S)	4-FPh	-	-
29 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	29 (S,S)	4-OHPh	-	-
30 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	30 (S,S)	(CH ₃) ₂	-	-
31 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	31 (S,S)	4-NO ₂ Ph	-	-
32 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	32 (S,S)	4-MePh	-	-
33 (S,R)	Tetraidroimidazopiridina	33 (S,S)	2,3,4-OHPh	-	-

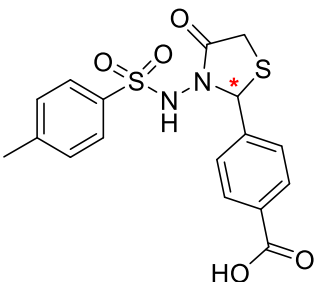


34	Imidazopiridinas	-	CH ₃	-	-
35	Imidazopiridinas	-	Ph	-	-
36	Imidazopiridinas	-	4-BrPh	-	-
37	Imidazopiridinas	-	2-OH-5-BrPh	-	-
38	Imidazopiridinas	-	4-ClPh	-	-
39	Imidazopiridinas	-	2-OH-5-ClPh	-	-
40	Imidazopiridinas	-	4-COOHPh	-	-
41	Imidazopiridinas	-	4-N(CH ₃) ₂ Ph	-	-
42	Imidazopiridinas	-	2,4-OHPh	-	-
43	Imidazopiridinas	-	4-FPh	-	-
44	Imidazopiridinas	-	4-OHPh	-	-
45	Imidazopiridinas	-	(CH ₃) ₂	-	-
46	Imidazopiridinas	-	4-NO ₂ Ph	-	-
47	Imidazopiridinas	-	4-MePh	-	-
48	Imidazopiridinas	-	2,3,4-OHPh	-	-



49 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	49 (R)	CH ₃	-	-
50 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	50 (R)	Ph	-	-
51 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	51 (R)	4-BrPh	-	-
52 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	52 (R)	2-OH-5-BrPh	-	-
53 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	53 (R)	4-ClPh	-	-
54 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	54 (R)	2-OH-5-ClPh	-	-
55 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	55 (R)	4-COOHPh	-	-
56 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	56 (R)	4-N(CH ₃) ₂ Ph	-	-
57 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	57 (R)	2,4-OHPh	-	-
58 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	58 (R)	4-FPh	-	-
59 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	59 (R)	4-OHPh	-	-

	Tiazolidinona				
60 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	60 (R)	(CH ₃) ₂	-	-
61 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	61 (R)	4-NO ₂ Ph	-	-
62 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	62 (R)	4-MePh	-	-
63 (S)	Imidazopiridinas-Tiazolidinona	63 (R)	2,3,4-OHPH	-	-



64 (R)	LMed 47	64 (S)	-	-	-
---------------	---------	---------------	---	---	---

Fonte: Própria autora.

Tabela 2. Substâncias selecionadas para LmARG

Classificação	Substância
1	52 (R)
2	40
3	58 (R)
4	12 (R)
5	46
6	56 (S)
7	51 (R)
8	93 (R)
9	18 (R)
10	5

Fonte: Própria autora.