



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CRISTIAN VICSON GOMES PINHEIRO

**ATIVIDADE ANTI-*Leishmania spp* in silico E in vitro DE OXADIAZÓIS
SINTÉTICOS**

FORTALEZA – CEARÁ

2024

CRISTIAN VICSON GOMES PINHEIRO

ATIVIDADE ANTI-*Leishmania spp* *in silico* E *in vitro* DE OXADIAZÓIS
SINTÉTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para o título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Biologia para a saúde.

Orientador: Roberto Nicolete.

FORTALEZA – CEARÁ

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G613a Gomes Pinheiro, Cristian Vicson.
ATIVIDADE ANTI-Leishmania spp in silico E in vitro DE OXADIAZÓIS SINTÉTICOS / Cristian
Vicson Gomes Pinheiro. – 2024.
90 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Roberto Nicolete.

1. Oxadiazol. 2. Leishmaniose. 3. Inibidores da Colinesterase. 4. Ação Antioxidante. I. Título.
CDD 615

CRISTIAN VICSON GOMES PINHEIRO

ATIVIDADE ANTI-*Leishmania spp in silico* E *in vitro* DE OXADIAZÓIS
SINTÉTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial ao título de mestre em ciências farmacêuticas.

Aprovada em: _____

BANCAEXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Nicolete (Orientador)
(Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz Ceará)

Profa. Dra. Clarissa Romero Teixeira
(Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz Ceará)

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio
(Universidade Federal do Ceará – UFC)

AGRADECIMENTOS

Qual o sentido da vida? Para responder essa questão tive que solicitar auxílio de alguns amigos que compartilharam suas visões, me auxiliando a chegar a uma conclusão.

Das respostas vieram desde um “5’-3’” até , “sentir”, “fazer o bem”, “servir”, que basicamente nos leva a uma sensação pura de felicidade. Adentrando um pouco mais sobre essas definições recorri a um filósofo chamado de Aristóteles que atribui a felicidade a aquilo que todo ser humano busca e em uma de suas definições de felicidade, a que mais me brilha os olhos é sua definição contemplativa da felicidade, onde o ser humano entende que a felicidade está em si mesmo e nenhuma ferramenta ou bem é o suficiente para alcançá-la.

Agora falando do eu, sinto-me contemplado quando ganho um abraço da minha mãe, dou umas boas risadas com meus amigos, ouço um raro “eu te amo” da minha amada, o que me coloca no ponto final dessa definição: Faço o que faço para ter as pessoas que amo feliz ao meu lado, uma vez que minha felicidade depende exclusivamente da felicidade daqueles que amo.

Então agradeço a todos meus familiares: Minha mãe Gilmara que sempre acreditou no meu potencial. Grato aos Meus irmãos Victor e Cristiano, além da Janaína e Diego que os considero grande irmãos, minhas tias e tios, primos e primas, meus avós e ao meu pai que não estão mais presentes nesse plano.

Agradeço a minha namorada Gabriele que me ensinou a ter muita paciência com ela, agora aplico isso no meu dia a dia. A cada dia que passo eu a amo cada vez mais.

Agradeço a todos meus amigos da Panela que são mais de 10 anos de amizade e algo me diz que isso é pra toda minha existência: André, Will, Felipe, Sérgio e Rodrigo.

Sou grato por todos os inocentes que são os mais chatos, peculiares e engraçados que já convivi: Ludson, Héder, Sérgio paizão, Felipe Malvado, Diêgo, Erivelton, Jaime, Marevandro, Miau, Johnny de Lente, Guilherme, Fabrício, Messi, Chama o Roger... Dentre outros.

Sou muito grato pelo meu orientador e amigo Roberto Nicolete, que só tem um defeito, ser corinthiano, de resto só tenho aprendido e evoluindo constantemente com ele.

Sou grato pelos meus companheiros de trabalho da Fiocruz: Yasmin, Gabriel, Heverton, Vanessa, JP, Marlos, Juliana.

Sou grato pelos meus amigos da graduação André Cardeal, Marcelo, Lucas, Larissa, Giulia, Juan, Dyllan, Rayanne, Raisal e Matheus.

Sou grato por alguns professores que deixamos de ter uma relação de professor-aluno e virou amizade: Eduardo Ribeiro, Ramon, Max, Carol Aquino.

Sou grato aos membros da Banca que somam e somaram bastante para o desenvolvimento desse trabalho e desse aluno que vos escreve: Ramon, Eduardo, Clarissa e Tiago.

RESUMO

Globalmente, há 1 bilhão de pessoas em áreas endêmicas e mais de 12 milhões de pessoas infectadas com a leishmaniose. Contudo, é uma doença negligenciada, uma vez que os países acometidos são subdesenvolvidos e os tratamentos disponíveis são antigos, tóxicos, necessitando de um longo período de administração paraenteral e com eficiência limitada. O anel heterocíclico oxadiazol tem diversas atividades biológicas já descritas na literatura, incluindo atividade leishmanicida tornando-as candidatas alvo de mais estudos. Foi feito um estudo prospectivo de caráter científico e tecnológico. Realizou-se uma revisão onde foram observados oito estudos que utilizaram moléculas de oxadiazol com um potencial efeito leishmanicida em diversas cepas (*Leishmania infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*), destacando que a atividade leishmanicida pode estar relacionada com inibição de enzimas importantes (GAPDH, Cisteíno protease e Pteridina Redutase) ou com o aumento de óxido nítrico pelas células infectadas com o parasito. Mesmo assim, há somente duas patentes utilizando oxadiazóis para tratar leishmaniose, o que evidencia a dificuldade da transferência de tecnologia da pesquisa para a indústria. Por previsão farmacocimética ADME/TOX, demonstramos que as moléculas possuem boa absorção intestinal (Todas > 90%), tem propriedades insolúveis em água e um alto resultado no quesito de permeabilidade em Caco2 (Alto > 0,90 logPapp10⁻⁶cm/s), sendo possível inferir que os oxadiazóis poderiam ser administrados de forma oral. Ademais, apenas duas moléculas derivadas de oxadiazóis (2b e 2f) apresentaram hepatotoxicidade. *In vitro* os oxadiazóis apresentaram atividade inibitória do radical DPPH relevante demonstrando uma potencial atividade antioxidante, sendo que as moléculas 2g, 2h e 2i apresentaram respectivamente o resultado de IC₅₀ de 6,90 µg/mL, 8,76 µg/mL e 12,10 µg/mL. Em relação a um possível mecanismo de ação leishmanicida, as moléculas apresentaram-se como inibidoras da enzima acetilcolinesterase, importante para a formação da membrana dos parasitos que possuem colina, entretanto não demonstraram inibição da enzima Tripanotona Redutase nas concentrações atribuídas. Por fim, as moléculas estudadas apresentaram atividade leishmanicida relevante em diversas concentrações nas cepas de *L. braziliensis* (2b com IC₅₀= 180.8 µM) e *L. infantum* (2a, 2g, 2i com IC₅₀ de 17,95 µM, 88,83 µM e 30,86 µM, respectivamente). Com o teste de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 pode-se constatar atividade em destaque para as moléculas 2a e 2i com valores de CC₅₀ de 558 µM e 485,5 µM, e índice de seletividade (SI) de 31,08 e 17,86, respectivamente. Esses resultados tornaram os oxadiazóis 2a e 2i atrativos para a nanoencapsulação, e foi possível obter nanopartículas com um tamanho médio de 155.5nm e 127.7nm respectivamente. Baseado no que foram supracitados, os oxadiazóis tornam-se promissores para estudos de maior complexidade, abrindo perspectivas para agentes leishmanicidas mais seletivos e de menor toxicidade.

Palavras-chave: Oxadiazol, Leishmaniose, Inibidores da colinesterase, Ação antioxidante.

ABSTRACT

Globally, there are 1 billion people in endemic areas, with over 12 million people infected with leishmaniasis. However, it is a neglected disease, as the affected countries are underdeveloped and the available treatments are old, toxic, requiring a long period of parenteral administration and with limited efficacy. The oxadiazole heterocyclic ring has several biological activities already described in the literature, including leishmanicidal activity, making them candidates for further studies. A prospective study of scientific and technological nature was conducted. A review was conducted where eight studies were observed using oxadiazole molecules with potential leishmanicidal effects on various strains (*Leishmania infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*), highlighting that leishmanicidal activity may be related to the inhibition of important enzymes (GAPDH, Cysteine protease, and Pteridine Reductase) or with the increase in nitric oxide by cells infected with the parasite. However, there are only two patents using oxadiazoles to treat leishmaniasis, which highlights the difficulty in transferring technology from research to industry. Through pharmacokinetic ADME/TOX predictions, we demonstrate that the molecules have good intestinal absorption (All > 90%), have water-insoluble properties, and a high result in terms of permeability in Caco2 (High > 0.90 logPapp10-6cm/s), suggesting that oxadiazoles could be administered orally. Moreover, only two oxadiazole-derived molecules (2b and 2f) showed hepatotoxicity. In vitro, oxadiazoles showed relevant inhibitory activity of the DPPH radical, demonstrating potential antioxidant activity, with molecules 2g, 2h, and 2i respectively showing IC₅₀ results of 6.90 µg/mL, 8.76 µg/mL, and 12.10 µg/mL. Regarding a possible leishmanicidal mechanism of action, the molecules were found to be inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase, important for the formation of parasites' membranes containing choline, however, they did not demonstrate inhibition of Tripanotiona Reductase enzyme at the attributed concentrations. Finally, the studied molecules showed relevant leishmanicidal activity at various concentrations in the strains of *L. braziliensis* (2b with IC₅₀= 180.8 µM) and *L. infantum* (2a, 2g, 2i with IC₅₀ of 17.95 µM, 88.83 µM, and 30.86 µM, respectively). With cytotoxicity testing in RAW 264.7 macrophages, highlighted activity was observed for molecules 2a and 2i with CC₅₀ values of 558 µM and 485.5 µM, and selectivity index (SI) of 31.08 and 17.86, respectively. These results made oxadiazoles 2a and 2i attractive for nanoencapsulation, and it was possible to obtain nanoparticles with an average size of 155.5nm and 127.7nm respectively. Based on the aforementioned, oxadiazoles become promising for more complex studies, opening perspectives for more selective and less toxic leishmanicidal agents.

Keywords: Oxadiazole, Leishmaniasis, Acetylcholinesterase inhibitors, Antioxidant action.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição Global de casos de Leishmaniose cutânea e mucocutânea.....	18
Figura 2 - Distribuição Global de Leishmaniose Visceral.....	18
Figura 3 - Organização morfológica das formas promastigotas e amastigotas do parasito <i>Leishmania</i> spp.....	20
Figura 4 - Etapas do ciclo evolutivo de transmissão de <i>Leishmania</i> spp no interior do inseto e no mamífero hospedeiro.....	22
Figura 5 - Vírus RNA da <i>Leishmania</i> (VRL) exacerbando a infecção.....	25
Figura 6 - Estrutura química dos antimoniais pentavalentes, Antimoniato de Meglumina e Estiboglucato.....	27
Figura 7 - Potenciais alvos farmacológicos.....	33
Figura 8 - Isômeros de oxadiazóis.....	36
Figura 9 - Estrutura química da Oxolamina.....	37
Figura 10 - Estratégia metodológica realizada no estudo.....	39
Figura 11 - Oxadiazóis sintetizados e utilizados para o estudo.....	40
Figura 12 - Ensaio de viabilidade celular.....	45
Figura 13 - Avaliação da atividade leishmanicida dos oxadiazóis.....	46
Figura 14 - Acoplamento molecular e interação entre as moléculas e a proteína acetilcolinesterase.....	59
Figura 15 - Mapa farmacotrópico das interações presentes entre as moléculas e a acetilcolinesterase.....	59
Figura 16 - Ação inibitória das moléculas 2a e 2i sobre a tripanotona redutase.....	62
Figura 17 - Ação leishmanicida em promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	62
Figura 18 - Ação leishmanicida em promastigotas de <i>L. infantum</i> testadas pelo método de contagem direta com as moléculas 2a, 2g e 2i.....	63
Figura 19 - Efeito citotóxico dos oxadiazóis 2a, 2g, 2h e 2i em macrófagos RAW.....	64
Figura 20 - Propriedades físico-químicas das nanopartículas contendo os oxadiazóis..	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de artigos de acordo com os descritores utilizados na base de dados Web of Science de 1951 a 2024.....	50
Tabela 2 - Artigos relacionados com os descritores “therapeutic*” AND “oxadiazole*” AND “leishmania*”	50
Tabela 3 - Número de patentes encontradas de acordo com os descritores utilizados encontrados na base de dados Derwent Innovations Index de 1951 a 2024.....	52
Tabela 4 - Valores dos parâmetros ADME/TOX dos oxadiazóis (2a, 2b e 2c) gerados pelo servidor pkCSM Pharmacokinetics.....	53
Tabela 5 - Valores dos parâmetros ADME/TOX dos oxadiazóis (2d, 2f) e o fármaco de referência (ANF B) gerados pelo servidor pkCSM Pharmacokinetics.....	55
Tabela 6 - Valores dos parâmetros ADME/TOX dos oxadiazóis (2g, 2h e 2i) gerados pelo servidor pkCSM Pharmacokinetics.....	57
Tabela 7 - Energia de ligação e RMSD da acetilcolinesterase em acoplamento com as moléculas.....	60
Tabela 8 - Efeito antioxidante dos oxadiazóis (2g, 2h e 2i) frente aos radicais DPPH (2,2-difenil1-picrilhidrazi).....	61
Tabela 9 - Efeito inibitório da enzima Acetilcolinesterase (AChE) por parte dos oxadiazóis (2g, 2h e 2i).....	61
Tabela 10 - Dados físico-químicos das nanopartículas de PLGA.....	65

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

3-BrPA	3-bromopiruvato (3-BrPA)
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
ADME/TOX	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
ANF-B	Anfotericina B
ARN	Análise e Rastreamento de Nanopartículas
ATP	Adenosina trifosfato
BBB	Barreira Hematoencefálica
BOD	Demanda Bioquímica de Oxignio
BSA	Albumina Sérica Bovina
CC ₅₀	Concentração capaz de causar citotoxicidade em 50% das células
CDC	<i>Center For Disease Control and Prevotion</i>
CP	Cisteíno Protease
CYP	Citocromo P450
DII	<i>Derwent Innovation Index</i>
DMEN	<i>Dulbecoo's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPML	Departamento de Patologia e Medicina Legal
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB	5,5'– ditiobis-[2-nitrobenzóico]
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EPM	Erro Padrão Médio
ERO	Espécies Reativas de Oxignio
FDA	<i>Food andDrugAdministration</i>
FRR	Taxa de Vazão
GADPH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GSP	Gel Secretado por Promastigotas
hERG	<i>humanether-a-go-gorelated</i>

IC ₅₀	Concentração capaz de inibir o crescimento de 50% de promastigotas
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPC	Código Internacional de Patente
IRF	Fator Regulador de Interferon
LC	Leishmaniose Cutânea
LLC-MK2	Células Epiteliais de Rim de Macaco Rhesus
LV	Leishmaniose Visceral
MA	Antimoniato de Meglumina
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide
MWCO	Molecular weightcutof
NaCl	Cloreto de Sódio
NF	Fator Nuclear
NLR	Receptor Nod-Like
NO	Óxido Nítrico
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógeno
PH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Porcentagem de Inibição
PLGA	poli (ácido lático-co-glicólico)
PVA	Poly (vinylalcohol)
RNA	Ácido Ribonucléico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro Bovino Fetal

SI	Índice de Seletividade
SMILES	<i>Simplified Molecular Input Line Entry Specification</i>
SSG	Estiboglocunato de Sódio
VRL	Vírus RNA da <i>Leishmania</i>
TLR	Receptor Toll-Like
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRF	Taxa de Vazão Total
UFC	Universidade Federal do Ceará

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
\leq	Menor ou igual
<	Menor
>	Maior
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
μ l	Microlitros
μ M	Micromolar
mg	Miligramma
ml	Mililitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minutos
β	Beta
α	Alfa
mg	Miligramma
XG	Força Centrífuga Relativa
nm	Nanômetro
mv	milivolts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Histórico e epidemiologia da Leishmaniose.....	18
2.2 Agente etiológico, vetor e ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	19
2.3 Fisiopatologia da Leishmaniose.....	23
2.4 Tratamentos para Leishmaniose.....	26
2.5 Avanços recentes e novas estratégias no tratamento.....	29
2.6 Potenciais alvos farmacológicos.....	30
2.7 Nanotecnologia.....	33
2.8 Predição farmacocinética <i>in silico</i> ADME/TOX.....	34
2.9 Acoplamento Molecular.....	35
2.10 Compostos heterocíclicos contendo o anel oxadiazol.....	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Desenho do estudo.....	39
4.2 Obtenção das moléculas.....	40
4.3 Estudo prospectivo.....	40
4.3.1 Prospecção Científica.....	40
4.3.2 Prospecção Tecnológica.....	41
4.4 Predição farmacocinética <i>in silico</i> ADME/TOX.....	41
4.5 Simulações de acoplamento molecular.....	41
4.6 Quantificação da atividade antioxidante.....	42
4.7 Quantificação da atividade anticolinesterásica.....	43
4.8 Avaliação da atividade da tripanotona redutase recombinante.....	44
4.9 Parasitos.....	44
4.10 Cultivo, manutenção e atividade dos oxadiazóis sobre macrófagos.....	44
4.11 Avaliação da atividade dos oxadiazóis sobre as formas promastigotas.....	46

4.12	Preparação das nanopartículas contendo oxadiazóis.....	47
4.12.1	<i>Síntese de nanopartículas</i>	47
4.12.2	<i>Análise de Rastreamento de Nanopartículas (ARN)</i>	48
4.13	Análise Estatística	49
5	RESULTADOS.....	50
5.1	Estudos prospectivos.....	50
5.1.1	<i>Prospecção científica</i>	50
5.1.2	<i>Prospecção tecnológica</i>	51
5.2	Predição farmacocinética ADME/TOX	53
5.3	Os oxadiazóis demonstraram afinidade ao sítio ativo da enzima acetilcolinesterase através da simulação de acoplamento molecular.....	59
5.4	Os oxadiazóis demonstraram atividade antioxidante promissora.....	61
5.5	Os oxadiazóis apresentaram atividade antiacetilcolinesterasica.....	61
5.6	Os oxadiazóis não inibiram significativamente a enzima tripanotiona redutase	62
5.7	Oxadiazóis como potentes agentes leishmanicidas e pouco citotóxicos para macrófagos	62
5.8	Fabricação e caracterização físico-química de nanopartículas com oxadiazóis.....	65
6	DISCUSSÃO.....	67
7	CONCLUSÃO.....	76
8	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical e subtropical causada pelo parasito *Leishmania spp*, que é transmitida ao homem pela picada de um flebotomíneo. É uma das sete doenças tropicais mais críticas, representando um grave problema de saúde global, apresentando um amplo espectro de manifestações clínicas com um desfecho potencialmente fatal. Encontrada em todos os continentes, exceto na Oceania, a leishmaniose é endêmica em áreas geográficas, como Nordeste da África, Sul da Europa, Oriente Médio, Sudeste do México e América Central e do Sul (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

Essa doença parasitária é causada por cerca de 20 espécies de *Leishmania*, transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos. Embora diferentes espécies de *Leishmania* estejam associadas a manifestações clínicas semelhantes, a mesma espécie do parasito pode estar associada a diferentes quadros clínicos. Tais achados sugerem que a espécie do parasito não é o fator determinante da patogênese. Isso é embasado pelo fato de que a infecção e a progressão da doença dependem das interações entre o parasito e o sistema imunológico do hospedeiro (ALVAREZ-HERNANDEZ *et al.*, 2020; AKHOUNDI *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2013; CECILIO *et al.*, 2014).

Tudo começa quando uma fêmea do mosquito-palha da espécie *Lutzomia longipalpis* infectada faz seu repasto sanguíneo e, desta forma, transmite as formas infectantes para o hospedeiro mamífero. *Leishmania spp.* tem um ciclo de vida heteroxênico, envolvendo um estágio promastigota extracelular móvel que parasita o trato alimentar de um vetor flebotomíneo e um estágio amastigota imóvel que sobrevive e se replica nos fagolisossomos de fagócitos mononucleares (BATES, 1994; SACKS; PERKINS, 1984; EFSTATHIOU; SMIRLIS, 2021). Além dos humanos, os hospedeiros primários da *Leishmania* incluem animais selvagens e domésticos, como roedores e caninos (MERRIT *et al.*, 2014).

A leishmaniose é uma doença limitante que conta com 6 variantes clínicas, sendo a forma cutânea a mais comum e a visceral a mais grave. Para tratamento medicamentoso, como primeira escolha no Brasil contam com os antimonialis pentavalentes que são amplamente utilizados há mais de 50 anos, entretanto possui toxicidade relevante, necessidade de administração parenteral e atualmente houve uma redução na sua eficácia devido à resistência medicamentosa, sendo necessário seu uso

em conjunto com Paromicina na África (EFSTATHIOU; SMIRLIS, 2021; AKHOUNDI *et al.*, 2017; KIMUTAI *et al.*, 2017; MUSA *et al.*, 2012). Para segunda escolha existe a Anfotericina B lipossomal que apesar da sua alta eficiência, apresentam efeitos adversos frequentes como febre, hipocalcemia, miocardite e principalmente nefrotoxicidade. Ainda possui um alto custo, necessidade de administração parenteral e acompanhamento hospitalar contínuo (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013).

Baseado nisso, há a necessidade de desenvolvimento de terapias alternativas com baixa toxicidade, menor custo e outras vias de administração. Logo, o heterocíclico 1-2-4 oxadiazol que nos últimos 40 anos vem sendo amplamente explorado, demonstrou um vasto número de compostos com ampla atividade biológica. Hoje em dia, existem alguns medicamentos comercialmente disponíveis que utilizam o anel 1-2-4 oxadiazol como Prenoxdiazina (antitussígeno), Butalamina (vasodilatador), Fasiplon (ansiolítico), Pleconaril (antiviral), Atalureno (Usado em Distrofia Muscular de Duchenne), Proxazol (relaxante da musculatura lisa intestinal) (COUPAR *et al.*, 1969; ROTBART; WEBSTER, 2001; MCDONALD *et al.*, 2017).

Visando a Leishmaniose, diversos trabalhos demonstram atividade leishmanicida promissora de compostos derivados de oxadiazóis. A atividade *in vitro* de uma molécula também derivada de 1,2,4 oxadiazol frente a cepas de *Leishmania infantum* foi recentemente avaliada pelo nosso grupo, bem como descrita a predição farmacocinética ADME/TOX da molécula com resultados promissores. Foi demonstrada baixa toxicidade frente a células LLC-MK2 e potencial atividade leishmanicida comparada ao fármaco de referência utilizado (Anfotericina B), reforçando que moléculas base de oxadiazóis são promissores agentes terapêuticos para leishmaniose (PINHEIRO *et al.*, 2021).

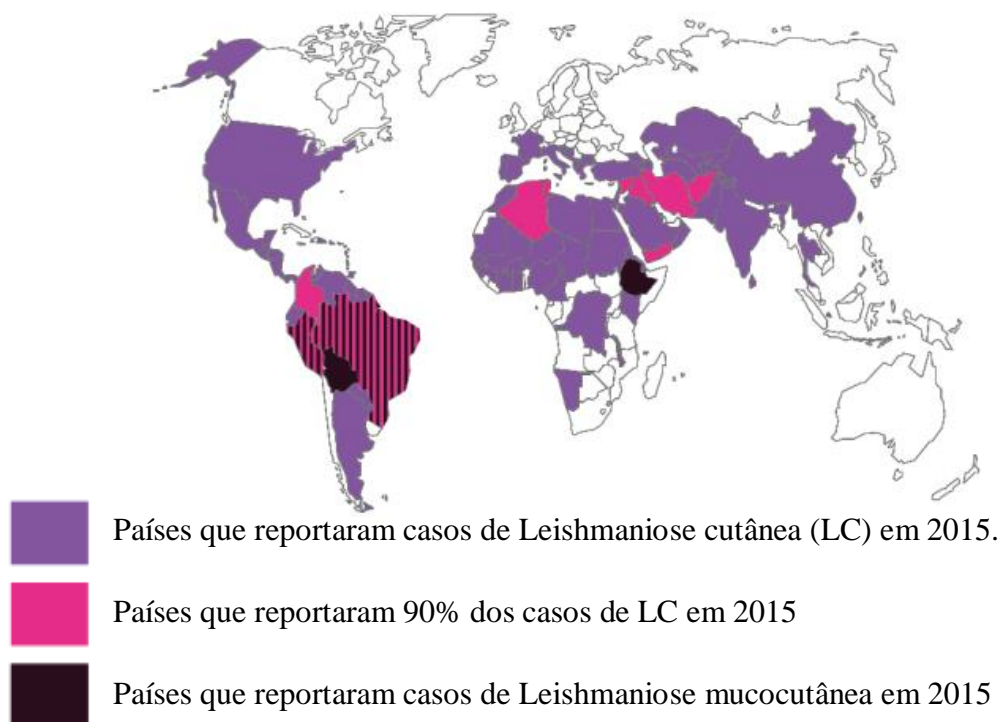
O interesse cada vez maior nesta classe de compostos incita que os pesquisadores desenvolvam métodos mais baratos e rápidos para sua síntese. Uma das mais recentes abordagens sintéticas é a aplicação da macanoquímica, que é uma estratégia poderosa para a síntese rápida, limpa e sem solvente de muitos compostos biologicamente ativos (TONG; CHEN, 2017). Desta forma os oxadiazóis podem ser explorados para o desenvolvimento de um tratamento alternativo e barato para as leishmanioses.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico e epidemiologia da Leishmaniose

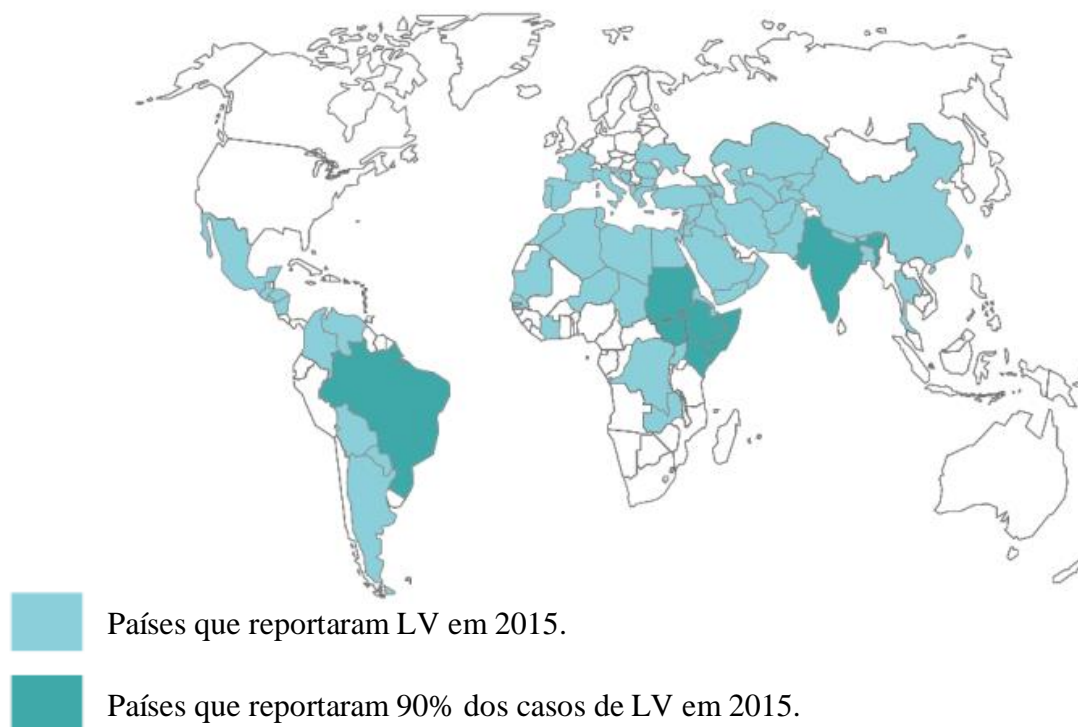
Globalmente a leishmaniose está entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas, com 1 bilhão de pessoas em risco em áreas endêmicas e mais de 12 milhões de pessoas infectadas. Nas Américas, foram notificados casos de leishmaniose cutânea (LC) do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, excluindo Chile e as Ilhas do Caribe, sendo endêmica em 21 países da América. No período de 2001 a 2021 houve um total de 1.105.545 casos de LC e Leishmaniose Visceral (LV), correspondendo a uma média de 52.645 casos por ano. A presença da leishmaniose está diretamente ligada à pobreza, fatores sociais, ambientais e climatológicos. Como demonstrado na figura 1, estima-se que 75% dos casos registrados de leishmaniose tegumentar estão concentrados em 10 países, um deles é o Brasil. Com relação à leishmaniose visceral, na figura 2 vemos que 90% dos casos se concentram em 6 países: Brasil, Etiópia, Índia, Bangladesh, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2023).

Figura 1: Distribuição Global de casos de Leishmaniose cutânea e mucocutânea.



Fonte: Adaptado de Unveiling the neglected of leishmaniasis WHO, 2015.

Figura 2: Distribuição Global de Leishmaniose Visceral.



Fonte: Adaptado de Unveiling the neglected of leishmaniasis WHO, 2015.

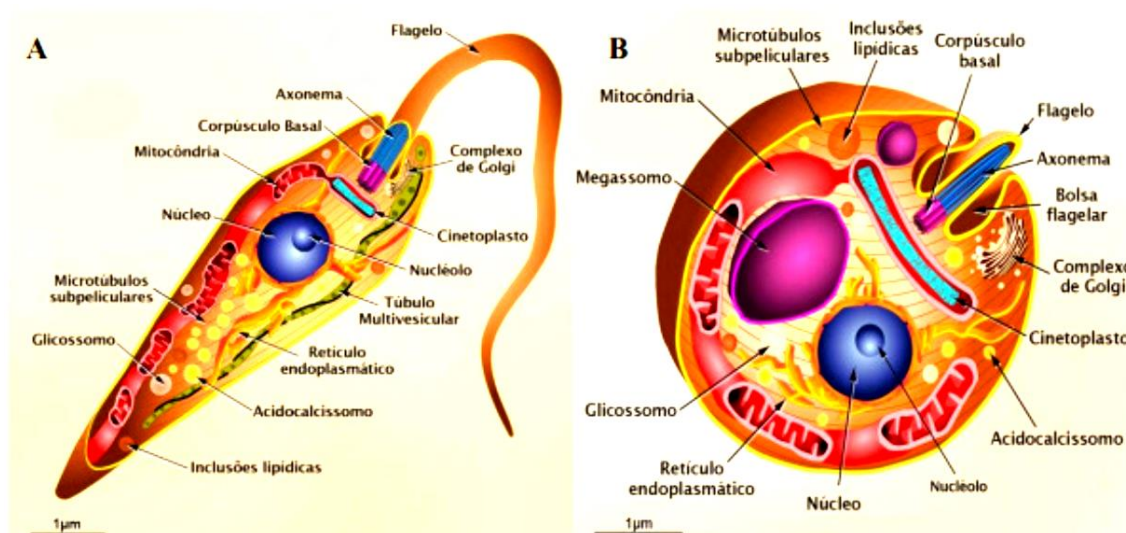
No estado do Ceará, a LV é descrita desde a década de 1930, mas, a partir de 1986, passou a ser notificada de forma contínua. De 2007 a 2021, foram registrados 6.089 casos confirmados, com uma média de 402 casos ao ano. Os maiores valores foram observados nos anos de 2007 (7,09 casos por 100.000 habitantes) e 2009 (7,25 casos por 100.000 habitantes). A maioria dos casos do estado do Ceará foi confirmada por critério laboratorial (5.419; 89,01%) (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ, 2021).

2.2 Agente etiológico, vetor e ciclo biológico de *Leishmania*

Leishmania é um parasita protozoário cinetoplastídeo que pertence à ordem dos tripanosomatídeos junto com *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*; é o agente causador das leishmanioses, que incluem leishmaniose visceral, pós kala-azar leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose da mucosa (EFSTATHIOU; SMIRLIS, 2021; AKHOUNDI *et al.*, 2017).

Os parasitos *Leishmania* são transmitidos ao hospedeiro mamífero após o repasto sanguíneo de uma fêmea do mosquito-palha infectada. Conforme demonstrado na figura 3, os parasitos possuem um ciclo de vida heteroxênico, envolvendo dois estágios: O primeiro sendo a forma promastigota extracelular móvel que habita o trato gastrointestinal de um vetor flebotômico e um estágio amastigota imóvel que sobrevive e se replica dentro do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro mamífero (BATES, 1994; SACKS; PERKINS, 1984; EFSTATHIOU; SMIRLIS, 2021).

Figura 3: Organização morfológica das formas promastigotas (A) e amastigotas (B) do parasito *Leishmania spp.*



Fonte: Adaptado de Teixeira *et al.*, (2013).

O desenvolvimento de parasitos *Leishmania* dentro do flebotômico é bastante complexo conforme ilustrado na figura 4, com processos de diferenciação distintos que são necessários para o estabelecimento de uma infecção bem sucedida. Diferente de muitos agentes transmitidos por vetores (incluindo alguns tripanossomatídeos), o desenvolvimento deste parasito está confinado ao trato digestivo do flebotômico (DOSTÁLOVÁ; VOLF 2012; RAMALHO-ORTIGAO; SARAIVA; TRAUB-CSEKÖ, 2010). Dividindo o trato digestivo do parasito, há o intestino anterior, que vai da boca até a cárdia incluindo a válvula estomodeal, o intestino médio que vai da cárdia ao piloro, e por fim, o intestino posterior que vai do piloro ao reto (NIEVES; PIMENTA, 2000).

A primeira etapa de diferenciação ocorre pouco depois da ingestão do repasto de sangue infectado pelos flebotomíneos. Devido às mudanças nas condições (como a diminuição da temperatura e o aumento do pH), as amastigotas diferenciam-se em promastigotas pró-cíclicas, formas pouco móveis. Postulou-se que os parasitos presentes no repasto sanguíneo precisam resistir ao efeito das proteases digestivas, a primeira e uma das mais significativas barreiras à sobrevivência do parasito (LAWYER *et al.*, 1990; ROGERS, 2002).

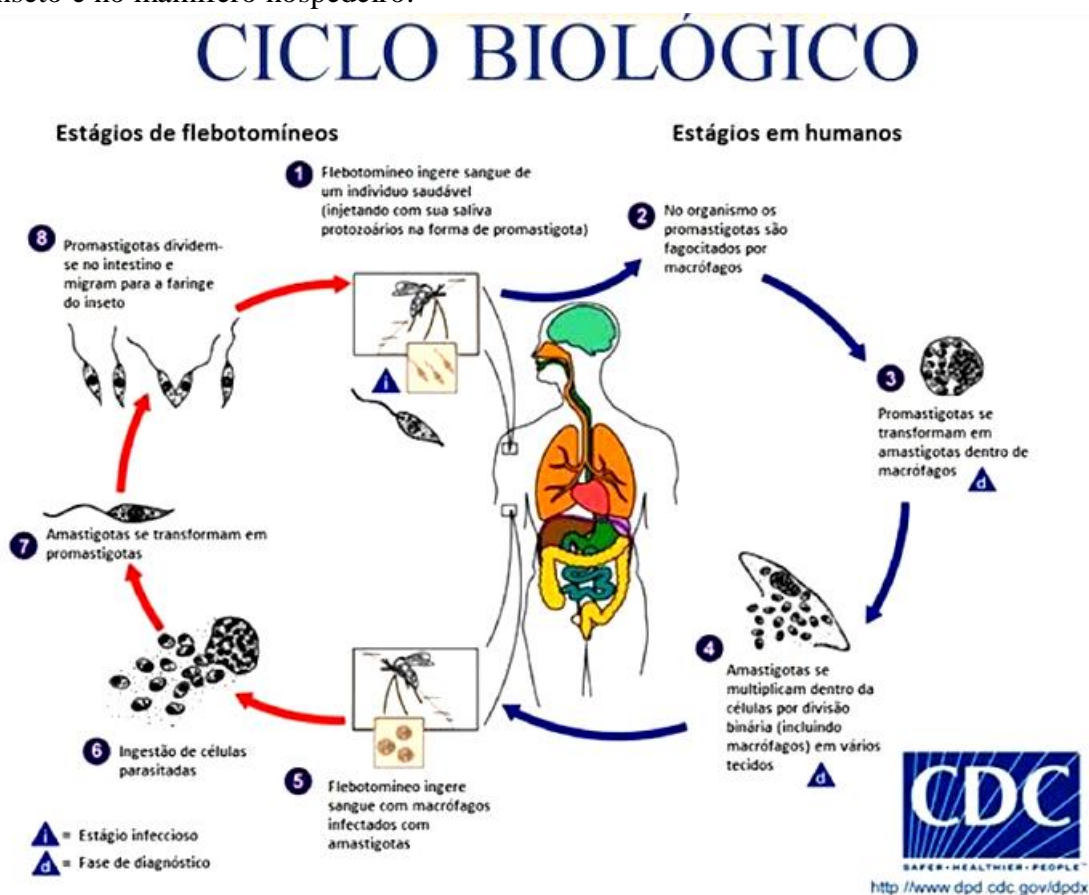
Dentro do intestino médio do flebotomíneo, a refeição sanguínea é envolvida por uma matriz peritrófica tipo I, que tem um papel protetor que funciona como barreira (SECUDINO *et al.*, 2005), é necessário que os parasitos *Leishmania* escapem desta estrutura para estabelecer uma infecção. Em 48 horas após a ingestão do repasto sanguíneo, os promastigotas pró-cíclicos começam a retardar sua replicação e se diferenciam em formas longas e fortemente móveis, chamadas promastigotas nectomonas. Estas formas de desenvolvimento são aquelas que “escapam” da matriz peritrófica para o lúmen do intestino médio. Além disso, essas formas parasitárias também são responsáveis pela fixação no intestino médio do flebotomíneo, outra etapa crucial para a conclusão do ciclo da *Leishmania* dentro do vetor, pois evita que os parasitos sejam eliminados junto com as fezes na defecação (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; SADLOVA, 2018).

O ciclo de vida continua com a migração de promastigotas de nectomonas em direção ao intestino médio anterior e sua diferenciação em promastigotas de leptomonas. Essas formas mais curtas do parasito constituem outro estágio replicativo no inseto, responsável pela população do intestino médio anterior do flebotomíneo, bem como pela secreção do gel secretado por promastigota (GSP), importante para o processo de transmissão (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003). Eventualmente, as leptomonas passam por outra etapa de diferenciação chamada metaciclogênese, dando origem ao estágio infeccioso do parasito para hospedeiros vertebrados, os promastigotas metacíclicos, que possuem corpo menor e flagelo longo, responsáveis por sua mobilidade extremamente rápida (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; SARAIVA; TRAUB-CSEKÖ, 2010).

Inicialmente acreditava-se que a forma metacíclica do parasito era a última do ciclo dentro do vetor, que agora tem um novo estágio denominado de

retroleptonomas, originado pela desdiferenciação de parasitos metacíclicos na presença de nutrientes, por consequência da ingestão de sangue por flebotomíneos infectados. Esta forma parasitária é, morfológicamente, mais próxima dos promastigotas de leptomonas e ao contrário dos metacíclicos, os retroleptonomas são formas replicativas. Eventualmente, quando as condições de estresse são restabelecidas no intestino médio (com a defecação dos restos do segundo repasto sanguíneo), os parasitos retroleptonomas “re-diferenciam-se” em promastigotas metacíclicos. A desdiferenciação de promastigotas metacíclicos em retroleptonomas replicativas, após a ingestão de repastos sanguíneos subseqüentes por flebotomíneos infectados, potencializará o desenvolvimento do processo infeccioso por parte dos parasitos (SERAFIM, *et al.*, 2018).

Figura 4: Etapas do ciclo evolutivo de transmissão de *Leishmania spp* no interior do inseto e no mamífero hospedeiro.



Fonte: Adaptado de *Center for Disease Control and Prevention (CDC)*, 2017.

2.3 Fisiopatologia da Leishmaniose

O processo fisiopatológico inicia com a deposição de parasitos metacíclicos na pele do hospedeiro, que depende da sua regurgitação pelo flebotomíneo. Os proteofosfoglicanos filamentosos secretados pelas promastigotas de leptomonas formam o tampão GSP (Gel Secretado de Promastigotas), que prejudica o processo de alimentação do flebotomíneo (SERAFIM, *et al.*, 2018). Devido a este fenômeno o comportamento dos flebotomíneos infectados também é alterado, gerando um aumento na persistência alimentar, favorecendo a infecção. Pesquisas demonstraram que flebotomíneos fortemente infectadas e consequentes tampões GSP maiores, tinham mais dificuldade em fazer uma refeição completa de sangue, deste modo, tentavam realimentar-se com mais frequência e em múltiplos hospedeiros, impactando consideravelmente na transmissão dos parasitos (ROGERS; BATES, 2007; ROGERS; CHANCE; BATES, 2002).

Demonstrou-se que os proteofosfoglicanos derivados da *Leishmania*, parte do tampão, que é regurgitado junto com os parasitas, contribuem para a exacerbação da leishmaniose. Um possível mecanismo proposto foi à modulação das vias inatas iniciais envolvidas. Foi demonstrado que o GSP acelera potencialmente a cicatrização de feridas na pele (GIRAUD *et al.*, 2018). Além disso, também foi demonstrado que exossomos derivados de parasitas fazem parte do inóculo infeccioso e potencializam a doença, tanto em modelos animais de LC como de LV. A alteração dos padrões de recrutamento celular e a modulação do comportamento celular foram mecanismos que se mostraram envolvidos na potencialização da infecção mediada por exossomos (ATAYDE *et al.*, 2015; PÉREZ-CABEZAS *et al.*, 2018).

O trato gastrointestinal dos flebotomíneos se assemelha a de demais seres, sendo composto por uma diversidade microbiológica denominada de microbiota. Foi demonstrado que as bactérias do intestino médio dos flebotomíneos são co-egeridos juntamente com os parasitas durante a transmissão, contribuindo adicionalmente para o estabelecimento da infecção. Foi demonstrado que os micróbios ejetados desencadeiam o inflamassoma, levando a uma rápida produção de IL-1 β e a uma infiltração sustentada de neutrófilos no local da picada do vetor (DEY *et al.*, 2018). Sabe-se que os neutrófilos, monócitos e principalmente os macrófagos conseguem controlar os parasitas por meio das espécies reativas de oxigênio, que são produzidas durante o processo de explosão respiratória na fagocitose, sendo uma parte fundamental da

resposta imunológica inata. Vários estudos apontam que os macrófagos murinos eliminam as promastigotas em ensaio *in vitro*, através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), contudo, outros experimentos sugeriram que camundongos deficientes na produção de EROs possuíam um aumento da susceptibilidade à doença, quando infectados com o parasito (HEIDARPOUR *et al.*, 2012; GONTIJO; CARVALHO, 2003; FREITAS; PINHEIRO, 2010).

Todos esses fatores imunomoduladores derivados do intestino médio se juntarão à saliva do flebotomíneo na pele do hospedeiro. E mais do que impactar a hemostasia do hospedeiro, a saliva do flebotomíneo demonstrou modular a imunidade do hospedeiro. Demonstrou-se que as proteínas salivares dos flebotomíneos favorecem respostas imunológicas locais anti-inflamatórias, benéficas para o estabelecimento de parasitas e, conseqüentemente, potencializam infecções e doenças (GOMES; OLIVEIRA, 2012). No modelo murino, a resistência à infecção depende da imunidade do hospedeiro mediada por citocinas de células TCD4 e macrófagos. Em associação a outros estímulos, a citocina interferon gama (IFN- γ) induz a morte microbiana mediada por óxido nítrico (NO) por macrófagos M1 classicamente ativados. Em contrapartida, a citocina interleucina 4 (IL-4) promove macrófagos do tipo M2 alternativamente ativados, que expressam arginase-1 e abrigam a infecção (RIGONI *et al.*, 2020).

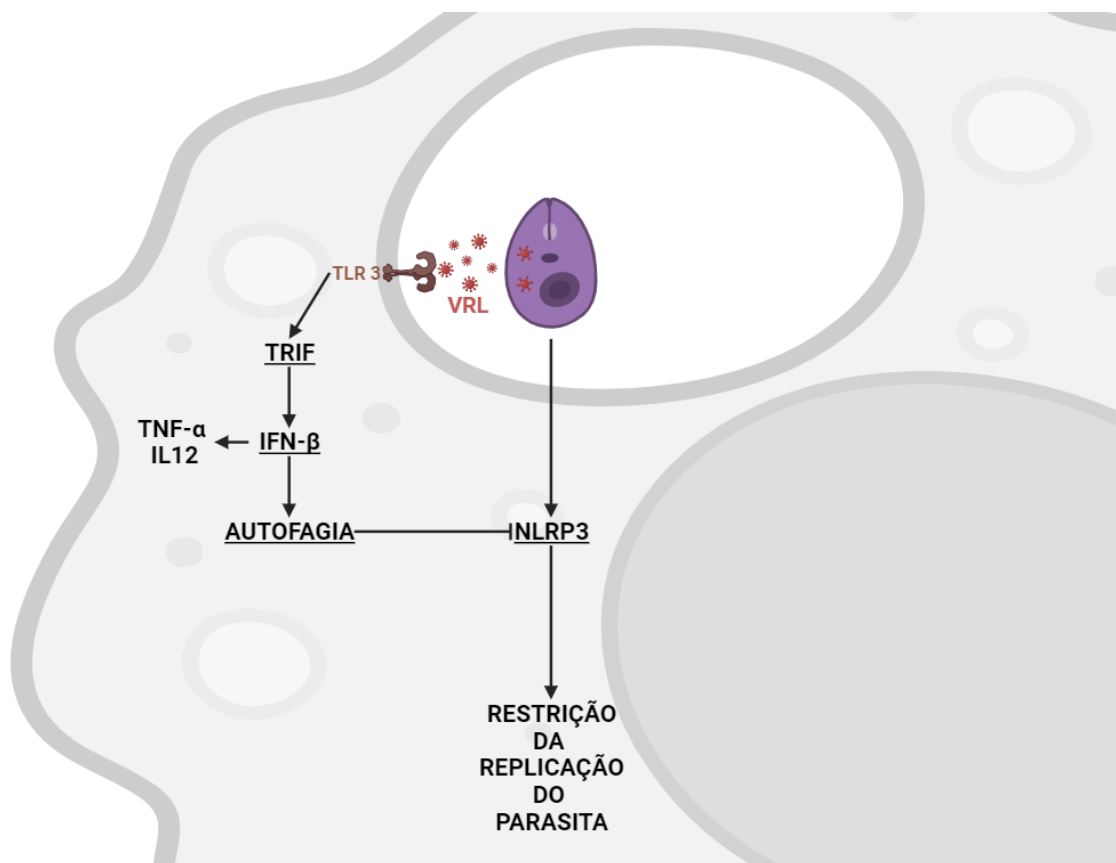
Por fim, podemos observar na figura 5 que o Vírus RNA da *Leishmania* (VRL) foi identificado e associado a um forte fator de virulência capaz de modular significativamente o sistema imunológico do hospedeiro em casos de leishmaniose mucocutânea. Como citado anteriormente, o sistema imune inato é importante no controle da infecção, uma vez que possui uma ampla variedade de receptores como os *Toll-likes* (TLRs) e os Nods (NRLs) capazes de identificar Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs) e produzir rapidamente uma resposta imunológica adequada (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997; MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). Uma vez que os TLRs reconheçam PAMPs, inicia-se uma resposta imune pró-inflamatória via NF- κ B que induz a produção de mediadores inflamatórios (IL-1 β , TNF- α , IL-6, quimiocinas), sendo um primeiro sinal para induzir a ativação do NLR (O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013).

A maioria dos TLRs sinalizam exclusivamente via MyD88, exceto o TLR3, que reconhece RNA de fita dupla e recruta TRIF, desencadeando uma forte resposta antiviral via IRFs e IFN tipo I (YAMAMOTO *et al.*, 2003). O reconhecimento

da *Leishmania* pelos TLR2, 3, 4, 7 e 9 é descrito como importantes mecanismos efetores para restringir o controle do parasita (SCHAMBER-REIS *et al.*, 2013; FRANCO *et al.*, 2017). Por outro lado, o IFN- α e o IFN- β , que desempenham papel essencial no controle de vírus e de algumas bactérias, são prejudiciais durante a infecção por *Leishmania* (KHOURI *et al.*, 2009).

Foi demonstrada uma exacerbação da leishmaniose mucocutânea mediada pelo VRL, uma vez que desencadeia TLR3 e TRIF para induzir a produção de IFN tipo I, que por sua vez induz a autofagia degradando o inflamassoma NLRP3, que desempenharia um papel crucial no desfecho da infecção. Com a atividade restrita do inflamassoma NLRP3, a sinalização desencadeada pelo VRL resulta no aumento e sobrevivência da *Leishmania* e na progressão da doença da leishmaniose mucocutânea debilitante (DE CARVALHO *et al.*, 2019).

Figura 5: Vírus RNA da *Leishmania* (VRL) exacerbando a infecção.



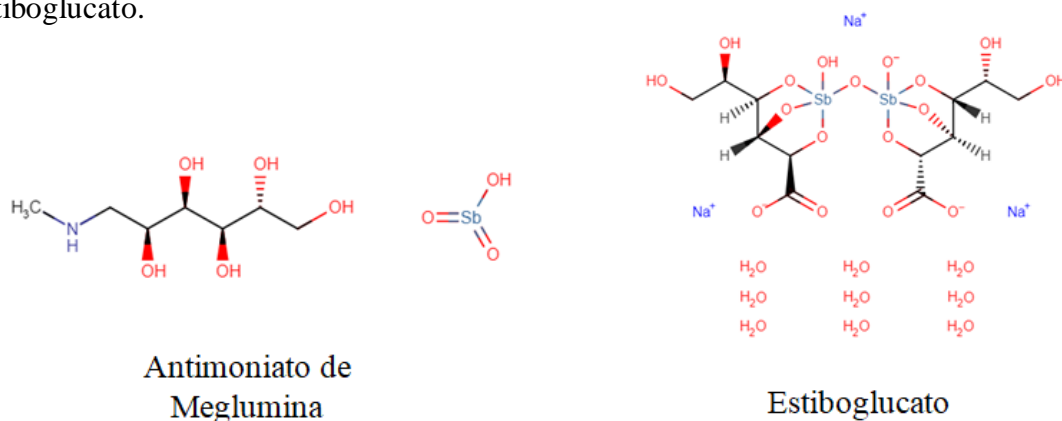
Fonte: Adaptado de De Carvalho *et al.*, (2019).

2.4 Tratamentos para leishmaniose

Para primeira escolha de tratamento de leishmaniose existem os antimoniais pentavalentes (Sb^{V}), que estão disponíveis há quase sete décadas. As duas principais formulações são o antimoniato de meglumina (MA) e o estibogluconato de sódio (SSG) ilustrados na figura 6. Sb^{V} se comportaria como um pró-fármaco que é reduzido dentro do organismo na forma ativa de Sb^{III} , um íon metálico limítrofe com alta afinidade para ligantes contendo nitrogênio e sulfidrina. Os mecanismos antileishmania do Sb^{III} estão provavelmente relacionados à sua interação com biomoléculas contendo sulfidrina, incluindo tióis, peptídeos, proteínas e enzimas (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). Embora eficaz, a utilização destes compostos é muitas vezes limitada pela necessidade de administração parenteral diária, toxicidade grave, efeitos colaterais e falhas no tratamento. Com a resistência emergente a este medicamento, foi adotada uma estratégia de tratamento alternativa na África Oriental, a combinação de SSG e paromomicina (antibiótico da classe dos aminoglicosídeos) tem sido recomendada como medicamento de primeira linha para o tratamento da LV (KIMUTAI *et al.*, 2017; MUSA *et al.*, 2012).

Nas formas cutâneas, o Sb^{V} apresentou respostas variadas em diferentes espécies etiológicas. Apesar disso, são a base do tratamento da LC em diversas regiões do mundo. Atualmente, na leishmaniose cutânea do Velho Mundo, a maioria dos pacientes é tratada com infiltração intralesional de Sb^{V} . O uso sistêmico pode ser considerado apenas para lesões mucocutâneas. Na leishmaniose cutânea do Novo Mundo, a maioria dos pacientes é tratada com MA sistêmico (20 mg de Sb^{V} /kg/dia por 20 dias). Os efeitos colaterais do Sb^{V} incluem irritação local, alterações cardíacas e hepáticas, anorexia, náuseas e vômitos (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Além disso, pacientes co-infectados com HIV/leishmaniose tratados apresentam efeitos colaterais pronunciados, altas taxas de falha e recaída e aumento da mortalidade durante a terapia com Sb^{V} (COTA *et al.*, 2013).

Figura 6: Estrutura química dos antimoniais pentavalentes, Antimoniato de Meglumina e Estiboglucato.



Fonte: Drugbank, 2023.

O desoxicolato de anfotericina B (ANF-B) é um antifúngico de amplo espectro e ativo contra espécies de *Leishmania*. Após a perda de eficácia dos medicamentos antimoniais na Índia, o ANF-B foi eleito o medicamento de primeira linha de escolha para a LV. Este fármaco é um inibidor da formação do ergosterol, se ligando aos esteróis da membrana e formando complexos que se organizam em canais iônicos, aumentando a permeabilidade da membrana (GRAY *et al.*, 2012). Apesar de sua eficácia, os pacientes tratados apresentam efeitos adversos frequentes como febre, hipocalemia, miocardite e principalmente nefrotoxicidade, que exigem acompanhamento hospitalar. Muitas formulações lipídicas de anfotericina foram desenvolvidas nos últimos anos para minimizar os efeitos colaterais da ANF-B. Mas a anfotericina B lipossomal AmBisome® é a única aprovada pela US *Food and Drug Administration* (FDA). As necessidades totais de dose das formulações lipídicas para o tratamento da LV variam de acordo com a região (SUNDAR *et al.*, 2007). Embora tenha um custo caro, a alta eficácia da ANF-B lipossomal garante que seja a primeira escolha de tratamento para pacientes co-infectados com HIV, grávidas e indivíduos transplantados na maioria dos países (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013).

A atividade antileishmanial da miltefosina, que é um medicamento antineoplásico, foi identificada pela primeira vez na década de 1980 e até hoje é o único medicamento oral aprovado para o tratamento da leishmaniose (CROFT *et al.*, 1987; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Este medicamento é capaz de matar parasitos *in vitro* e *in vivo*, alterando as vias de sinalização e a síntese da membrana celular, levando à apoptose (VERMA; DEY, 2004). Após um ensaio clínico de fase III, no qual uma

dose de 50-100 mg/dia durante 28 dias resultou numa taxa de cura de 94%, a miltefosina foi registrada pela primeira vez para o tratamento da LV na Índia (SUNDAR *et al.* 2002). Infelizmente, após uma década de uso, houve um aumento na resistência com eficácia reduzida, duplicando a taxa de recaída (SUNDAR *et al.*, 2012; SRIVASTAVA *et al.*, 2017). Isso causou a troca de miltefosina por dose única de AmB-L como estratégia terapêutica do programa de eliminação de LV na Índia. Atualmente, seu uso tem sido recomendado apenas em combinações com outros medicamentos nesta região (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019).

Para leishmaniose cutânea, a dose recomendada é de 2,5 mg/kg/dia por via oral durante 28 dias. No entanto, a miltefosina tem eficácia variada, dependente da espécie. Um ensaio clínico demonstrou que a miltefosina é útil contra a LC causada por *Leishmania panamensis* na Colômbia, mas não contra a LC causada por *Leishmania braziliensis* na Guatemala (SOTO *et al.*, 2004). Por outro lado, foi observado que a terapia com miltefosina foi mais eficaz e segura do que o Sb^v para o tratamento da LC causada por *L. braziliensis* na Bahia, Brasil (MACHADO *et al.*, 2010). Os efeitos adversos da miltefosina incluem alterações gastrointestinais e menos frequentemente hepatotoxicidade. Além disso, apresenta efeitos teratogênicos, pelo que as mulheres em idade fértil são aconselhadas a contracepção durante o regime de tratamento (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Desde que foi sintetizada pela primeira vez na década de 1940, a pentamidina tem sido estudada por sua ação anti-*Leishmania*, principalmente após os casos de resistência aos antimoniais no subcontinente indiano (JHA *et al.*, 1991). No entanto, seu uso foi abandonado devido à toxicidade, como pancreatite levando a diabetes mellitus, hipoglicemia, hipotensão, alterações cardíacas e hipercalemia (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Recentemente, o uso mensal de uma dose de 4 mg/kg durante 12 meses tem sido recomendado como profilaxia secundária em pacientes co-infectados com HIV-LV na Etiópia, se a contagem de linfócitos T CD4 for inferior a 200 células/ μ l (DIRO *et al.*, 2015; DIRO *et al.*, 2019).

Os antifúngicos azólicos têm sido avaliados como estratégias terapêuticas, principalmente para as formas cutâneas. No velho mundo, a terapia oral com fluconazol apresentou taxas de cura de aproximadamente 60%, com aumento substancial na

eficácia quando a concentração do medicamento foi duplicada. No entanto, este tratamento foi associado a efeitos colaterais, como hepatotoxicidade e cardiotoxicidade (ALRAJHI *et al.*, 2002; EMAD *et al.*, 2011). A terapia oral com altas doses de fluconazol em pacientes infectados por *L. braziliensis* demonstrou uma taxa de cura de 75–100% (SOUSA *et al.* 2011). Entretanto, em uma nova atualização com ensaio clínico randomizado, avaliou-se a eficácia do fluconazol oral em esquema terapêutico semelhante para o tratamento da LC causada por *L. braziliensis*, evidenciando baixas taxas de cura, com apenas 22% (PRATES *et al.* 2017). O itraconazol demonstrou baixa eficácia para o tratamento do leishmaniose mucocutânea (LMC) no Brasil, e a resolução completa das lesões foi observada em apenas 23% dos pacientes tratados com altas doses de itraconazol no Equador (AMATO *et al.* 2000; CALVOPINA *et al.* 2004). Por fim, uma metanálise sistemática recente identificou que nenhum dos azóis é eficaz para o tratamento das formas cutâneas da leishmaniose, devendo seu uso ser associado apenas a outros medicamentos (GALVÃO *et al.* 2017).

2.5 Avanços recentes e novas estratégias no tratamento de leishmaniose

Devido ao surgimento de novas cepas, resistência medicamentosa, alta toxicidade das terapias, dentre outros fatores, tem-se emergido novas estratégias para combater a Leishmanose. Dentre elas há o desenvolvimento de vacinas que são classificadas de acordo com o tipo de antígeno, seja ele o próprio parasito vivo ou atenuado, frações antigênicas, proteínas recombinantes ou DNA. Entretanto, apenas alguns chegaram à fase de estudos clínicos em virtude de baixa eficácia (ASKARIZADEH; BADIEE; KHAMESIPOUR, 2020). Embora existam estudos de imunização contra leishmaniose desde a década de 40, até o presente momento existe uma vacina, de primeira geração, licenciada para imunização em humanos no Uzbequistão. No Brasil, destinada apenas a utilização em cães, é comercializada a Leishmune, que consiste em uma fração de uma glicoproteína purificada que está presente na superfície do parasito, e apresentou resultados satisfatórios de eficácia (NAGILL; KAUR, 2011).

Como dito anteriormente, os parasitos de *Leishmania spp* conseguem burlar o sistema imunológico de diversas formas, tudo em prol de gerar uma resposta imune do padrão anti-inflamatória, baseado nisso tem surgido estudos acerca de

imunomoduladores. Oliveira *et al.* (2014) avaliaram o papel das citocinas regulatórias e dos antagonistas de citocinas na regulação negativa da resposta imune na infecção por *L. braziliensis* e demonstraram que IL-10 e TGF- β foram as citocinas mais envolvidas na modulação da resposta imune em pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa. A IL-10 pode ter um papel protetor, uma vez que a neutralização do IFN- γ diminui a produção de TNF- α de maneira dependente da IL-10. Castellano *et al.* (2015) avaliaram o uso de imunoterapia baseada em anticorpos monoclonais visando a citocina IL-10. Também foi avaliado o bloqueio parcial de IL-10 em células inteiras estimuladas por antígeno solúvel de *L. braziliensis* de pacientes com leishmaniose cutânea de área endêmica com lesões ativas ou curadas e controles assintomáticos. Eles encontraram diminuição geral na produção de IL-10, IL-4 e TNF- γ em todos os grupos e apenas os pacientes com lesões ativas ainda produziram alguns níveis de TNF- α após estimulação anti-IL-10 em associação com antígenos de *Leishmania*. Eles sugeriram o potencial uso imunoterapêutico do bloqueio parcial da IL-10 na leishmaniose cutânea localizada.

A capacidade de imunomodulação e reparação tecidual das células-tronco mesenquimais, a facilidade de isolamento, detecção e cultura *in vitro*, têm encorajado os biólogos a usar células-tronco mesenquimais para terapia celular em diferentes infecções, como a leishmaniose. Navard *et al.* (2020) infectaram camundongos BALB/c com *L. major* e os trataram com células-tronco mesenquimais, Glucantime, Glucantime + células-tronco mesenquimais ou PBS. Eles mostraram que os camundongos que foram injetados intralesionalmente com células-tronco mesenquimais demonstraram regressão significativa nas lesões. Além disso, eles descobriram que a proliferação dos esplenócitos estimulados com antígeno solúvel de *Leishmania* e a potência de fagocitose em macrófagos dos camundongos tratados com células-tronco mesenquimais foi significativamente maior e a cicatrização das lesões foi mais avançada, como mostrado pelos exames histopatológicos.

2.6 Potenciais alvos Farmacológicos

A identificação de alvos farmacológicos adequados na via biológica é a parte mais importante do desenvolvimento de medicamentos que segue duas etapas. A primeira etapa que podemos citar é a identificação de um alvo que esteja ausente no hospedeiro ou é estrutural e funcionalmente diferente do homólogo do hospedeiro. A

segunda etapa é identificar alvos que sejam criticamente necessários para a sobrevivência do parasito. O alvo identificado deve ser uma enzima que esteja presente em qualquer via biossintética importante, testável e prontamente disponível para triagem de alto rendimento. Existem vários alvos medicamentosos disponíveis que podem ser facilmente explorados para o desenvolvimento de novas estratégias eficazes contra a leishmaniose sendo possível visualizar na figura 7, como exemplo amplamente conhecido, temos a via biossintética do ergosterol que é onde a anfotericina B atua (RAJ *et al.*, 2020).

A membrana das células dos mamíferos tem na sua composição a presença de esteróis do tipo colesterol, diferentemente das membranas dos tripanossomatídeos que apresentam outros tipos de esteróis como o ergosterol e alguns outros 24-metilesteróis. Deste modo, esta via vem sendo amplamente utilizada como alvo molecular de fármacos antileishmaniais. Yamamoto *et al.*, (2020) apresentaram o tolnaftato que é um inibidor seletivo, reversível e não competitivo da enzima esqualenoepoxidase, que está envolvida no processo de biossíntese do ergosterol. O tolnaftato foi eficiente frente à promastigotas e amastigotas de cepas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* ($EC_{50} \sim 10 \mu\text{g/mL}$ e $SI \sim 20$ para todas as espécies de promastigotas de leishmania e $IS \sim 8$ em infecções causadas por espécies dermatotrópicas e 17,4 para espécies viscerotrópicas). Além disso, demonstrou uma redução significativa (5,6 vezes em comparação ao grupo controle) no nível de ergosterol em promastigotas.

Outro processo vastamente estudado é a via glicolítica dos tripanossomatídeos, uma vez que difere da via glicolítica dos mamíferos. Nos parasitos, sete das dez enzimas são organizadas em compartimentos conhecidos como glicossomos, que desempenham um papel vital em muitos processos metabólicos como a glicólise, oxidação de ácidos graxos biogênese lipídica e via de resgate de purina. Devido a esta particularidade diferente dos tripanossomatídeos, várias biomoléculas são projetadas para interferir essa via crucial. Gomes *et al.*, (2021) apresentaram a 3-bromopiruvato (3-BrPA) que é um análogo do ácido pirúvico, capaz de inibir a síntese de ATP ao inibir enzimas importantes da via glicolítica e da fosforilação oxidativa. Em *L. amazonensis*, a 3-BrPA reduziu, significativamente de maneira dose dependente, a atividade de 3 enzimas importantes da via glicolítica (Glicose quinases, Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e a Enolase). Deste modo observou-se uma redução significativa

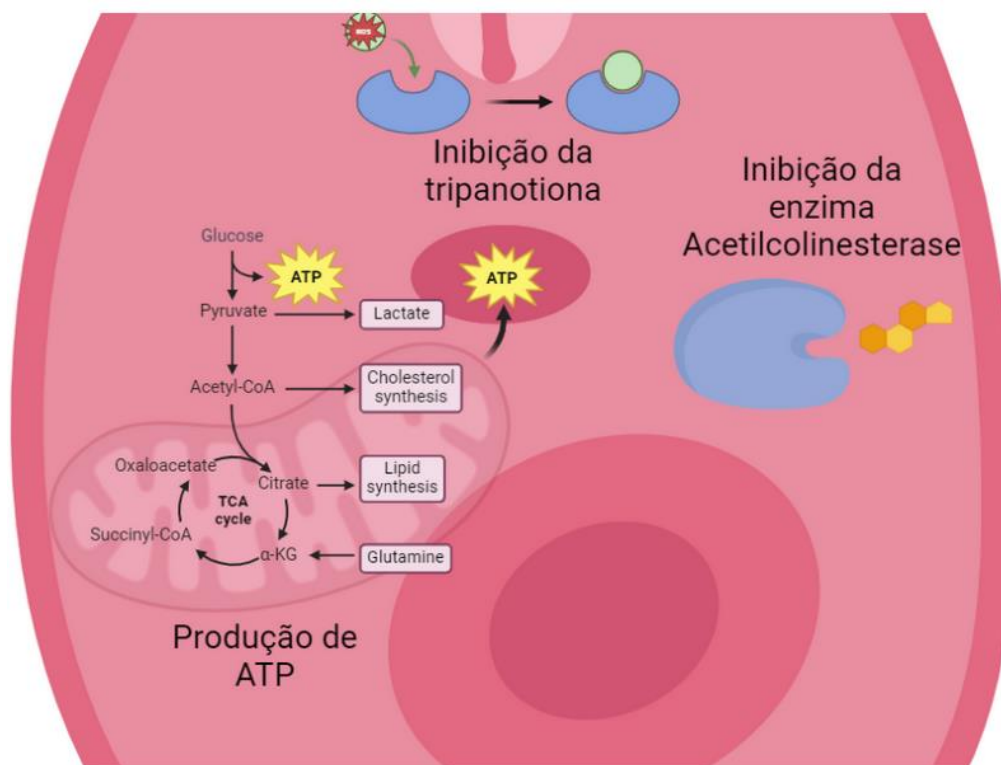
na produção de ATP nas promastigotas, uma inibição na proliferação, bem como uma redução em aproximadamente 50% na capacidade de infectar macrófagos.

O parasito uma vez que invade o organismo do mamífero tem que sobreviver num ambiente extremamente ácido, que é no interior das células do sistema mononuclear fagocítico. Para isso, o parasito tem em seu arsenal 3 enzimas essenciais que regem seu metabolismo redox (Tripanotiona Sintetase, Tripanotiona Redutase e triparedoxina peroxidase) que funcionam em cascata e difere do metabolismo redox do hospedeiro mamífero, que conta com o mecanismo da Glutathione. A tripanotiona sintetase sintetiza a tripanotiona redutase a partir de duas moléculas de glutathione e espermidina (KRAUTH-SIEGEL; LEROUX, 2012). A tripanotiona desempenha um papel crucial no estresse oxidativo e mantém o mecanismo redox celular; portanto, é extremamente essencial para a sobrevivência do parasito. A tripanotiona sintetizada é ainda reduzida em tioredoxina e triparedoxina, que por sua vez reduz as peroxidases geradas para a remoção de espécies reativas tóxicas (COMINI; FLOHÉ, 2013). Com isso, o metabolismo redox da *Leishmania spp* a torna alvo de estudos de medicamentos.

Pramaniket *al.* (2020) avaliaram a atividade inibitória *in vitro* de um derivado da folha de *Corchorus capsularis* (β -sitosterol) frente a cepas de *L. donovai*, demonstrando uma atividade inibitória eficiente com uma $IC_{50} = 17,7 \pm 0,43 \mu\text{g/ml}$. Com estudos *in silico*, inferiu uma inibição enzimática significativa da β -sitosterol frente à enzima tripanotiona redutase.

Moléculas inibidoras da enzima acetilcolinesterase podem diminuir a sobrevivência de *Leishmania spp* ao inibir a formação da colina a partir da hidrólise de acetilcolina em colina e acetato. Uma vez que a colina compõe a membrana plasmática, sua inibição pode levar ao rompimento de membranas plasmáticas dos parasitos como demonstrado por Vila-Novaet *al.* (2012).

Figura 7: Potenciais alvos farmacológicos para o tratamento das leishmanioses.



Fonte: Elaborado pelo autor

2.7 Nanotecnologia

A nanotecnologia é definida pela capacidade de manipulação da matéria em uma escala atômica, molecular e supramolecular sendo capaz de manipular precisamente átomos e moléculas para a fabricação de produtos de escala macromolecular, também conhecidos como nanotecnologia molecular (DREXLER, 1992). A nanotecnologia é muito abrangente, incluindo diversas áreas como química orgânica, ciência da superfície, microfabricação, física de semicondutores, biologia molecular, armazenamento de energia, engenharia molecular (HUBLER, 2010; SHINN, 2013; LYON *et al.*, 2013; SAINI *et al.*, 2010), etc.

Os sistemas de distribuição de medicamentos baseados em nanopartículas para diferentes aplicações apresentam vantagens significativas frente aos medicamentos administrados de forma livres e não formulados, haja vista que esses sistemas nanoparticulados podem tratar áreas do corpo que outros sistemas de administração não alcançam. Por isso, o uso da nanotecnologia vem sendo amplamente estudada na área da saúde (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2016). Diferentes nanopartículas foram

documentadas com uma ampla gama de aplicações em vários campos da medicina e da biologia, incluindo terapia do câncer, administração de medicamentos, engenharia de tecidos, medicina regenerativa, detecção de biomoléculas e também como agentes antimicrobianos. Existem diferentes categorias de nanopartículas que foram desenvolvidas e caracterizadas para uso no sistema de distribuição de agentes bioativos que incluem lipossomas, polímeros, nanocapsulas, micelas poliméricas e dendímeros (RUDRAMURTHY; SWAMY, 2018).

A nanotecnologia vem sendo amplamente estudada no desenvolvimento de novos fármacos antileishmaniais, uma vez que as nanopartículas podem ser reconhecidas como corpos estranhos pelo sistema imunológico sendo fagocitadas pelos fagócitos, levando a uma entrega específica, visto que os parasitos *Leishmania spp* abrigam-se no interior de macrófagos. Além de que as nanopartículas sólidas são conhecidas por seu elevado peso por volume, levando a liberação sustentada do fármaco por difusão gradual. Deste modo, o medicamento pode vir a ser administrado em doses mais elevadas e durante um período mais curto para alcançar a cura (MULLER *et al.*, 2001).

2.8 Predição farmacocinética *in silico* ADME/TOX

A investigação *in silico* é capaz de prever o metabolismo, abrangendo desde a estabilidade metabólica de uma molécula, caminhando até ser capaz de avaliar a energia de ligação de enzimas. Sendo capaz de estabelecer condições complexas como o destino metabólico de uma molécula, ademais podendo prever com certa precisão possíveis cálculos de afinidade da interação receptor-ligante, promovendo a revelação de estruturas. Esses cálculos são essenciais para descoberta e desenvolvimento de novas drogas (SIPPL, 2002).

Em relação à previsão farmacocinética *in silico*, a predição das propriedades do ADME-Tox (absorção, distribuição, excreção, metabolismo e toxicidade) é um processo de descoberta e otimização de novos compostos farmacêuticos. Alguns parâmetros essenciais de experimentos *in vivo*, como farmacocinética e efeitos tóxicos específicos, podem ser estimados por essas propriedades (WENZEL *et al.*, 2019). Tradicionalmente, métodos de modelagem de dados, como sistemas especialistas

e relações quantitativas estrutura-atividade, têm sido usados para investigar as propriedades da ADMET. Estes métodos disponíveis comercialmente e gratuitamente utilizam abordagens estatísticas e de aprendizagem, descritores moleculares e dados experimentais para modelar processos biológicos complexos (por exemplo, biodisponibilidade oral, absorção intestinal, permeabilidade e mutagenicidade) (MICHIELAN; MORO, 2010; VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

A capacidade de prever estas propriedades de forma rápida e confiável facilita a exclusão de compostos com potenciais problemas das propriedades farmacocinéticas ADME e, assim, ajuda os investigadores a priorizar quais compostos sintetizar e avaliar. Vale salientar que a toxicidade continua a ser o maior obstáculo, com uma taxa de desgaste de 40% entre os novos compostos identificados na fase de descoberta de medicamentos (WARING *et al.*, 2015)

2.9 Acoplamento molecular

Os métodos computacionais de descoberta de medicamentos fornecem informações valiosas para compreensão dos sistemas de interação proteína-ligantes de maneira virtual. O acoplamento molecular e a simulação de dinâmica molecular (MD) baseada na termodinâmica são importantes ferramentas para a descoberta de medicamentos *in silico*. O acoplamento molecular é uma abordagem que emprega os modos de ligação de pequenas moléculas ou macromoléculas em contato com receptores de proteínas em nível atômico e as técnicas de MD complementam esses resultados. Essas abordagens são favoráveis na avaliação das características estruturais de um complexo proteína-ligante, proteína-proteína, proteína-ácido nucleico e proteína-peptídeo (SINGH *et al.*, 2022).

Derivados de oxadiazóis foram estudados como possíveis inibidores da enzima tripanotona redutase. Esta enzima mantém um ambiente redutor no interior do parasita, protegendo-o contra o estresse oxidativo. Em um estudo de docagem, utilizando o programa AutoDocking, demonstrou que estes derivados possuem boa interação com a tripanotona redutase. Em um estudo comparativo foi observado que os compostos estudados apresentam maior afinidade pela tripanotona redutase do que pela glutatona redutase, que é uma enzima com função análoga em humanos, essa diferença

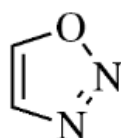
pode ser explorada para projetar inibidores seletivos para a enzima do parasita (MOLFETTA *et al.*, 2009; GARAY, 2018).

2.10 Compostos heterocíclicos contendo o anel oxadiazol

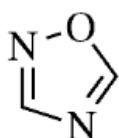
Oxadiazóis são compostos heterocíclicos de cinco membros, contendo um átomo de oxigênio e dois átomos de nitrogênio. Sua alta importância é destacada por muitas aplicações em diversas áreas científicas, por exemplo, na indústria farmacêutica, descoberta de medicamentos, materiais cintilantes e indústria de corantes (SALAHUDDIN *et al.*, 2017).

O oxadiazol é considerado derivado do furano pela substituição de dois metanos, agrupado por dois nitrogênios do tipo piridina. Existem quatro possíveis isômeros de oxadiazol, dependendo da posição do átomo de nitrogênio, conforme demonstrado na figura 8: 1,2,3-oxadiazol, 1,2,4-oxadiazol, 1,3,4-oxadiazol e 1,2,5-oxadiazol (SOMANI *et al.*, 2011; VAIDYA *et al.*, 2016).

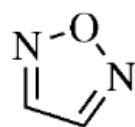
Figura 8: Isômeros de oxadiazóis.



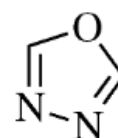
1,2,3-oxadiazole



1,2,4-oxadiazole



1,2,5-oxadiazole



1,3,4-oxadiazole

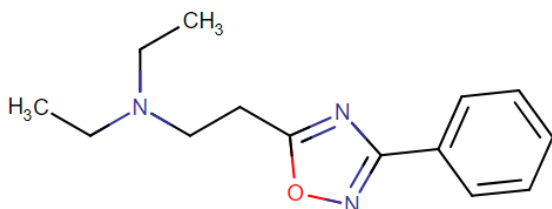
Fonte: Biernackiet *al.* (2020)

Há descrito na literatura um vasto potencial biológico de derivados oxadiazólicos. Atividade antitumoral (SUN *et al.*, 1999), anti-inflamatória (AMIR E SHAHANI, 1998), fungicida (MORAIS *et al.*, 2017), herbicida (FISCHER *et al.*, 1970), analgésica (VARMA *et al.*, 1999), anticonvulsivante (YAR E AKHTER, 2009), anti-HIV (KHAN *et al.*, 2016), antibacteriana (JANARDHANAN *et al.*, 2016), leishmanicida (STEVANOVIC, 2019), dentre outras atividades biológicas.

Especificamente, o anel 1-2-4-oxadiazol tem recebido atenção considerável, devido às suas propriedades bioisostéricas únicas e um amplo espectro de atividades biológicas, dobrando nos últimos quinze anos o interesse no seu uso para compor medicamentos. Os estudos com esta molécula começaram na década de 1940, sendo que

10 anos depois tivemos o primeiro medicamento registrado para uso, a Oxolamina sendo possível visualizar sua estrutura na figura 9, que é um supressor de tosse (SILVESTRINI, 1960; BIERNACKI *et al.*, 2020).

Figura 9: Estrutura química da Oxolamina.



Fonte: Drugbank (2023).

Há descrito na literatura diversos trabalhos com atividade leishmanicida promissora de moléculas a base de oxadiazóis. Sendo eficiente em diferentes cepas que estão relacionadas a diferentes manifestações clínicas (*L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*) (Tahaet *al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2013; Steert *et al.*, 2010; Dutra *et al.*, 2014; Galbiatiet *al.*, 2021; Dürüstet *al.*, 2012; Chaves *et al.*, 2017; Chauvièreet *al.*, 2003). Deste modo, nosso grupo de pesquisa testou a atividade leishmanicida de um composto 1-2-4-oxadiazol em promastigotas de *L. infantum*, bem como se testou a sua citotoxicidade em células LLC-MK2, onde foi possível observar atividade leishmanicida significante e baixa citotoxicidade, dando margem e justificativa para estudos de maiores complexidades para com essas moléculas sintéticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a atividade anti- *L. infantum* e *L. braziliensis* *in silico* e *in vitro* de derivados sintéticos de oxadiazóis em solução, além de fabricar e caracterizar nanopartículas contendo a molécula de interesse.

3.2 Objetivos específicos

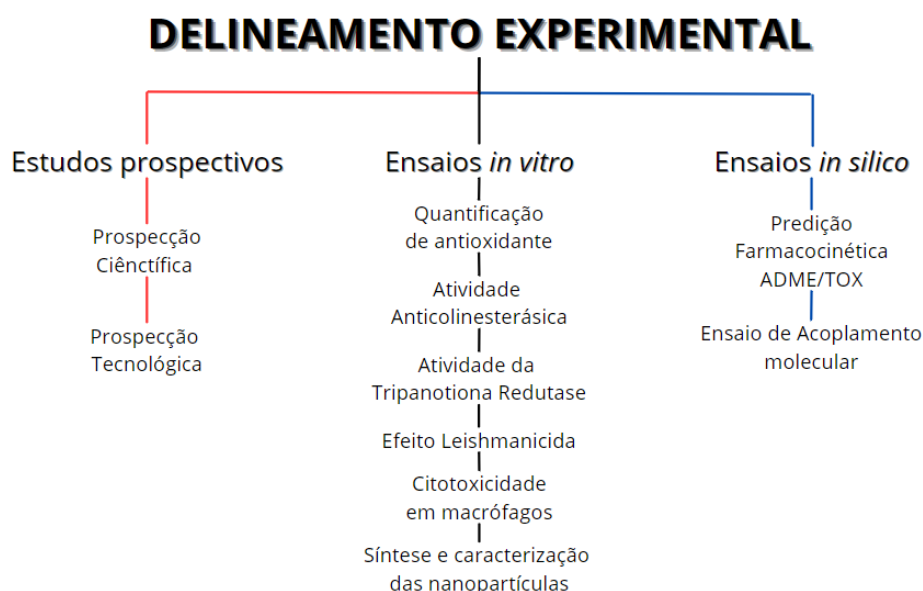
- Monitorar a prospecção comercial e científica: Busca racional na literatura;
- Avaliar com ferramentas de bioinformática os parâmetros ADME/TOX das moléculas de oxadiazol;
- Avaliar a atividade inibitória de enzimas importantes para o metabolismo do parasito
- Avaliar o efeito antileishmanial das moléculas a serem testadas sobre as formas promastigotas de *L. infantum* e *L. braziliensis*;
- Avaliar a citotoxicidade das moléculas e formulações, utilizando macrófagos da linhagem RAW 264.7;
- Fabricar e caracterizar fisicoquimicamente nanopartículas contendo oxadiazol;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Esse é um estudo de caráter experimental com metodologia *in silico* e *in vitro*. Inicialmente, foi feito um estudo prospectivo na literatura e em banco de dados de patentes. Logo após, os compostos foram analisados por abordagem computacional envolvendo precificação *in silico* ADME/TOX e docagem molecular e foram feitos testes *in vitro* a fim de ver o potencial efeito antioxidante e anticolinesterásica e antitripanotona das moléculas, bem como toxicidade em macrófagos e em promastigotas de *Leishmania spp.* O delineamento experimental está representado na figura abaixo:

Figura 10: Estratégia metodológica realizada no estudo.

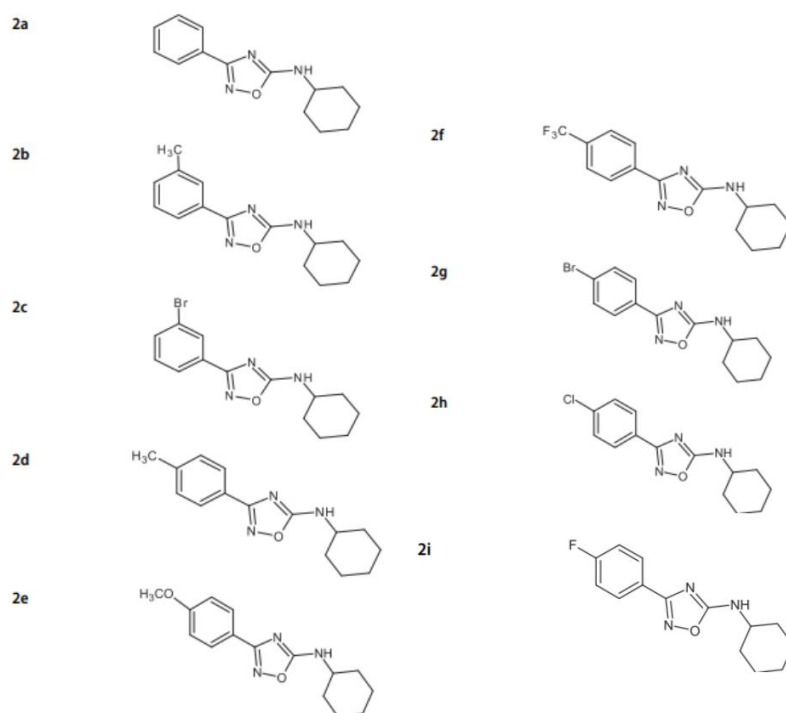


Esquema de delineamento experimental dividido em abordagens e técnicas utilizadas no estudo. **Fonte:** Elaborada pelo próprio autor.

4.2 Obtenção das moléculas

Os derivados sintéticos 1,2,4 oxadiazóis estudados foram sintetizados por irradiação de micro-ondas focalizada de acordo com De Oliveira *et al.* (2018) e gentilmente cedidos pelo Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A estrutura química dos oxadiazóis está representada na figura abaixo

Figura 11: Oxadiazóis sintetizados e utilizados para o estudo.



Fonte: De Oliveira *et al.* (2018)

4.3 Estudo prospectivo

4.3.1 Prospecção Científica

Escolheram-se os descritores de trabalho: “*oxadiazole**”, “*leishmania**” e “*therapeutic**”. Optou-se por usar a base de dados Web of Science e inglês como idioma de trabalho, foi adotado o caractere neutro (*) ao final de cada palavra-chave, para evitar a omissão de resultados devido ao plural e derivação das palavras. A ideia da utilização das aspas é afunilar os proventos e especificar o que é procurado. Para aprimorar os resultados encontrados, o descritor booleano AND foi utilizado com o intuito de encontrar resultados em comum contemplando dois ou mais termos.

4.3.2 Prospecção Tecnológica

Escolheram-se os descritores de trabalho: “*oxadiazole**”, “*leishmania**” e “*therapeutic**”. Optou-se por usar a base de dados Derwent Innovation Index (DII) e inglês como idioma de trabalho, foi adotado o caractere neutro (*) ao final de cada palavra-chave, para evitar a omissão de resultados devido ao plural e derivação das palavras. A ideia da utilização das aspas é afunilar os proventos e especificar o que é procurado. Para aprimorar os resultados encontrados, o descritor booleano AND foi utilizado com o intuito de encontrar resultados em comum contemplando dois ou mais termos.

4.4 Predição farmacocinética *in silico* ADME/TOX

Inicialmente, as moléculas de oxadiazol foram projetadas para obter os SMILES (Sistema de entrada de linha de entrada molecular simplificado), uma notação em cadeia usada para descrever a natureza e a topologia das estruturas moleculares. A anfotericina B (ANF B) foi utilizada como controle da droga, e obteremos seu SMILES canônico por meio do PubChem. A abordagem para prever as propriedades farmacocinéticas utilizada foi o pkCSM - Pharmacokinect, que se baseia em assinaturas baseadas em gráficos. O servidor da web está disponível em <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/>. Os SMILES de cada molécula foram apresentados ao servidor e comparados entre si.

4.5 Simulações de acoplamento molecular

Para realização das análises de docking molecular foi utilizado o software autodock versão 1.5.7. Inicialmente, as moléculas 2a e 2i passaram por um processo de transformação dos respectivos códigos SMILES mencionados nas seções anteriores em moléculas de entrada no formato PDB, para tanto, foi utilizado o software OpenBABEL. Como fármaco controle para validação do processo foi utilizada a fisostigmina retirada da base de dados PubChem sob código (ID: 5983). Nossa proteína de interesse foi a acetilcolinesterase retirada da base de dados Protein Data Bank sob código (ID:1EEA).

Para realização do docking molecular a proteína 1EEA e as respectivas moléculas utilizadas no estudo, foram preparadas retirando as moléculas de água, adicionando hidrogênio polar e as cargas de Gasteiger. Para verificação do requisito ideal de ligação os níveis considerados foram iguais ou inferiores a -6,0 kcal/mol, ademais utilizamos um outro critério que foi ($\text{RMSD} \leq 2.0 \text{ \AA}$) conforme relatórios de Mendes *et al.*, 2023. O mapa de interação entre a molécula e a proteína de interesse, além do mapa farmacoterápico que foram gerados a partir do software Discovery Studio Visualizer.

4.6 Quantificação da atividade antioxidante

O método de eliminação de radicais livres DPPH incorpora um radical livre metaestável que é capaz de aceitar radicais de hidrogênio de antioxidantes em solução. Embora o DPPH seja roxo profundo em solução, torna-se incolor em sua forma reduzida, daí a reação entre DPPH e um antioxidante pode ser monitorizado pela diminuição da absorvância do radical livre colorido. A atividade antioxidante foi aferida em placas de 96 poços de fundo chato utilizando leitor Elisa *BIOTEK*®, modelo ELX 800, software “*Gen5*®, V2.04.11”. Em placas de 96 poços, foram utilizadas as seguintes soluções por poço: 180 μL de solução metanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), 20 μL da amostra dissolvida no solvente de extração da amostra e diluída 10 vezes para obter concentração final de 0,2 mg/mL^{-1} . As diluições das amostras e dos padrões positivos utilizadas nas avaliações quantitativas em microplaca, partiram de solução mãe com concentração de 20 mg/mL foram: 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 3,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 1,56 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e 0,78 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A absorvância foi aferida a 490 nm até o total de 60 minutos de incubação. Como padrão negativo foi utilizado todas as soluções, excetuando-se a amostra. Foram extintos da análise os valores referentes às colorações naturais das moléculas. A porcentagem de inibição (PI%) foi calculada através da comparação das velocidades de reação das amostras em relação aos controles. O padrão utilizado como controle positivo é a quercetina. Os resultados expressos como porcentagem de inibição, calculada com a seguinte fórmula:

$$PI\% = \frac{AC - AS}{AC} \times 100$$

AC: Absorbância do controle DPPH no tempo 0

AS: Absorbância da amostra contendo DPPH no tempo 60 min

Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As amostras apresentaram coloração própria absorvida pelo espectro de onda de leitura, sendo assim, foram deduzidos os valores referentes à coloração. Após normalização dos dados foi realizado teste de curva de regressão não linear pelo programa estatístico GraphPad Prism v7.

4.7 Quantificação da atividade anticolinesterásica

A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi aferida em placas de 96 poços de fundo chato utilizando leitor Elisa *BIOTEK*®, modelo ELX 800, software “*Gen5*® V2.04.11”. Em placas de 96 poços, foram utilizadas as seguintes soluções por poço: 25 μL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM), 125 μL de 5,5’-ditiobis-[2-nitrobenzóico] na solução Tris/HCL (50nM, pH=8, com 0,1 M de NaCL e 0,02 M de $\text{MgCL}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. (3 mM de DTNB), 50 μL da solução Tris/HCL (50 nM, pH=8, com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA)), 25 μL da amostra dissolvida no solvente de extração da amostra e diluída 10 vezes na solução Tris/HCL (50 mM, pH=8) para obter uma concentração final de 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A absorbância foi aferida a 405 nm durante 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 25 μL da enzima acetilcolinesterase (0,25 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) e a absorbância foi aferida por minuto até o total de 25 minutos de incubação da enzima. Como padrão negativo foi utilizada todas as soluções, excetuando-se a amostra. As diluições das amostras e dos padrões positivos utilizadas nas avaliações quantitativas em microplaca, partiram de solução mãe com concentração de 20 mg/mL foram: 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 3,12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1,56 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e 0,78 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Foram extintos da análise os valores referentes às colorações naturais dos extratos. A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada através da comparação das velocidades de reação (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao branco (considerada atividade total da AChE, 100%). O padrão utilizado como controle positivo é a fisostigmina. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As amostras apresentaram coloração própria absorvida pelo espectro de onda de leitura, sendo assim, foram deduzidos os valores referentes à coloração. Após normalização dos dados foi realizado teste de curva de regressão não-linear pelo programa estatístico GraphPad Prism v.7.

4.8 Avaliação da atividade da tripanotona redutase recombinante

A avaliação da inibição da enzima tripanotona redutase foi realizada visando um provável mecanismo de ação leishmanicida, através da modulação do metabolismo redox do parasito ao qual essa enzima faz parte. Para os ensaios de placa, 250 μ L de volume final contendo a enzima em presença de tampão HEPES 40 mM e 1 mM EDTA a pH 7,5; 0,15 mM NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) 25 μ M DTNB [5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico)], 1 μ M T[S]₂ (Sal de trifluoacetato de tripanotona) e 10 μ L dos inibidores estudados (oxadiazóis 2a e 2i). A reação ocorreu com pré-incubação a 27°C durante 30 minutos e a leitura iniciada após adição de 25 μ M de DTNB em 412 nm utilizando espectrofotômetro *Eon Biotek*® e o software *Gen5*®, medindo-se a inclinação da curva durante 30 min. Os ensaios foram realizados em triplicata em 2 experimentos independentes testando 20 μ g/ml da enzima recombinante. Como controle negativo utilizou-se DMSO 1%. A determinação da concentração adequada de enzima para os testes de inibição enzimática foi definida pela inclinação da curva durante 30 min, selecionando o valor do r^2 da curva mais próxima à linearidade. Todos reagentes utilizados foram adquiridos da *SIGMA-Aldrich*®.

4.9 Parasitos

Formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (MHOM / BR / 1974 / PP75) foram doadas pela Coleção Biológica do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz, Brasil, e formas de *Leishmania infantum* (Ba262) foram cedidos gentilmente pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantida em condições de cultivo para os experimentos *in vitro*. As promastigotas foram mantidas em meio Schneider suplementado (10% soro bovino fetal, 2% de antibiótico, 1% urina masculina filtrada) (LGC Tecnologia) em incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 25°C, seguindo a curva de crescimento da fase logarítmica do parasita.

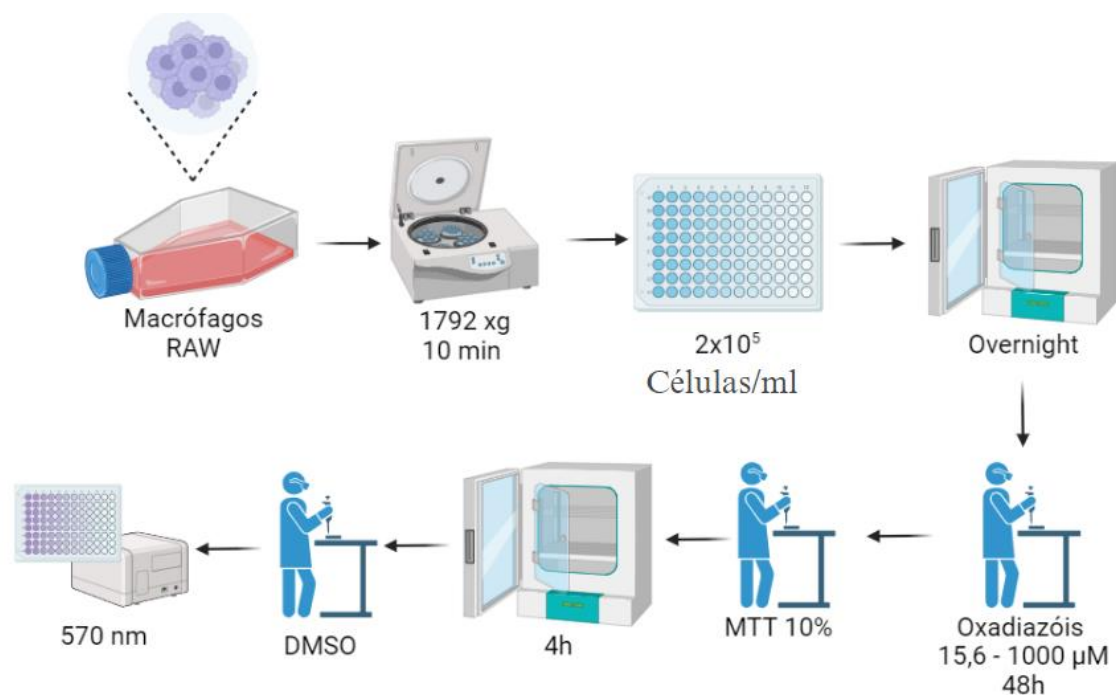
4.10 Cultivo, manutenção e atividade dos oxadiazóis sobre macrófagos

A avaliação da viabilidade celular foi realizada com macrófagos RAW 264.7 conforme a imagem 12 demonstra. O tratamento com as moléculas foi realizado

usando o sal MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- brometo de difenil tetrazólio). Culturas confluentes foram mantidas em meio RPMI, com Soro Fetal Bovino (FBS), lavada, tripsinizadas e centrifugadas a 1792 Xg por 10 min. A densidade celular foi ajustada para 2×10^5 células/mL e transferida para uma placa de fundo plano de 96 poços. Em seguida, as placas foram incubadas durante a noite (5% CO₂, 37 °C) e os poços foram tratados com os oxadiazóis em diferentes concentrações (7,8 a 1000 µM) por um período de 48h.

Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 1792 Xg por 10 min e a solução de MTT a 10% foi adicionada. As placas foram incubadas por 4hs (5% CO₂, 37 °C) e após uma nova rodada de centrifugação a 1792 Xg por 10 min, DMSO foi adicionado para solubilização, então as placas foram agitadas suavemente e lidas a 570 nm em um leitor espectrofotométrico. Como controle negativo, foi utilizado apenas células incubadas em meio de cultura com 1% de DMSO (diluyente). Como controle positivo, DMSO a 25% foi utilizado. A viabilidade das células foi expressa em porcentagem (%) em relação ao controle negativo com intervalo de confiança de 95%. A CC₅₀ foi determinada por meio da regressão não linear. Logo após, o índice de seletividade foi obtido através da fórmula CC_{50}/IC_{50} .

Figura 12: Ensaio de viabilidade celular.



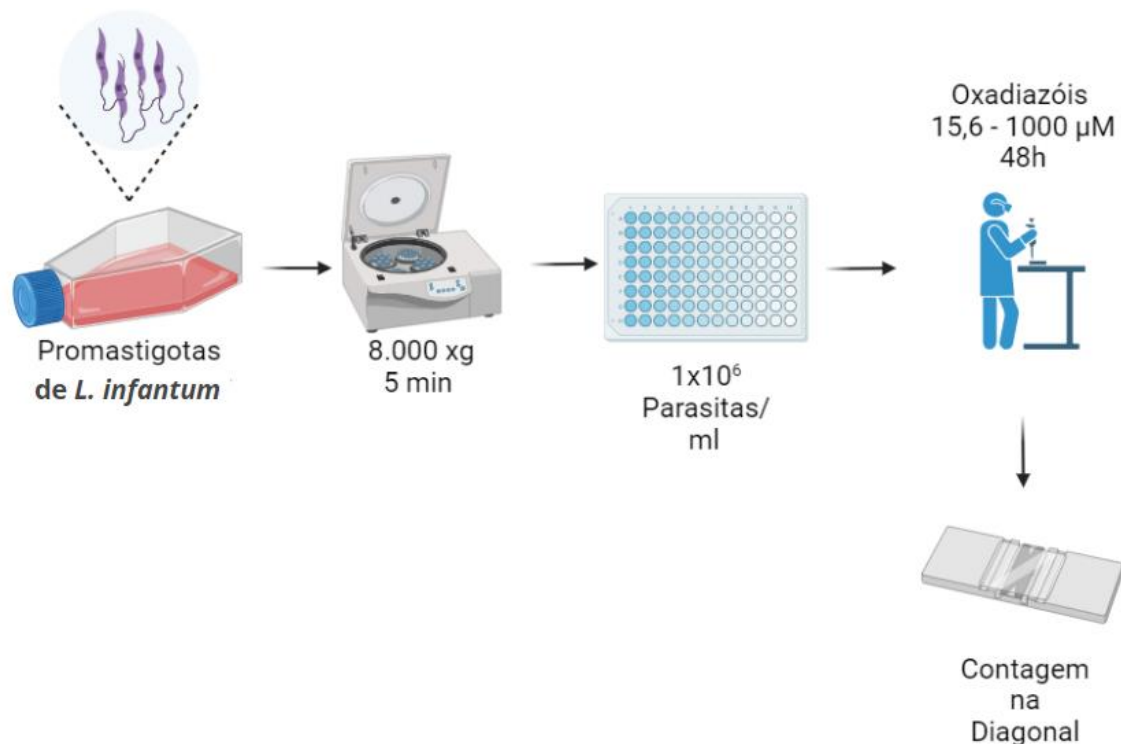
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

4.11 Avaliação da atividade dos oxadiazóis sobre as formas promastigotas

Diferentes concentrações dos oxadiazóis (7,8 a 1000 μM) diluídas em até 1% de Dimetilsulfóxido (DMSO) foram usadas. O volume em cada poço da placa de 96 poços foi de 200 μL (4 μL de cada molécula e 196 μL do parasito). Para o controle positivo específico de morte foi utilizado o fármaco ANF B (16 μg / mL), já o controle negativo foi utilizado DMSO 1%.

Resumidamente, as formas promastigotas do parasito em um frasco de cultura com meio Schneider foram transferidas para um tubo plástico estéril e centrifugadas por 15 minutos a 700 Xg. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 1mL de meio Schneider suplementado. A contagem dos parasitos foi realizada em Câmara de Neubauer na diagonal, diluindo-se as amostras em Azul de Tripán e formol. Uma concentração de 1×10^6 parasitas foi então semeada e distribuída em uma placa estéril de 96 poços; em seguida, foi adicionada a molécula e após 24 horas as contagens foram realizadas na câmara de Neubauer. A viabilidade do parasita foi expressa em porcentagem (%) em relação aos promastigotas incubados em meio (controle) com o intervalo de confiança de 95%.

Figura 13: Avaliação da atividade leishmanicida dos oxadiazóis.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A fim de padronizar o ensaio de MTT com promastigotas de *leishmania spp*, um estudo foi realizado. O tratamento com as moléculas foi realizada usando o sal MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- brometo de difenil tetrazólio). Após a centrifugação a 1792 xg por 10 min, a densidade parasitária foi ajustada para 1×10^6 parasitos/mL e transferida para uma placa de fundo plano de 96 poços. Em seguida, os poços foram tratados com os oxadiazóis em diferentes concentrações (7,8 a 1000 μ M) por um período de 24h.

Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 1792 xg por 10 min e a solução de MTT a 10% foi adicionada. As placas foram incubadas por 4hs (25 °C) e após uma nova rodada de centrifugação a 1792 xg por 10 min, DMSO foi adicionado para solubilização, então as placas foram agitadas suavemente e lidas a 570 nm em um leitor espectrofotométrico. Como controle negativo, foram utilizados parasitos incubados em meio de cultura com 1% de DMSO (diluyente). Como controle positivo, afotericina B foi utilizado. A IC50 foi determinada por meio da regressão não linear, log (inibitor) VS resposta normalizada (variable slop).

4.12 Preparação das nanopartículas contendo oxadiazóis

4.12.1 Síntese de nanopartículas

Para atingir o objetivo de desenvolver as nanopartículas, foi utilizada a técnica microfluidica da plataforma NanoAssemblr (CHIESA *et al*, 2018). Trata-se de um instrumento de bancada que usa mistura microfluidica acionada por computador e bombas controladas, para oferecer um alto grau de controle sobre o solvente/antissolvente do processo de nanoprecipitação e, portanto, apresenta a capacidade de otimizar racionalmente as propriedades das nanopartículas. O primeiro parâmetro do instrumento é a vazão total (TFR) que controla a velocidade em que as fases aquosas e solvente são misturadas dentro do cartucho microfluidico. O segundo parâmetro do instrumento é a taxa de vazão (FRR) que controla a proporção de mistura das fases aquosas e solventes. Manipulando estes parâmetros e as quantidades de volumes e concentrações, obteremos o desenvolvimento controlado e otimizado de nanopartículas.

As nanopartículas de PLGA foram preparadas usando um misturador microfluídico com o instrumento NanoAssemblTMBenchtop, misturando volumes apropriados de soluções de PLGA em acetonitrila com soluções aquosas contendo PVA. Optou-se por utilizar os oxadiazóis mais promissores (2a e 2i) para encapsular. Resumidamente, o PLGA foi dissolvido em acetonitrila a uma concentração de 5 mg/mL, enquanto o PVA foi dissolvido em água deionizada a uma concentração de 2% p/v. Para a síntese de nanopartículas de PLGA, a solução de PLGA em acetonitrila foi injetada através de uma entrada do misturador microfluídico, enquanto a solução de PVA 2% p/v foi injetada através da outra entrada do misturador microfluídico. O volume total da formulação, razão de vazão aquosa: orgânica (FRR) e a vazão total (TFR) foram fixados em 2 mL, 1:1 e 8 mL/min, respectivamente. As nanopartículas de PLGA foram coletadas no tubo de coleta de amostras descartando um volume inicial e final de resíduos de 0,25 e 0,05 mL, respectivamente. A amostra coletada foi então dialisada contra 1L de água deionizada usando uma bolsa de diálise (MWCO - 10.000) por 12 h trocando o meio de diálise duas vezes nas primeiras 4 h. Para o encapsulamento dos oxadiazóis (2a e 2i), as moléculas foram dissolvidas em uma solução estoque de PLGA em acetonitrila de forma que a concentração de PLGA seja de 5 mg/mL e a relação molécula/polímero w/w seja de 1/400. A solução oxadiazol-PLGA em acetonitrila foi então injetada através de uma entrada do misturador microfluídico, enquanto a solução de PVA 2% p/v foi injetada através da outra entrada do misturador microfluídico para formar nanopartículas usando os mesmos parâmetros listados acima. As amostras foram dialisadas conforme mencionado acima, seguidas de centrifugação a 8.000 Xg por 5 minutos para remover e/ou precipitar o oxadiazol livre.

A oportunidade de utilizar a tecnologia microfluidica aqui proposta proporcionam uma diminuição nas tentativas de formulações e leva à automatização do preparo. Essa plataforma, pioneira no Brasil, foi adquirida em 2019 pela Fiocruz-CE e estará disponível para o alcance desse objetivo. Diferentes concentrações da molécula na fase aquosa do sistema serão empregadas para a padronização da concentração do ativo.

4.12.2 Análise de Rastreamento de Nanopartículas

A Análise de Rastreamento de Nanopartículas (ARN) é utilizada para mensurar o tamanho e a concentração de partículas. O crescente uso desta metodologia

trouxe à necessidade de reduzir a variabilidade e a contribuição do usuário, oferecendo consistência interlaboratorial em termos de medidas de concentração e tamanho. Para obter medições de concentrações precisas e reproduzíveis em diferentes tipos de nanopartículas, a metodologia de medição da ARN vem sendo constantemente atualizada. (FILIPE *et al.*, 2010).

As características físico-químicas (diâmetro, tamanho, polidispersividade, potencial Zeta e concentração de partículas por mL) foram determinadas a partir de 5 medições utilizando-se o equipamento Nanosight, ns-500 Malvern diluindo 50 µL da formulação de nanopartículas preparada com 300 µL de água deionizada e medida a 25°C. Este possibilita o rastreamento, em tempo real, de partícula a partícula, através da NTA, uma técnica usada para medir e analisar o tamanho e a concentração de partículas únicas, acompanhando em vídeo o movimento browniano das nanopartículas. Uma vez quantificado o tamanho das nanopartículas, calculou-se o Índice SPAN usando a fórmula $[(D90 - D10)/D50]$.

4.13 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Os dados numéricos foram expressos como média ± erro padrão médio (EPM) e analisados por *one-way* ANOVA seguido de pós-teste de Dunnet e/ou pós-teste de Tukey. A análise foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism® versão 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Estudos prospectivos

5.1.1 Prospecção científica

Pode-se concluir que apesar da grande quantidade de artigos sobre *leishmania*, há somente oito artigos que relacionam *leishmania*, terapia e oxadiazol.

Tabela 1: Número de artigos de acordo com os descritores utilizados na base de dados Web of Science de 1951 a 2024.

DESCRITORES	QUANTIDADE DE ARTIGOS
“therapeutic*”	2.367.002
“leishmania*”	27.614
"oxadiazole*"	6.726
"therapeutic*" AND "leishmania*"	6.024
"therapeutic*" AND "oxadiazole*"	1825
"leishmania*" AND "oxadiazole*"	24
“therapeutic*” AND “oxadiazole*” AND “leishmania*”	8

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2: Artigos relacionados com os descritores “therapeutic*” AND “oxadiazole*” AND “leishmania*”.

AUTORES	CEPAS	MECANISMO DE AÇÃO	IC ₅₀ e maior SI	CONTROLE POSITIVO
Chauvière et al. (2003)	Amastigotas de <i>L. donovani</i> e <i>L. infantum</i>	-	Melhor resultado Megazol 60% inibição a 3,1µM	Estiboglucato de sódio ED ₅₀ 10 µM
Steert et al. (2010)	Cisteino protease recombinante de <i>L. mexicana</i>	Inibição da Cisteino protease, entretanto não apresentou atividade leishmanicida relevante <i>in vitro</i>	Um 1,2,4 Oxadiazol IC ₅₀ 51 nm	Mu-K11777 IC ₅₀ 0,027mM
Dürüst et al. (2012)	Amastigotas axênicas de <i>L. donovani</i>	-	11 compostos com 1,2,4 oxadiazol IC ₅₀ 1,6-4,5 µg/ml	Mitefosina IC ₅₀ 0,171µg/ml
Hernández et al.	Amastigotas	-	9	ANF B

(2013)	axênicas de <i>L. amazonensis</i>		derivados Furoxanos IC ₅₀ Entre 1,3 e 25,3µM SI 235	IC ₅₀ 0,11µM SI 13
Dutra <i>et al.</i> (2014)	Amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	Geração de óxido nítrico no meio (7,8% a 27,4%)	15 derivados furoxanos IC ₅₀ 2,12-8,22 µg/ml SI 5,56-54,05	ANF B IC ₅₀ 4,92 µg/ml SI 4,69
Chaves <i>et al.</i> (2017)	Amastigotas de <i>L. infantum</i>	-	10 compostos IC ₅₀ 0,97 – 4,25µM SI 5,53	ANF B IC ₅₀ 0,09 SI 133
Taha <i>et al.</i> (2017)	Amastigotas de <i>Leishmania major</i>	Inibição da Pteridina Redutase	13 oxadiazol-fenilhidrazona IC ₅₀ Entre 0,95–78,6µM SI 105,3	Pentamidina IC ₅₀ 7,02 µM SI 1,10
Galbiati <i>et al.</i> (2021)	Promastigotas de <i>L. infantum</i> e <i>L. tropica</i>	Teorizou, mas não confirmou a inibição da GAPDH.	22 derivados de 3-Br-isoxazolina IC ₅₀ Entre 0,29 e 60,3 µM SI 129	ANF B IC ₅₀ 0,11 µM

É possível visualizar significativa atividade leishmanicida dos compostos contendo oxadiazóis em diferentes cepas (*L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*), e sua atividade leishmanicida pode estar relacionada com inibição de enzimas importantes para a sobrevivência do parasito (GAPDH, Cisteína protease e Pteridina Redutase) ou pelo aumento de óxido nítrico que também pode estar relacionado à inibição de outra enzima importante (Tripanotona redutase) (BOCEDI *et al.*, 2010).

5.1.2 Prospecção tecnológica

Pode-se constatar que os termos "oxadiazole*" AND "leishmania*" AND "therapeutic*" apresentam individualmente um número considerável de patentes. Entretanto ao combinar os três termos tem-se somente 2 resultados.

Tabela 3 - Número de patentes encontradas de acordo com os descritores utilizados encontrados na base de dados *Derwent Innovations Index* de 1951 a 2024.

DESCRITORES	NÚMERO DE PATENTES
“therapeutic*”	293.586
"leishmania*"	3.052
"oxadiazole*"	8.293
"therapeutic*" AND "leishmania*"	622
"therapeutic*" AND "oxadiazole*"	436
"leishmania*" AND "oxadiazole*"	24
"oxadiazole" AND "leishmania*" AND "therapeutic*"	2

Fonte: Elaborado pelo autor.

As únicas duas patentes são de posse dos mesmos inventores (SAIKUMAR, PNG; PRASAD, A; NAREMADDEPALLI, S; RACHANDRA, M). Dentre as áreas temáticas, as patentes estão incluídas em 3: Agricultura, química e farmácia e farmacológica. Quanto as empresas depositantes, as 2 patentes são de detenção da mesma empresa que é a Aurigene Discovery Technologie Ltd. De acordo com o código internacional de patentes (IPC) as 2 patentes encontradas apresentaram a seguinte distribuição: A61K-031/4245 (Preparações para fins médicos, dentários ou de excremento); C07d (Compostos orgânicos heterocíclicos); A61p (atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais), esta última abrange somente uma das patentes (WO2018051255-A1).

5.2 Predição farmacocinética ADME/TOX

Os valores da predição farmacocinética dos oxadiazóis e do fármaco de referência (ANF B) estão expressas nas tabelas 4, 5 e 6 a seguir:

Tabela 4: Valores dos parâmetros ADME/TOX dos oxadiazóis (2a, 2b e 2c) gerados pelo servidor pkCSM Pharmacokinetics:

	Parâmetros avaliados	2a	2b	2c	Unidade	Valores de referência
	Solubilidade aquosa	-3.818	-4.254	-4.807	log.mol/L	-
	Permeabilidade celular (Caco2)	1.328	1.342	1.374	Log Papp10 ⁻⁶ cm/s	Alto >0,90
Absorção	Absorção intestinal (humana)	93.123	93.534	92.008	% absorção	Baixo<30 %
	Absorção epitelial	-2.735	-2.766	-2.785	log Kp	-
	Volume de distribuição (humana)	0.155	0.445	0.407	log L/kg	Alta>0,45
Distribuição	Fração não-ligada	0.277	0.28	0.254	Fu	-
	Permeabilidade à barreira hematoencefálica	0.173	0,109	0.095	logBB	>0.3 Atravessa BHE
	Permeabilidade ao sistema nervoso central	-2.119	-2776	-2.795	log PS	-
Metabolismo	Substrato do citocromo P450 CYP3A4	Sim	Não	Não	-	-
	Inibidor do citocromo P450CYP1A2	Sim	Sim	Sim	-	-
	Inibidor do citocromo P450CYPC19	Sim	Sim	Sim	-	-
Excreção	Eliminação total	0.369	0,798	0,069	logml/min/kg	-

	Toxicidade de AMES	Não	Não	Não	-	-
	Inibidor de hERG1	Não	Não	Não	-	-
	Inibidor de hERG2	Não	Não	Não	-	-
Toxicidade	Hepatotoxicidade	Não	Sim	Não	-	-
	Sensibilização da pele	Não	Não	Não	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 5: Valores dos parâmetros ADME/TOX dos oxadiazóis (2d, 2f) e o fármaco de referência (ANF B) gerados pelo servidor pkCSM Pharmacokinetics:

	Parâmetros avaliados	2d	2f	ANF B	Unidade	Valores de referência
	Solubilidade aquosa	-4.61	-3.149	-2.937	log.mol/L	-
	Permeabilidade celular (Caco2)	1.386	1.412	1.13	Log Papp10 ⁻⁶ cm/s	Alto >0,90
Absorção	Absorção intestinal (humana)	91.288	91.9	0	% absorção	Baixo<30 %
	Absorção epitelial	-2.604	-2.521	-2,735	log Kp	-
	Volume de distribuição (humana)	0.371	0.233	-0,37	log L/kg	Alta>0,45
Distribuição	Fração não-ligada	0.221	0.211	-2,058	Fu	-
	Permeabilidade à barreira hematoencefálica	0.184	0.389	-3,718	logBB	>0.3 Atravessa BHE
	Permeabilidade ao sistema nervoso central	-1,855	-2.831	-1,768	log PS	-
Metabolismo	Substrato do citocromo P450 CYP3A4	Sim	Sim	Não	-	-
	Inibidor do citocromo P450 CYP1A2	Sim	Sim	Não	-	-
	Inibidor do citocromo P450 CYPC19	Sim	Sim	Não	-	-
Excreção	Eliminação total	0,07	0.336	-1,495	logml/m in/kg	-
	Toxicidade de AMES	Não	Sim	Não	-	-

	Inibidor de hERG1	Não	Não	Não	-	-
	Inibidor de hERG2	Não	Não	Não	-	-
Toxicidade	Hepatotoxicidade	Não	Sim	Não	-	-
	Sensibilização da pele	Não	Não	Não	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6: Valores dos parâmetros ADME/TOX dos oxadiazóis (2g, 2h e 2i) gerados pelo servidor pkCSM Pharmacokinetics:

	Parâmetros avaliados	2g	2h	2i	Unidade	Valores de referência
	Solubilidade aquosa	-4.507	-4.617	-4,014	log.mol/L	-
	Permeabilidade celular (Caco2)	1.383	1.388	1.35	Log Papp10 ⁻⁶ cm/s	Alto >0,90
Absorção	Absorção intestinal (humana)	91.263	91.196	92.165	% absorção	Baixo<30 %
	Absorção epitelial	-2.593	-2.588	-2.698	log Kp	-
	Volume de distribuição (humana)	0,334	0,35	0,178	log L/kg	Alta>0,45
Distribuição	Fração não-ligada	0,225	0,219	0,26	Fu	-
	Permeabilidade à barreira hematoencefálica	0,183	0,182	0,176	logBB	>0.3 Atravessa BHE
	Permeabilidade ao sistema nervoso central	-1,878	-1,855	-2.031	log PS	-
Metabolismo	Substrato do citocromo P450 CYP3A4	Sim	Sim	Sim	-	-
	Inibidor do citocromo P450CYP1A2	Sim	Sim	Sim	-	-
	Inibidor do citocromo P450CYPC19	Sim	Sim	Sim	-	-
Excreção	Eliminação total	-0,027	-0,049	0,095	logml/min/kg	-
	Toxicidade de AMES	Não	Não	Sim	-	-
	Inibidorde hERG1	Não	Não	Não	-	-
	Inibidorde hERG2	Não	Não	Não	-	-

Toxicidade	Hepatotoxicidade	Não	Não	Não	-	-
	Sensibilização da pele	Não	Não	Não	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

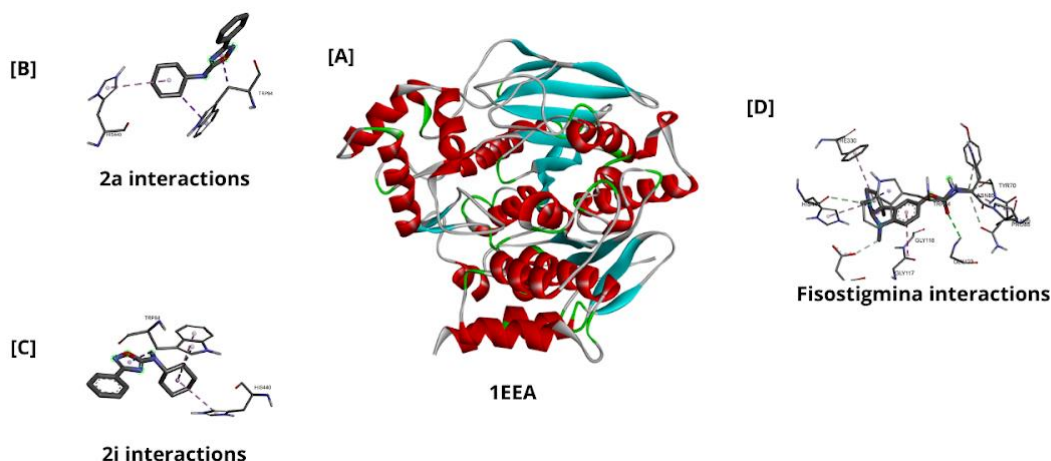
Fazendo uma análise da previsão farmacocinética dos oxadiazóis em comparativo com o fármaco de referência (ANF B), podemos destacar alguns dados interessantes das tabelas 4, 5 e 6. Os oxadiazóis em geral apresentaram-se hidrofóbicos, uma vez que tiveram resultados negativos para hidrossolubilidade ($0 \log \text{mol/L} > \text{Oxadiazóis}$). A permeabilidade em células do adenocarcinoma colorretal humano foram considerados altos, baseado na literatura (Alto $> 0,90 \log \text{Papp} 10^{-6} \text{cm/s}$). A absorção intestinal (humana) corrobora os resultados supracitados uma vez que todos os oxadiazóis demonstraram valores altos (Baixo $< 30 \%$). Entretanto os oxadiazóis de 2a a 2i apresentaram baixa absorção epitelial (-2.604; -2.521; -2.735; -2.604; -2.521; -2.593; -2.588; -2.698 $\log K_p$) respectivamente.

Em relação ao volume de distribuição humana, em geral os oxadiazóis apresentaram valores mais altos que o fármaco de referência (Anfotericina B), apresentando números relativamente altos (Alto $> 0,45 \log \text{L/kg}$) com exceção para 2a, 2f e 2i (0.155; 0.233; 0,178 $\log \text{L/kg}$) respectivamente. Dos oxadiazóis que conseguem atravessar a barreira hemato encefálica, podemos inferir que somente a 2f (0.389 $\log \text{BB}$) tem essa capacidade ($> 0.3 \log \text{BB}$ Atravessa a BHE).

Na metabolização, devido à semelhança morfológica, é possível inferir que todos os oxadiazóis são substratos do CYP3A4 (exceto 2b e 2c) e inibidores dos CYP1A2, CYP19. Nenhum oxadiazol apresentou-se como Inibidor dos canais de potássio dependentes de voltagem hERG (*human ether-a-go-go related*) que são essenciais para a atividade elétrica cardíaca. Em apenas 2 oxadiazóis podemos inferir que apresentaram hepatotoxicidade (2b e 2f) e em nenhum oxadiazol demonstrou sensibilização da pele, sendo interessante para caso venha ser um tratamento de administração tópica. Por fim, somente dois oxadiazóis estudados apresentaram toxicidade de AMES (2f e 2i).

5.3 Os oxadiazóis demonstraram afinidade ao sítio ativo da enzima acetilcolinesterase através da simulação de acoplamento molecular

Figura 14: Acoplamento molecular e interação entre as moléculas e a proteína acetilcolinesterase



Legenda: Em [A] Representação da proteína cristalizada da acetilcolinesterase (ID: 1EEA); Em [B] interação entre aminoácidos da proteína e a molécula 2a; Em [C] interação entre a molécula 2i e a proteína 1EEA; Em [D] grupo controle contendo as interações da proteína com o fármaco de referência.

Figura 15: Mapa farmacotrópico das interações presentes entre as moléculas e a acetilcolinesterase

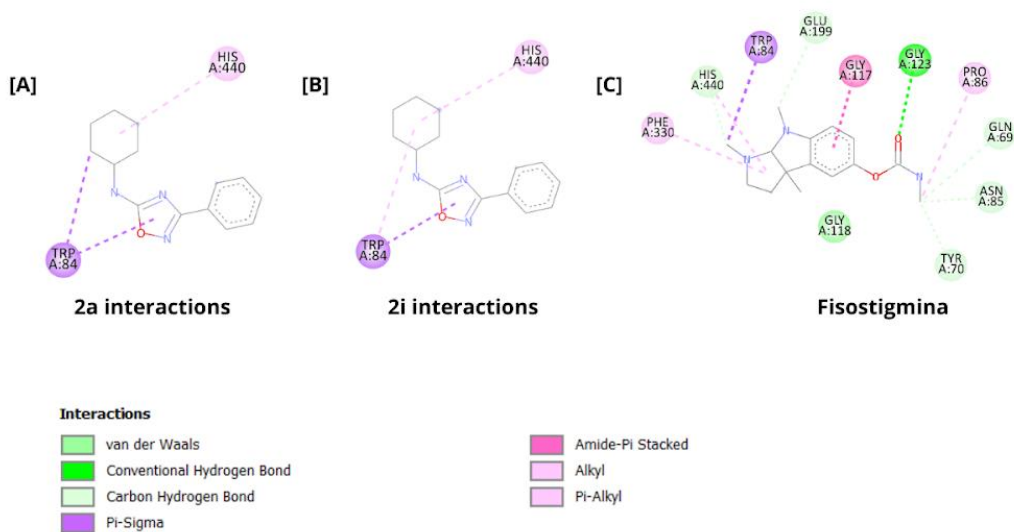


Tabela 7: Energia de ligação e RMSD da acetilcolinesterase em acoplamento com as moléculas 2a e 2i.

Ligantes	Bindingenergy (Kcal/mol)	RMSD (Å)
2a	-7.36	0.02
2i	-7.39	0.14
Fisostigmina	-6.66	0.22

Os dados referentes ao acoplamento molecular da acetilcolinesterase evidenciaram um provável mecanismo de ação das moléculas na enzima. Os valores de energia de ligação estavam dentro do aceitável, além disso, os compostos 2a e 2i exibiram uma energia de ligação superior ao fármaco de referência fisostigmina (-7.36 kcal/mol; -7.39 kcal/mol; -6.66 kcal/mol) conforme mostrado na tabela 7. Ademais, em todas as moléculas os valores de RMSD foram inferiores a 2.0 respectivamente (0.02 Å; 0.14 Å; 0.22 Å) mostrando dessa forma uma confiabilidade no acoplamento. A figura 14 demonstra a complexação das moléculas 2a, 2i e fisostigmina frente à proteína acetilcolinesterasa.

A fim de investigar as interações presentes nas moléculas, traçamos um mapa de interações conforme mostra a figura 15. A molécula 2a realiza ligações do tipo Pi-Sigma com o triptofano 84 e do tipo alquil com a histidina 440. A molécula 2i também mostrou possuir ligações Pi-Sigma com triptofano 84 e do tipo alquil com a histidina 440 e triptofano 84. Por sua vez, a fisostigmina apresentou o maior número de interações no sítio ativo da enzima, dentre elas podemos citar ligação alquil com a Fenilalanina 330, histidina 440 e prolina 86; ligações do tipo carbono hidrogênio com os aminoácidos Histidina 440, Glutamato 199, Glicina 69, Asparagina 85 e tirosina 70; ligação do tipo Pi-Sigma com o triptofano 84; ligação de amida com a glicina 117 e uma ligação de hidrogênio convencional com a glicina 123.

5.4 Os oxadiazóis demonstraram atividade antioxidante promissora

Tabela 8: Efeito antioxidante dos oxadiazóis (2g, 2h e 2i) frente aos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazi).

AMOSTRA	IC ₅₀ µg/mL	Std.Error	R ²
QUERCETINA	0,95	0,032	0,990
2g(Br)	6,90	0,057	0,997
2H(Cl)	8,76	0,097	0,997
2i (F)	12,10	0,011	0,998

Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos os oxadiazóis presentes na tabela 8 apresentaram-se como antioxidantes frente ao radical DPPH, sendo a 2g a mais promissora com IC₅₀ de 6,90 mg/mL.

5.5 Os oxadiazóis apresentaram atividade antiacetilcolinesterásica

Tabela 9: Efeito inibitório da enzima Acetilcolinesterase (AChE) por parte dos oxadiazóis (2g, 2h e 2i).

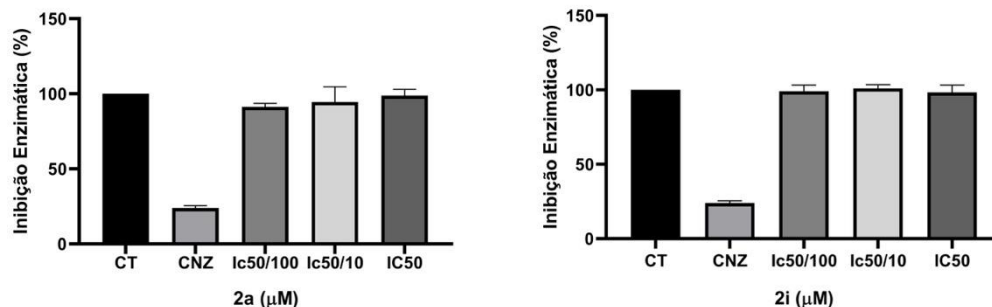
AMOSTRA	IC ₅₀ µg/mL	Std.error	R ²
FISOSTIGMINA	1,15	0,047	0,996
2g (Br)	20,54	0,035	0,993
2H(Cl)	8,58	0,052	0,999
2i(F)	11,91	0,078	0,998

Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos os oxadiazóis presentes na tabela 9 apresentaram atividade antiacetilcolinesterásica, com destaque para a molécula 2h, que apresentou uma IC₅₀ de 8,58 µg/mL.

5.6 Os oxadiazóis não inibiram significativamente a enzima tripanotona redutase

Figura 16: Ação inibitória das moléculas 2a e 2i sobre a tripanotona redutase

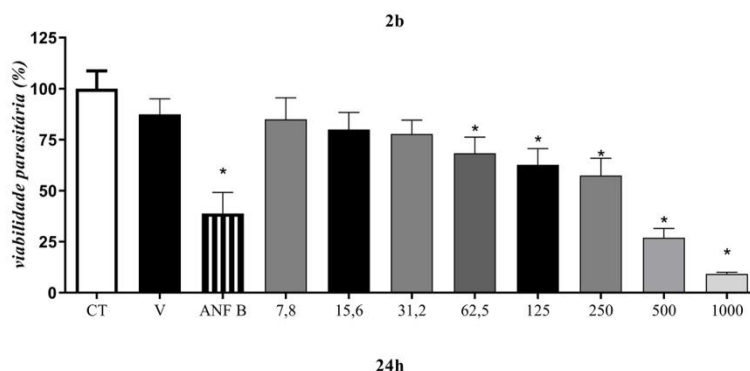


Legenda: A figura representa a inibição da enzima tripanotona redutase expresso em porcentagem (%). CT = grupo controle; CNZ = controle positivo (Clonazepan). Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

As moléculas 2a e 2i não apresentaram inibição significativa da enzima tripanotona redutase recombinante em nenhuma das concentrações abordadas nesse estudo.

5.7 Oxadiazóis como potentes agentes leishmanicidas e pouco citotóxicos para macrófagos

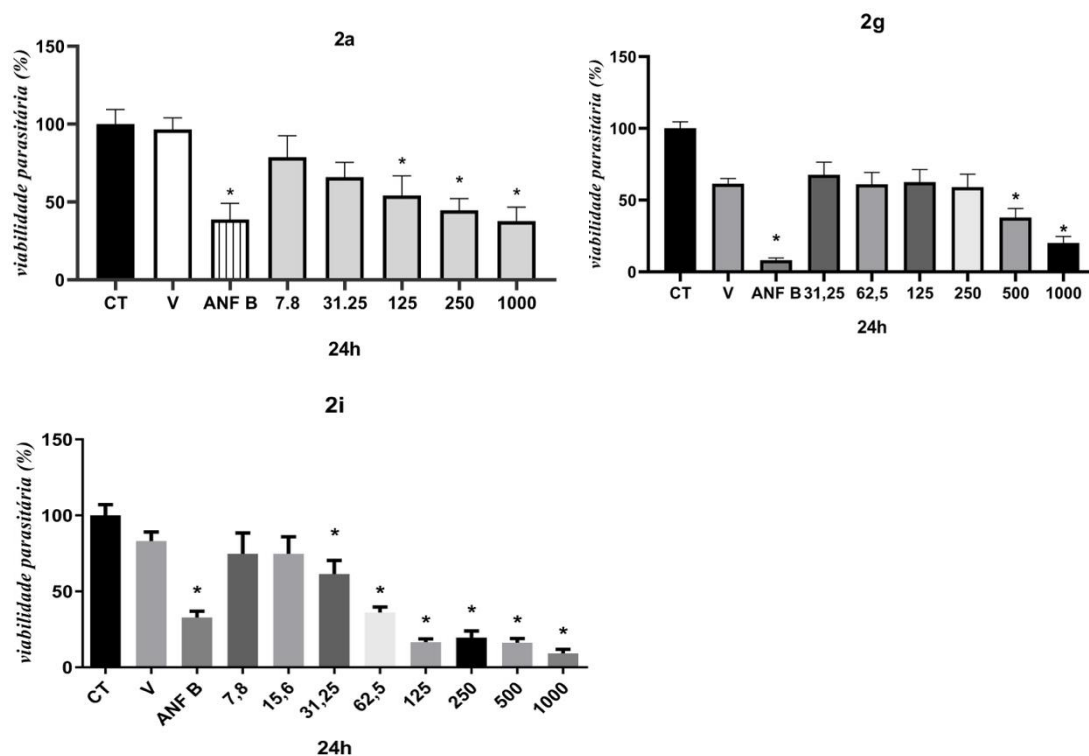
Figura 17: Ação leishmanicida em promastigotas de *L. braziliensis*.



Legenda: A figura representa o tratamento por 24 horas e avaliada pelo método colorimétrico MTT. CT = grupo controle; V = grupo veículo (DMSO 1%). Os dados foram expressos em μM como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Molécula 2b demonstrou significativa atividade leishmanicida em diferentes concentrações: de 7,8 μM a 1000 μM , apresentando uma IC_{50} de 180.8 μM .

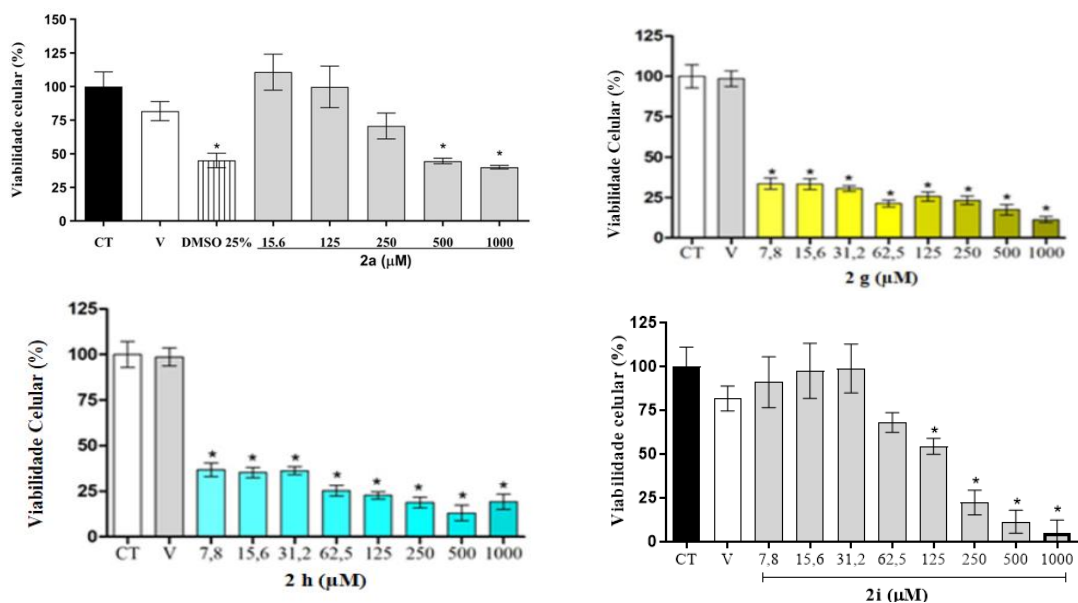
Figura 18: Ação leishmanicida em promastigotas de *L. infantum* testadas pelo método de contagem direta com as moléculas 2a, 2g e 2i.



Legenda: As figuras representam o tratamento por 24 horas. CT = grupo controle; V = grupo veículo (DMSO 1%). Os dados foram expressos em μM como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

As moléculas 2a, 2g e 2i apresentaram significativa atividade leishmanicida em diferentes concentrações com uma IC_{50} de 17,95 μM , 88,83 μM e 30,86 μM respectivamente. Os grupos controles DMSO 1% (V) não apresentaram toxicidade aos parasitos.

Figura 19: Efeito citotóxico dos oxadiazóis 2a, 2g, 2h e 2i em macrófagos RAW



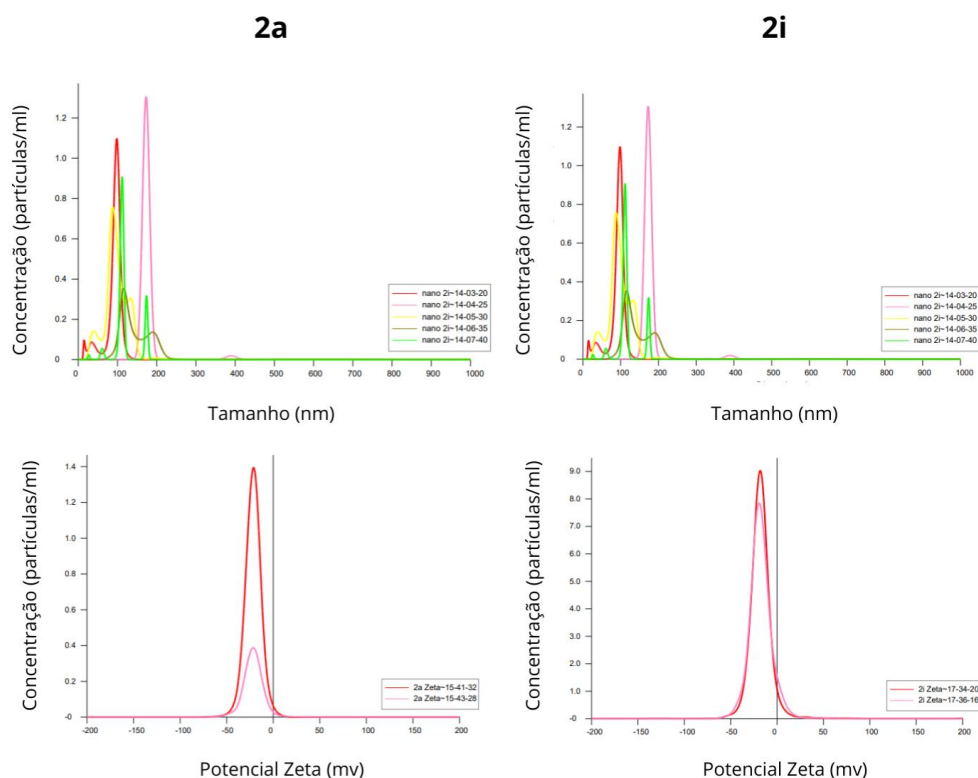
Legenda: As figuras representam o tratamento por 48 horas. CT = grupo controle; V = grupo veículo (DMSO 1%). Os dados foram expressos em μM como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

De acordo com os gráficos gerados, obteve-se a concentração capaz de causar citotoxicidade em 50% das células (CC_{50}). Para a molécula 2a, 2h, 2g, 2i, os seguintes valores de CC_{50} foram encontrados: 558 μM ; 35,47 μM ; 10,84 μM ; 485,5 μM respectivamente. Os oxadiazóis 2a e 2i ganharam destaque e apresentaram valores de índice de seletividade (SI) muito significativos: 31,08 e 15,73.

5.8 Fabricação e caracterização físico-química de nanopartículas com oxadiazóis

Com base nos resultados supracitados, duas moléculas demonstraram uma maior seletividade para o parasito *L. infantum* (2a; 2i). Devido a isso, foram selecionadas para serem encapsuladas com nanopartículas de PLGA.

Figura 20: Propriedades físico-químicas das nanopartículas contendo os oxadiazóis.



Legenda: A figura representa as características físico-químicas das nanopartículas contendo os oxadiazóis 2a e 2i. Os dados foram expressos como média \pm EPM.

Tabela 10: Dados físico-químicos das nanopartículas de PLGA.

-	Concentração (partículas/ml)	Média do Tamanho (nm)	Potencial Zeta (mv)	D10 D50 D90	Índice SPAN
2a	5.79×10^8 +/- 3.18×10^8	155.5 +/- 17.5	-21.6 +/- 0.1	121.2 +/- 20.4 149 +/- 17.3 188.9 +/- 20.3	0.45
2i	2.63×10^8 +/- 4.19×10^7	127.7 +/- 16.5	-17.9 +/- 0.0	97.5 +/- 19 122 +/- 14.6 160.09 +/- 16.9	0.51

Fonte: Elaborado pelo autor.

A molécula 2a foi encapsulada na concentração de 2x a IC_{50} onde obtemos nanopartículas com uma concentração de 5.79×10^8 partículas/ml, com um tamanho médio de 155.5 nm e um potencial zeta de -21.6 mv. Já o oxadiazol 2i, alcançamos uma concentração de 2.63×10^8 partículas/ml, com um tamanho médio de 127.7 nm e um potencial zeta de -17.9 mv. Relacionando os valores de D90, D10 e D50 foi possível obter a distribuição de tamanhos (Índice SPAN), sendo que quanto maior for o resultado, maior vai ser a polidispersão da amostra. As nanopartículas de 2a e 2i apresentaram um índice de SPAN de 0.45 e 0.51 respectivamente.

6. DISCUSSÃO

A leishmaniose é a segunda infecção parasitária mais prevalente, perdendo somente para malária e está entre as doenças classificadas como doenças negligenciadas devido ao acomentimento de países subdesenvolvidos e aos tratamentos que são antigos, tóxicos, necessitando de um longo período de administração parenteral, todavia nem sempre são eficientes. (BAQUEDANO *et al.*, 2016). Por conta disso, pesquisadores vêm tentando desenvolver um tratamento alternativo para esta condição patológica, e uma das classes de moléculas que vêm sendo amplamente estudadas devido a sua atividade biológica leishmanicida, como foi demonstrado ao longo desse trabalho, é conhecida como oxadiazol.

A revisão no banco de dados *Web of Science* revelou oito trabalhos com esta molécula atuando em diferentes cepas (*L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*) que causam as mais diversas formas da doença. Dos trabalhos avaliados, somente em um dos compostos derivados de oxadiazol não foi reportado sucesso na atividade leishmanicida *in vitro*, entretanto apresentou relevante atividade inibitória da enzima Cisteíno protease (Steertet *et al.*, 2010). As cisteína proteases (CPs) constituem uma das classes de enzimas proteolíticas expressas em diferentes organismos, que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos. A primeira enzima descrita desta classe foi a papaína. Os CPs mais amplamente estudados são CPA, CPB, CPC, tipo catepsina L e tipo catepsina B, os CPAs inibem a apresentação de antígenos através da degradação de moléculas do complexo MHC classe II e os CPCs controlam a expressão de proteínas que regulam o ciclo celular em espécies de *Leishmania spp* (LEAO *et al.*, 1995; JUDICE *et al.*, 2021).

Já Taha *et al.* (2017) apresentaram híbridos de oxadiazol-fenil-hidrazona ligados a fenil com capacidade de ligação a uma zona de sítio ativo a Pteridina redutase em docking molecular, estabelecendo interação estável. Espécies de *Leishmania* requerem pteridinas para biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas. A Pteridina redutase é a única enzima que reduz biopterina em espécies de *leishmania*, demonstrando ser vital para o crescimento *in vivo* (NARE *et al.*, 1997; SIENKIEWICZ *et al.*, 2010). Tais híbridos de oxadiazol foram avaliados quanto ao potencial antileishmania *in vitro*, com os valores de IC₅₀ variando entre 0,95 - 78,6 µM, onde um desses compostos apresentou-se sendo sete vezes mais potente do que a Pentamidina IC₅₀ = 7,02µM. O estudo demonstrou que oxadiazóis com maior número de hidroxila

(trihidroxi) possuem menor índice de seletividade (SI) 2,6 e 5,5 enquanto os dihidroxi apresentaram valores de 22,6 a 105,3.

Dutra *et al.* (2014) apresentaram 15 derivados de oxadiazóis, os furoxanos com uma IC_{50} 2,12-8,22 $\mu\text{g/ml}$ e SI 5,56-54,05 frente a amastigotas de *L. amazonensis* e como mecanismo de ação, atribuiu-se a uma elevação de radicais livres. Como demonstrado anteriormente nesse trabalho, a resposta imune inata é fundamental com participação de macrófagos M1 ativados, que conseguem eliminar a infecção através da explosão respiratória. Já foi demonstrado que os macrófagos eliminam as promastigotas em ensaio *in vitro*, através da produção de radicais livres (espécies reativas de nitrogênio e oxigênio), e também que camundongos imunologicamente deficientes na produção desses radicais são susceptíveis a infecção por *leishmania spp* (HEIDARPOUR *et al.*, 2012; GONTIJO; CARVALHO, 2003; FREITAS; PINHEIRO, 2010).

Em relação a patentes de moléculas de oxadiazóis para uma alternativa terapêutica a respeito de leishmaniose, WO2018051254-A1 que foi depositada em 2018 trata de uma molécula 1,2,4 oxadiazol com amplo espectro de ação em câncer (Ex: câncer de mama, câncer de cólon, câncer de pulmão, melanoma, câncer renal, câncer de próstata, câncer ósseo, câncer pancreático, etc.), em bactérias, vírus, parasitas (Incluindo *Leishmania*). Já a patente WO2018051255-A1 que foi depositada em 2018 trata de duas moléculas inibidoras de morte programada (1,3,4 oxadiazol e tiazol) com amplo espectro de ação em câncer (Ex: câncer de mama, câncer de cólon, câncer de pulmão, melanoma, câncer renal, câncer de próstata, câncer ósseo, câncer pancreático, etc.), em bactérias, vírus, parasitas (Incluindo *Leishmania*). Mesmo bem documentada na literatura o potencial efeito de oxadiazóis a frente da leishmaniose, há somente duas patentes “linkadas” a essa doença parasitária. Isso evidencia um problema que é o atraso na transferência de tecnologia da academia para a indústria. Baseado nisso é necessário criar estratégias para alcançar essa aproximação, visando que as tecnologias e técnicas criadas na academia possam virar um produto para a sociedade como agilizar e desburocratizar os pedidos de patentes, bem como incentivar mais aos professores e pesquisadores para o desenvolvimento de patentes.

A descoberta de novos fármacos é um esforço de alta complexidade, com longo prazo e caro, necessitando etapas que vão desde ensaios *in vitro*, passando por testes pré-clínicos até chegar aos testes clínicos. Deste modo, se faz necessárias metodologias para facilitar e acelerar o processo de aplicação de novas terapias e o

campo da ADMET preditiva (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) expandiu-se em importância e cresceu para incluir áreas como desenvolvimento de ensaios de alto rendimento, mineração de dados, visualização de dados, aprendizado de máquina e modelagem baseada em estrutura. Muitos estudos demonstraram o papel da aplicação eficaz de modelos ADMET preditivos *in silico* na aceleração da identificação de pequenas moléculas com maior eficácia, segurança e dose (SCHNEIDER *et al.*, 2020; CHUANG *et al.*, 2020).

Os tratamentos para leishmaniose visceral ainda são um desafio, pois os medicamentos são injetáveis, e necessitam de um longo período de tratamento. Sendo assim, tratamentos alternativos que viabilizem uma maior eficiência terapêutica, menor toxicidade e maior facilidade de administração tornam-se necessários. Visando a leishmaniose visceral podemos inferir que os oxadiazóis, em geral, possuem propriedades lipossolúveis e podem vir a ser administrado por via oral, uma vez que possuem baixa solubilidade aquosa e uma alta absorção intestinal (todos apresentaram > 90%), trazendo uma forma alternativa de administração para leishmaniose visceral (NEVES *et al.*, 2011). Janardhanan *et al.* (2016) observaram oxadiazóis com alta biodisponibilidade oral (até 100%) e com eficiência em tratar infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina.

A linhagem celular mais prevalente para a investigação *in vitro* da permeabilidade intestinal é a célula Caco-2 do adenocarcinoma do cólon. A utilidade desta linhagem celular é atribuída à sua diferenciação espontânea em enterócitos colunares após atingir a confluência em membranas semiporosas para se assemelhar ao epitélio intestinal. Estas células apresentam semelhanças em morfologia com os enterócitos humanos (HIDALGO *et al.*, 1989; HILGENDORF *et al.*, 2007). As células Caco-2 exibem vias paralelas de transporte de drogas passivas (transcelulares, paracelulares) e ativas (efluxo, captação). Os ensaios de células Caco-2 são frequentemente considerados o “padrão ouro” para a investigação laboratorial de permeabilidade, mecanismos de transporte e interações de novos medicamentos, que são utilizados pelas indústrias e aceitos pelas agências reguladoras (HÄMÄLÄINEN; FROSTELL-KARLSSON, 2004; CHEN *et al.*, 2013). Todos os oxadiazóis estudados apresentaram valores considerados altos pela literatura ($> 0,90 \log P_{app} 10^{-6} \text{cm/s}$), reforçando aqui uma boa permeabilidade intestinal por parte desses compostos heterocíclicos.

Já para leishmaniose cutânea, a forma mais comum da doença, tratamentos de uso tópicos ou administração oral implicariam em maior adesão do paciente e menos efeitos colaterais. Os oxadiazóis, assim como a Anfotericina B, apresentaram baixa absorção epitelial, o que dificultaria o processo de administração tópica, entretanto os oxadiazóis não apresentaram sensibilização da pele. Berenguer *et al.*, (2020) elaboraram e caracterizaram com sucesso, um gel para uso tópico de Anfotericina B, que *in vitro* apresentou resultados equivalentemente eficaz a solução de Anfotericina B. A IC_{50} da solução ANF-B e do gel ANF-B foi de $0,35 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ e $0,56 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ contra promastigotas, e $0,91 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ e $0,87 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ contra amastigotas, respectivamente. Os valores do índice de seletividade (SI) da solução ANF-B e do gel ANF-B foram superiores a 25, demonstrando com sucesso uma estratégia de administração tópica.

O volume de distribuição é o parâmetro utilizado para avaliar a quantidade de fármaco no corpo a partir da medição de uma concentração plasmática, sendo sua principal função clínica atrelada a calcular uma dose necessária para atingir a concentração plasmática terapêutica alvo (TOUTAIN; BOUSQUET-MELOU, 2004). O volume de distribuição não possui relação direta com o volume real do corpo e sim com a distribuição das moléculas dentro do corpo, sendo assim, para uma molécula com alta afinidade tecidual, pouco dela permanece na circulação, deste modo o volume de distribuição torna-se alto e a concentração plasmática fica baixa (TRIPATHI, 2013). Os oxadiazóis mais promissores 2a e 2i apresentaram um baixo volume de distribuição ($0,155$; $0,178 \log \text{L/kg}$) respectivamente, entretanto valores mais altos que o fármaco de referência (Anfotericina B) ($- 0,37 \log \text{L/kg}$). Contudo, Castro *et al.*, (2022) elaboraram nanopartículas em cápsulas de cocleatos com Anfotericina B para administração oral, onde foi possível obter uma biodistribuição eficaz em modelo murino. As nanopartículas obtiveram uma concentração de 58 ng/g no fígado em 48h e 25 ng/g no baço, ao passo que a anfotericina B administrado de forma oral não alcançou o baço ou fígado.

As principais vias envolvidas no metabolismo dos medicamentos são divididas em reações de fase I ou fase II. As reações de fase I envolvem processos de oxidação, redução e hidroxilação, sendo as CYPs (enzimas do citocromo P450) o grupo mais relevante de enzimas metabolizadoras de medicamentos. O resultado da previsão dos oxadiazóis mostra que se apresentam como potenciais inibidores das enzimas CYP1A2 e CYP2C19. O CYP1A2 está envolvido com cafeína e paracetamol, enquanto o

CYPC19 está envolvido no metabolismo de muitos inibidores da bomba de prótons e antiepilépticos, sendo necessário avaliar suas interações medicamentosas com os oxadiazóis (KEARNS *et al.*, 2003; VAN DEN ANKER *et al.*, 2011)

Na fisiopatologia da leishmaniose visceral é sabido que promastigotas penetram em células dendríticas e macrófagos na pele, perdem o flagelo transformando-se em amastigotas, disseminam-se via sistema linfático e vascular infectando outros monócitos e macrófagos, culminando na infiltração em medula óssea, fígado, baço e linfonodos, resultando em complicações como hepatomegalia e hepatite aguda. É possível prever que a maioria dos oxadiazóis (exceto 2b e 2f) não apresenta hepatotoxicidade, deste modo podem contribuir com o tratamento sem potencializar as complicações clínicas (CHAPPUIS *et al.*, 2007; FRANCISCATO, 2010).

Por fim, nenhum oxadiazol apresentou-se como inibidor do canal iônico de potássio hERG 1 ou 2, sendo possível inferir ausência de cardiotoxicidade, tendo em vista que esses canais são essenciais para atividade elétrica cardíaca. Entretanto um dos oxadiazóis mais seletivos (2i) apresentou toxicidade de AMES que é um teste amplamente empregado como ferramenta de triagem para estabelecer uma estimativa inicial para mutagenicidade e carcinogenicidade, tornando necessário realizar estudos mais complexos para estabelecer esta relação com o oxadiazol 2i (MAZZATORTA *et al.*, 2007).

Espécies reativas de oxigênio (EROs), conhecidas como mediadores de cascatas de sinalização intracelular, são moléculas quimicamente reativas contendo oxigênio (KOTAIAH *et al.*, 2012). A maioria dos organismos vivos pode produzir EROs e metabolizar quantidades excessivas através de processos fisiológicos normais. O acúmulo excessivo de EROs é geralmente responsável por danificar lipídios, proteínas e o DNA das células, levando ao estresse oxidativo (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Ozbilge *et al.* (2005) constataram um aumento do estresse oxidativo em soros de pacientes acometidos com leishmaniose cutânea, podendo ser um fator que contribui para a progressão da doença. Há descrito na literatura moléculas antioxidantes com atividade leishmanicida promissora, bem como uma relação com atividade antioxidante e compostos contendo o anel oxadiazol (KHADRI *et al.*, 2020; NAZARBAHJAT *et al.*, 2016). Alkathiri *et al.* (2017) demonstraram cura completa de leishmaniose cutânea em modelo murino utilizando o tratamento oral com suco de romã (*Punica granatum*), tal qual constataram atividade antioxidante relevante através da dosagem dos marcadores de estresse oxidativo com peroxidação lipídica, óxido nítrico e

glutathiona, onde se observou prevenção parcial da redução da glutathiona e a formação de peroxidação lipídica e óxido nítrico na pele dos camundongos.

A produção robusta de radicais livres leva ao esgotamento de enzimas antioxidantes protetoras resultando na lesão celular observada na infecção por *Leishmania spp* (OZBILGE *et al.*, 2005). Aqui nesse estudo foi demonstrado que moléculas com anel 1,2,4 oxadiazol possuem atividade inibitória relevante do radical DPPH. As moléculas 2g, 2h e 2i apresentaram respectivamente o resultado de IC₅₀ de 6,90µg/mL; 8,76µg/mL e 12,10µg/mL ao passo que o controle positivo Quercetina demonstrou uma IC₅₀ de 0,95 µg.mL, tal atividade pode beneficiar o hospedeiro infectado.

A colina é o precursor da fosfatidilcolina, um componente principal das membranas de promastigotas de *Leishmania spp*. Portanto, a inibição da formação de colina pode diminuir a sobrevivência da *Leishmania spp*. Essa hipótese pode ser testada utilizando inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), que catalisa a hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético, como compostos leishmanicidas (VILA-NOVA *et al.*, 2012). Três oxadiazóis do estudo foram avaliados quanto à possível inibição *in silico* e *in vitro* da enzima acetilcolinesterase com resultados promissores.

In silico, através da bioinformática com o ensaio de acoplamento molecular no sítio ativo da enzima Ache, que possui o sítio de ligação catalítica e o sítio de ligação aniônica periférica, foi possível verificar resultados significativos dos oxadiazóis 2a e 2i com valores de energia de ligação semelhantes ao do controle positivo, apresentando respectivamente os seguintes resultados: -7.36 kcal/mol; -7.39 kcal/mol; -6.66 kcal/mol. Mohammadi-khanaposhtani *et al.* (2015) apresentaram moléculas alteradas com a inserção do anel de 1-2-4-oxadiazol que permitiu que as moléculas conseguissem interagir tanto com o sítio de ligação catalítico com o aminoácido Trp84, como o sítio de ligação aniônica periférica com o aminoácido Tyr121, com ambas as interações do tipo Pi-Pi. Os oxadiazóis usados nesse estudo também apresentaram interação no sítio aniônico catalítico com o aminoácido Trp84, entretanto foi do tipo do tipo Pi-sigma.

É sabido que a natureza da interação de ligação também pode exercer uma influência muito forte na força de ligação do complexo metal-ligante. Dois tipos de geometrias de ligação são encontrados para os anéis azólicos, ligação Pi e Sigma. Em complexos de ligação Pi, a interação do íon de metal alcalino ocorre com a densidade de elétrons Pi do anel aromático, deste modo o anel azólico atua cedendo seis elétrons. Nos complexos de ligação sigma, o íon de metal alcalino interage com o par solitário de

elétrons de nitrogênio no plano do anel azol e para ligações covalentes já está bem estabelecido que as ligações sigma são mais fortes do que as ligações Pi. Isto ocorre porque a densidade eletrônica compartilhada em uma ligação sigma está amplamente localizada entre os dois átomos envolvidos na ligação, o que explica os bons valores para energia de ligação demonstrado dos oxadiazóis estudados (2a e 2i) (HUANG; RODGERS, 2002).

In vitro os resultados reforçam e complementam o que foi apresentado através da técnica de docagem molecular. As moléculas 2g, 2h e 2i demonstraram respectivamente o valor de IC₅₀ de 20,54 µg/mL; 8,58 µg/mL; 11,91 µg/mL enquanto a fisostigmina IC₅₀ de 1,15 µg/mL. Esses resultados apontam que os oxadiazóis tanto se ligam ao sítio ativo da enzima acetilcolinesterase, como consegue inibir sua atividade, demonstrando assim um possível mecanismo de ação leishmanicida direta. Mohammadi-Khanaposhtani *et al.* (2015) também avaliaram quanto à atividade anti-AChE *in vitro* de moléculas com composição base do anel 1-2-4-oxadiazol e uma das moléculas apresentou resultados equivalentes ao do controle positivo (IC₅₀ Rivastigmina = 11.07 µM; IC₅₀ Oxadiazol 10b = 11.55 µM).

Os tripanossomatídeos possuem um metabolismo antioxidante particular, contando com a tripanotiona sintetase (TS) e tripanotiona redutase (TR), que nos hospedeiros mamíferos é análogo ao sistema glutatona. Tendo em vista que as enzimas TS e TR são essenciais para a sobrevivência do parasito, elas tornaram-se alvos promissores para o desenvolvimento de medicamentos (COLOTTI; ILARI, 2011). Deste modo, os oxadiazóis mais promissores apresentados nesse estudo (2a e 2i) foram testados frente à enzima TR, visando um mecanismo de ação alternativo. Entretanto, as moléculas não apresentaram atividade inibitória relevante com as concentrações utilizadas no estudo, todavia Rocha *et al.* (2022) apresentaram um 1-2-4-oxadiazol com boa afinidade frente a enzima tripanotiona redutase através de estudos computacionais, sugerindo alterações no metabolismo redox. Dito isto, será interessante repetir a avaliação da atividade inibitória da enzima tripanotiona redutase *in vitro*, com os oxadiazóis estudados aumentando suas concentrações.

Referente aos ensaios nas formas promastigotas de *Leishmania spp*, mostraram-se susceptíveis aos oxadiazóis, com destaques para as moléculas 2a e 2i frente a cepas de *L. infantum*, que obtiveram bons resultados até mesmo em menores concentrações, apresentando as melhores IC₅₀ com 17,95 µM para 2a e 30,86 µM para 2i. As culturas de parasitas tratadas com apenas 1% de DMSO não mostraram efeitos

significativos, assim a atividade observada não pode ser atribuída à presença de DMSO. Frente a macrófagos RAW, os oxadiazóis menos citotóxicos foram o 2a e 2i que demonstraram toxicidade significativa somente nas maiores concentrações, apresentando um valor de CC_{50} de $558\mu\text{M}$ e $485,5\mu\text{M}$, respectivamente. Ademais, foi possível obter o índice de seletividade (IS), onde a 2a apresentou o valor de 31,08 e a 2i um valor de 17,86; a literatura coloca compostos com $IS > 10$ como promissores agentes para se tornarem novos fármacos (YANG *et al.*, 2021). Taha *et al.* (2017) atribuíram em seu estudo que quanto menor a quantidade de hidroxilas, maior a seletividade das moléculas híbridas de oxadiazol. Nossa molécula 2a, que obteve o melhor resultado de índice de seletividade (31,08) não tem hidroxilas na sua composição. Estes achados corroboram as informações do autor.

Com relação às nanopartículas, estas são reconhecidas como corpos estranhos e fagocitadas pelos macrófagos levando à entrega específica do alvo, uma vez que a *Leishmania* abriga dentro do sistema fagocítico dos macrófagos. Além disso, as nanopartículas sólidas são caracterizadas por um elevado peso por volume, o que é uma situação ideal para a libertação sustentada do fármaco por difusão gradual a partir do depósito. Assim, o medicamento pode ser administrado em doses mais elevadas e durante um período mais curto para alcançar a cura da doença (MÜLLER *et al.*, 2001). Baseado nisso, como potencial estratégia futura de formulação mais eficiente, optou-se por nanoencapsular em partículas de PLGA os dois oxadiazóis mais seletivos (2a e 2i). Kumar *et al.* (2015) demonstraram que a anfotericina B encapsulada com PLGA conjugado com anticorpo para CD14 foi mais eficiente que a anfotericina B na forma livre em amastigotas de *L. donovani* no tecido esplênico de hamsters, com uma porcentagem de inibição de 93,2% para o grupo encapsulado e 74,6% com o grupo livre. O tamanho das nanopartículas de oxadiazóis é um componente importante, uma vez que no organismo do mamífero, as amastigotas estarão preferencialmente dentro das células mononucleares fagocíticas e, curiosamente, partículas menores que 200 nm podem atingir os órgãos linfóides secundários poucas horas após a administração, através dos vasos linfáticos iniciais onde as junções endoteliais que revestem os vasos possuem vazamentos permitindo o fluxo de moléculas maiores, agilizando o tratamento em casos de Leishmaniose Visceral (MANOLOVA *et al.*, 2008 ; CIFUENTES-RIUS *et al.*, 2021; SINGH, 2021).

O uso da nanotecnologia pode aumentar a especificidade dos oxadiazóis, pois a maioria dos micro-organismos é destruída pelos macrófagos, todavia muitos

deses desenvolveram meios para resistir à resposta imune após a fagocitose (MOGHIMI *et al.*, 2005). Assim, em infecções como na leishmaniose, os parasitos se diferenciam em amastigotas e escapam da defesa, residindo em macrófagos e ficando protegidos contra os fármacos presentes na circulação sistêmica, resultando na necessidade de terapia prolongada, a qual acaba por conduzir ao risco de desenvolvimento de resistência aos fármacos (SINGH *et al.*, 2008). Sendo assim, a capacidade de macrófagos para fagocitar nanopartículas de PLGA, como é o caso do sistema nanoparticulado nesse estudo, proporciona uma abordagem para o direcionamento específico com agentes terapêuticos a esses parasitos (MOHANRAJ; CHEN, 2006; HIROTA *et al.*, 2007). Assim, essa estratégia apresenta-se nesse estudo como uma potencial terapia alternativa para as formas cutânea e visceral de leishmaniose.

6. CONCLUSÃO

Em resultados de previsão farmacocinética *in silico*, foi possível inferir que os oxadizóis apresentados nesse estudo podem vir a ser administrados de forma oral e os oxadiazóis mais seletivos não apresentaram hepatotoxicidade. *In vitro* apresentaram efeito leishmanicida potente em promastigotas de cepas de *L. infantum* e *L. braziliensis*, também demonstraram um baixo efeito citotóxico em macrófagos murinos, culminando num alto índice de seletividade. O mecanismo de ação leishmanicida pode estar relacionado com a inibição da enzima acetilcolinesterase, gerando danos na membrana parasitária e não por ação direta sobre a enzima tripanotiona redutase. Por fim, tais resultados demonstram que os oxadiazóis são promissores e potencialmente atrativos para serem nanoencapsulados em formulações específicas, tornando necessário e justificando estudos de maiores complexidades tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

8. REFERÊNCIAS

IEEA. Protein Data Bank. Disponível:<<https://www.rcsb.org/structure/IEEA>>.

Acessoem: 06 de Março de 2024.

AKHOUNDI, Mohammad et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

AKHOUNDI, Mohammad et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular aspects of medicine**, v. 57, p. 1-29, 2017.

ALKATHIRI, Badriah et al. Pomegranate (*Punica granatum*) juice shows antioxidant activity against cutaneous leishmaniasis-induced oxidative stress in female BALB/c mice. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 12, p. 1592, 2017.

ALRAJHI, Abdulrahman A. et al. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 12, p. 891-895, 2002.

ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, Diego-Abelardo et al. Overcoming the global burden of neglected tropical diseases. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 7, p. 2049936120966449, 2020.

AMATO, Valdir S. et al. Use of itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis: a pilot study. **International journal of infectious diseases**, v. 4, n. 3, p. 153-157, 2000.

AMIR, M.; SHAHANI, S. Synthesis and antiinflammatory activity of naphthylmethyl oxadiazoles, thiadiazoles and triazoles. **Indian Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 107-110, 1998.

ANSELMO, Aaron C.; MITRAGOTRI, Samir. Nanoparticles in the clinic. **Bioengineering & translational medicine**, v. 1, n. 1, p. 10-29, 2016.

ASKARIZADEH, Anis; BADIEE, Ali; KHAMESIPOUR, Ali. Development of nano-carriers for *Leishmania* vaccine delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 167–187, 2020. Disponível em:<https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1713746>.

ATAYDE, Vanessa Diniz et al. Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. **Cell reports**, v. 13, n. 5, p. 957-967, 2015.

BAQUEDANO, Ylenia et al. Novel heteroaryl selenocyanates and diselenides as potent antileishmanial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3802-3812, 2016.

- BATES, Paul A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 79, n. 2, p. 215-218, 1994.
- BERENGUER, Diana et al. Topical amphotericin B semisolid dosage form for cutaneous leishmaniasis: Physicochemical characterization, ex vivo skin permeation and biological activity. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 149, 2020.
- BIERNACKI, Karol et al. Novel 1, 2, 4-oxadiazole derivatives in drug discovery. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 111, 2020.
- BOCEDI, Alessio et al. Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 4, p. 1035-1042, 2010.
- CALVOPINA, Manuel et al. Itraconazole in the treatment of New World mucocutaneous leishmaniasis. **International journal of dermatology**, v. 43, n. 9, p. 659-663, 2004.
- CASTELLANO, Lucio Roberto et al. Potential use of interleukin-10 blockade as a therapeutic strategy in human cutaneous leishmaniasis. **Journal of immunology research**, v. 2015, 2015.
- CASTRO, Antonio Lipa et al. Pharmacokinetics, biodistribution, and activity of amphotericin B-loaded nanocochleates on the *Leishmania donovani* murine visceral leishmaniasis model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 624, p. 121985, 2022.
- CECÍLIO, Pedro et al. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 480, 2014.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017. Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.
- CHAKRAVARTY, Jaya; SUNDAR, Shyam. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251-1265, 2019.
- CHAPPUIS, François et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature reviews microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.
- CHAVES, Joana Darc S. et al. Novel gold (I) complexes with 5-phenyl-1, 3, 4-oxadiazole-2-thione and phosphine as potential anticancer and antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, p. 727-739, 2017.
- CHAUVIÈRE, Gérard et al. Synthesis and biological activity of nitro heterocycles analogous to megazol, a trypanocidal lead. **Journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 3, p. 427-440, 2003.

- CHIESA E, *et al.* Multivariate analysis for the optimization of microfluidics-assisted nanoprecipitation method intended for the loading of small hydrophilic drugs into PLGA nanoparticles, **International Journal of Pharmaceutics**, V.536, P.165-177, 2018.
- CHUANG, Kangway V.; GUNSALUS, Laura M.; KEISER, Michael J. Learning molecular representations for medicinal chemistry: miniperspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 16, p. 8705-8722, 2020.
- COLOTTI, Gianni; ILARI, Andrea. Polyamine metabolism in Leishmania: from arginine to trypanothione. **Amino acids**, v. 40, n. 2, p. 269-285, 2011.
- COMINI, Marcelo A.; FLOHÉ, Leopold. Trypanothione-based redox metabolism of trypanosomatids. **Trypanosomatid diseases: molecular routes to drug discovery**, p. 167-199, 2013.
- COTA, Gláucia F. *et al.* Efficacy of anti-leishmania therapy in visceral leishmaniasis among HIV infected patients: a systematic review with indirect comparison. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 5, p. e2195, 2013.
- COUPAR, I. M. *et al.* Effect of aminophylline, butalamine and imolamine on human isolated smooth muscle. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 21, n. 7, p. 474-475, 1969.
- CROFT, S. L. *et al.* The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. **Biochemical pharmacology**, v. 36, n. 16, p. 2633-2636, 1987.
- CUNHA, Joana *et al.* Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV+ and HIV-patients in the murine model of visceral leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 1-14, 2013.
- DE CARVALHO, Renan VH *et al.* *Leishmania* RNA virus exacerbates Leishmaniasis by subverting innate immunity via TLR3-mediated NLRP3 inflammasome inhibition. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2019.
- DE OLIVEIRA, Valentina Nascimento Melo *et al.* Focused microwave irradiation-assisted synthesis of N-cyclohexyl-1, 2, 4-oxadiazole derivatives with antitumor activity. **Synthetic Communications**, v. 48, n. 19, p. 2522-2532, 2018.
- DEY, Ranadhir *et al.* Gut microbes egested during bites of infected sand flies augment severity of leishmaniasis via inflammasome-derived IL-1 β . **Cell host & microbe**, v. 23, n. 1, p. 134-143. e6, 2018.
- DIRO, Ermias *et al.* Use of pentamidine as secondary prophylaxis to prevent visceral leishmaniasis relapse in HIV infected patients, the first twelve months of a prospective cohort study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004087, 2015.

DIRO, Ermias et al. Long term outcomes and prognostics of visceral leishmaniasis in HIV infected patients with use of pentamidine as secondary prophylaxis based on CD4 level: a prospective cohort study in Ethiopia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007132, 2019.

DOSTÁLOVÁ, Anna; VOLF, Petr. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2012.

DREXLER, K. Eric. Nanotechnology: the past and the future. **Science**, v. 255, n. 5042, p. 268- 269, 1992.

DÜRÜST, Yaşar et al. Synthesis and anti-protozoal activity of novel dihydropyrrolo [3, 4-d][1, 2, 3] triazoles. **European journal of medicinal chemistry**, v. 48, p. 296-304, 2012.

DUTRA, Luiz Antônio et al. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4837-4847, 2014.

EFSTATHIOU, Antonia; SMIRLIS, Despina. Leishmania protein kinases: important regulators of the parasite life cycle and molecular targets for treating leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 691, 2021.

EMAD, Maryam et al. Superior efficacy of oral fluconazole 400 mg daily versus oral fluconazole 200 mg daily in the treatment of cutaneous leishmania major infection: a randomized clinical trial. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 3, p. 606-608, 2011.

FILIPE, Vasco; HAWE, Andrea; JISKOOT, Wim. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796-810, 2010.

FISCHER, A. et al. A new oxadiazole-derivative as herbicide for maize and cereals. **A new oxadiazole-derivative as herbicide for maize and cereals.**, p. 211-14, 1970.

Franciscato, C. (2010). Lesão hepática em pacientes com leishmaniose visceral atendidos no hospital universitário da UFMS de 2005 a 2009.

FRANCO, Luis H. et al. Autophagy downstream of endosomal Toll-like receptor signaling in macrophages is a key mechanism for resistance to Leishmania major infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 32, p. 13087-13096, 2017.

FREITAS, J. C. C., PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a Leishmania spp. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, RPCV (2010) 109 (573-576) 11-20.

- FRÉZARD, Frédéric; DEMICHELI, Cynthia; RIBEIRO, Raul R. Pentavalentantimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.
- GALBIATI, Andrea et al. Development of Potent 3-Br-Isoxazoline-Based Antimalarial and Antileishmanial Compounds. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 11, p. 1726-1732, 2021.
- GALVAO, Endi Lanza; RABELLO, Ana; COTA, Glaucia Fernandes. Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. **PloSone**, v. 12, n. 10, p. e0186117, 2017.
- GARAY, Ana Fidelina Gomez. **Tripanotiona redutase de Leishmania braziliensis como alvo molecular para prospecção de novos inibidores: Avaliação da LAAO de Crotausatrox com atividade antiparasitária**. 2018. Tese de Doutorado.
- GIRAUD, Emilie et al. Leishmania proteophosphoglycans regurgitated from infected sand flies accelerate dermal wound repair and exacerbate leishmaniasis via insulin-like growth factor 1-dependent signalling. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 1, p. e1006794, 2018.
- GOMES, Marta Teixeira et al. 3-Bromopyruvate: A new strategy for inhibition of glycolytic enzymes in *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 229, p. 108154, 2021.
- GOMES, Regis; OLIVEIRA, Fabiano. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on leishmania immunity. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 110, 2012.
- GONTIJO, B., CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36(1):71-80, jan-fev, 2003.
- GOSSAGE, Sharon M.; ROGERS, Matthew E.; BATES, Paul A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International journal for parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027-1034, 2003.
- GRAY, Kaitlyn C. et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 7, p. 2234-2239, 2012.
- HÄMÄLÄINEN, M. D.; FROSTELL-KARLSSON, A. Predicting the intestinal absorption potential of hits and leads. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 397-405, 2004.
- HEIDARPOUR, M.; SOLTANI, S.; MOHRI, M.; KHOSHNEGAH, J. Canine visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. **Parasitol. Res.** n.111, p.1491– 1496, 2012.

HERNÁNDEZ, Paola et al. Hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 64-74, 2013.

HIDALGO, Ismael J.; RAUB, Thomas J.; BORCHARDT, Ronald T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology**, v. 96, n. 2, p. 736-749, 1989.

HILGENDORF, Constanze et al. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 8, p. 1333-1340, 2007.

HIROTA, Keiji et al. Optimum conditions for efficient phagocytosis of rifampicin-loaded PLGA microspheres by alveolar macrophages. **Journal of controlled release**, v. 119, n. 1, p. 69-76, 2007.

HUANG, H.; RODGERS, M. T. Sigma versus pi interactions in alkali metal ion binding to azoles: threshold collision-induced dissociation and ab initio theory studies. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 106, n. 16, p. 4277-4289, 2002.

HÜBLER, Alfred W.; OSUAGWU, Onyeama. Digital quantum batteries: Energy and information storage in nanovacuum tube arrays. **Complexity**, v. 15, n. 5, p. 48-55, 2010.

IWASAKI, Akiko; MEDZHITOV, Ruslan. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature immunology**, v. 16, n. 4, p. 343-353, 2015.

JHA, S. N.; SINGH, N. K.; JHA, T. K. Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 39, n. 4, p. 314-316, 1991.

JANARDHANAN, Jeshina; CHANG, Mayland; MOBASHERY, Shahriar. The oxadiazole antibacterials. **Current opinion in microbiology**, v. 33, p. 13-17, 2016.

JUDICE, Wagner AS et al. Cysteine proteases as potential targets for anti-trypansomatid drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 116365, 2021.

KEARNS, Gregory L. et al. Developmental pharmacology—drug disposition, action, and therapy in infants and children. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 12, p. 1157-1167, 2003.

KHADRI, MJ Nagesh et al. Synthesis, docking and biological evaluation of thiadiazole and oxadiazole derivatives as antimicrobial and antioxidant agents. **Results in Chemistry**, v. 2, p. 100045, 2020.

KHAN, Mahmood-ul-Hassan et al. Synthesis, crystal structure, anti-HIV, and antiproliferative activity of new oxadiazole and thiazole analogs. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, n. 10, p. 2399-2409, 2016.

KHOURI, Ricardo et al. IFN- β impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 4, p. 2525-2531, 2009.

KIMUTAI, Robert et al. Safety and effectiveness of sodium stibogluconate and paromomycin combination for the treatment of visceral leishmaniasis in eastern Africa: results from a pharmacovigilance programme. **Clinical drug investigation**, v. 37, p. 259-272, 2017.

KOTAIAH, Y. et al. Synthesis and antioxidant activity of 1, 3, 4-oxadiazole tagged thieno [2, 3-d] pyrimidine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 340-345, 2012.

KRAUTH-SIEGEL, R. Luise; LEROUX, Alejandro E. Low-molecular-mass antioxidants in parasites. **Antioxidants & redox signaling**, v. 17, n. 4, p. 583-607, 2012.

KUMAR, Rishikesh et al. Study the effects of PLGA-PEG encapsulated Amphotericin B nanoparticle drug delivery system against *Leishmania donovani*. **Drug delivery**, v. 22, n. 3, p. 383-388, 2015.

LAWYER, Phillip G. et al. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyiaschwetzi* (Diptera: Psychodidae). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 43, n. 1, p. 31-43, 1990.

LEAO, Selma De Souza et al. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 10, p. 3219-3231, 1995.

LYON, David; HUBLER, Alfred. Gap size dependence of the dielectric strength in nano vacuum gaps. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 20, n. 4, p. 1467-1471, 2013.

MACHADO, Paulo R. et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLOS Neglected tropical diseases**, v. 4, n. 12, p. e912, 2010.

MARTINON, Fabio; BURNS, Kimberly; TSCHOPP, Jürg. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . **Molecular cell**, v. 10, n. 2, p. 417-426, 2002.

MAZZATORTA, Paolo et al. Integration of Structure– Activity Relationship and Artificial Intelligence Systems To Improve in Silico Prediction of Ames Test

Mutagenicity. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 1, p. 34-38, 2007.

MCDONALD, Craig M. et al. Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet**, v. 390, n. 10101, p. 1489-1498, 2017.

MEDZHITOV, Ruslan; PRESTON-HURLBURT, Paula; JANEWAY JR, Charles A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394-397, 1997.

MICHIELAN, Lisa; MORO, Stefano. Pharmaceutical perspectives of nonlinear QSAR strategies. **Journal of chemical information and modeling**, v. 50, n. 6, p. 961-978, 2010.

MOGHIMI, S. Moein; HUNTER, A. Christy; MURRAY, J. Clifford. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB journal**, v. 19, n. 3, p. 311-330, 2005.

MOHAMMADI-KHANAPOSHTANI, Maryam et al. Design, synthesis, biological evaluation, and docking study of acetylcholinesterase inhibitors: New acridone-1, 2, 4-oxadiazole-1, 2, 3-triazole hybrids. **Chemical biology & drug design**, v. 86, n. 6, p. 1425-1432, 2015.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, YJTJOPR. Nanoparticles-a review. **Tropical journal of pharmaceutical research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MOLFETTA, F. A.; FREITAS, R. F.; DA SILVA, A. B. F.; MONTANARI, C. A. Docking and molecular dynamics simulation of quinone compounds with trypanocidal activity. **Journal of Molecular Modeling**, v. 15, n. 10, p. 1175-1184, 2009.

MORAIS, Maria Franncielli Simões de et al. Investigação do potencial antifúngico de compostos heterocíclicos, contendo anel 1, 2, 4-oxadiazol, sobre fungos potencialmente patogênicos. 2017.

MÜLLER, Rainer Helmut; JACOBS, Carl; KAYSER, Oliver. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: rationale for development and what we can expect for the future. **Advanced drug delivery reviews**, v. 47, n. 1, p. 3-19, 2001.

MUSA, Ahmed et al. Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 6, p. e1674, 2012.

NAGILL, Rajeev; KAUR, Sukhbir. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 1464-1488, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.05.008>.

NARE, Bakela et al. New approaches to Leishmania chemotherapy: pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity. **Parasitology**, v. 114, n. 7, p. 101-110, 1997.

NAVARD, Sahar Hamoon et al. Therapeutic effects of mesenchymal stem cells on cutaneous leishmaniasis lesions caused by Leishmania major. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 23, p. 243-250, 2020.

NAZARBAHJAT, Nafal et al. Synthesis, characterization, drug-likeness properties and determination of the in vitro antioxidant and cytotoxic activities of new 1, 3, 4-oxadiazole derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, p. 2015-2029, 2016.

NIEVES, Elsa; PIMENTA, Paulo FP. Development of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis in the sand fly Lutzomyia migonei (Diptera: Psychodidae). **Journal of medical entomology**, v. 37, n. 1, p. 134-140, 2000.

NORDBERG, Jonas; ARNÉR, Elias SJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology and medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, Walker Nonato et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 127-132, 2014.

O'NEILL, Luke AJ; GOLENBOCK, Douglas; BOWIE, Andrew G. The history of Toll-like receptors—redefining innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 453-460, 2013.

OpenBabel.

Disponível

em: <<https://www.cheminfo.org/Chemistry/Cheminformatics/FormatConverter/index.html>>. Acesso em: 06 de Março de 2024.

OZBILGE, Hatice et al. Evaluation of oxidative stress in cutaneous leishmaniasis. **The Journal of dermatology**, v. 32, n. 1, p. 7-11, 2005.

PRATES, Fernanda V. de O. et al. Fluconazole in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis: a randomized controlled trial. **Clinical infectious diseases**, p. ciw662, 2016.

PÉREZ-CABEZAS, Begoña et al. More than just exosomes: distinct Leishmania infantum extracellular products potentiate the establishment of infection. **Journal of extracellular vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1541708, 2018.

PINHEIRO, Cristian Vicson Gomes et al. Anti-Leishmania infantum in vitro effect of n-cyclohexyl-1, 2, 4-oxadiazole and its ADME/TOX parameters. **Journal of Parasitic Diseases**, p. 1-6, 2021.

PRAMANIK, PijushKanti et al. Bioassay-based *Corchorus capsularis* L. leaf-derived β -sitosterol exerts antileishmanial effects against *Leishmania donovani* by targeting trypanothione reductase. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 20440, 2020.

PubChem. Fisostigmina.<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5983>>.

Acessoem: 06 de Março de 2024

RAJ, Shweta et al. An overview of biochemically characterized drug targets in metabolic pathways of *Leishmania* parasite. **Parasitology Research**, v. 119, p. 2025-2037, 2020.

RAMALHO-ORTIGAO, Marcelo; SARAIVA, Elvira M.; TRAUB-CSEKÖ, Yara M. Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. **The open parasitology journal**, v. 4, p. 195, 2010.

RIGONI, Thaís S. et al. RANK Ligand helps immunity to *leishmania major* by skewing M2-like into M1 macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 886, 2020.

ROCHA, Yasmim Mendes et al. Antiparasitary and antiproliferative activities in vitro of a 1, 2, 4-oxadiazole derivative on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 121, n. 7, p. 2141-2156, 2022.

ROGERS, Matthew E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, n. 5, p. 495-507, 2002.

ROGERS, Matthew E.; BATES, Paul A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 6, p. e91, 2007.

ROGERS, Matthew E. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 223, 2002.

ROTBART, Harley A.; WEBSTER, A. David; PLECONARIL TREATMENT REGISTRY GROUP. Treatment of potentially life-threatening enterovirus infections with pleconaril. **Clinical infectious diseases**, v. 32, n. 2, p. 228-235, 2001.

RUDRAMURTHY, GudepalyaRenukaiah; SWAMY, Mallappa Kumara. Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: An update. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 23, p. 1185-1204, 2018.

SACKS, David L.; PERKINS, Peter V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, n. 4643, p. 1417-1419, 1984.

SADLOVA, Jovana et al. Refractoriness of *Sergentomyiaschwetzi* to *Leishmania* spp. is mediated by the peritrophic matrix. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. e0006382, 2018.

SAINI, Rajiv; SAINI, Santosh; SHARMA, Sugandha. Nanotechnology: the future medicine. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, v. 3, n. 1, p. 32, 2010.

SALAHUDDIN et al. Updates on synthesis and biological activities of 1, 3, 4-oxadiazole: a review. **Synthetic Communications**, v. 47, n. 20, p. 1805-1847, 2017.

SCHAMBER-REIS, Bruno Luiz Fonseca et al. UNC93B1 and nucleic acid-sensing Toll-like receptors mediate host resistance to infection with *Leishmania major*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 10, p. 7127-7136, 2013.

SCHNEIDER, Petra et al. Rethinking drug design in the artificial intelligence era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 5, p. 353-364, 2020.

SERAFIM, Tiago D. et al. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nature microbiology**, v. 3, n. 5, p. 548-555, 2018.

SHINN, Eric *et al.* Nuclear energy conversion with stacks of graphene nanocapacitors. **Complexity**, v. 18, n. 3, p. 24-27, 2013.

SIENKIEWICZ, Natasha; ONG, Han B.; FAIRLAMB, Alan H. Trypanosoma brucei pteridine reductase 1 is essential for survival in vitro and for virulence in mice. **Molecular microbiology**, v. 77, n. 3, p. 658-671, 2010.

SILVESTRINI, B. Un antitosse-antinfiammatorio, l'Oxolamina (Perebron). **Minerva Medica**, v. 51, p. 4091-4094, 1960.

SINGH, Ankur. Eliciting B cell immunity against infectious diseases using nanovaccines. **Nature nanotechnology**, v. 16, n. 1, p. 16-24, 2021.

SINGH, Sakshi; BAKER, Qanita Bani; SINGH, Dev Bukhsh. Molecular docking and molecular dynamics simulation. In: **Bioinformatics**. Academic Press, 2022. p. 291-304.

SINGH, Raman Preet; JHAMB, Sarbjit Singh; SINGH, Prati Pal. Effects of morphine during *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection in mice. **Life sciences**, v. 82, n. 5-6, p. 308-314, 2008.

SIPPL, W. Development of Biologically Active Molecules by Combining 3DQSAR and Structure-based Design Method. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v.16, p.825– 830, 2002.

SOMANI, Rakesh R.; SHIRODKAR, Prabhakar Y. Oxadiazole: A biologically important heterocycle. **ChemInform**, v. 42, n. 10, p. no, 2011.

SOUSA, Anastácio Q. et al. High-dose oral fluconazole therapy effective for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Vianna) braziliensis*. **Clinical infectious diseases**, v. 53, n. 7, p. 693-695, 2011.

SOTO, J. et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clinical infectious diseases**, v. 38, n. 9, p. 1266-1272, 2004.

SRIVASTAVA, Saumya et al. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites & vectors**, v. 10, p. 1-11, 2017.

STEERT, Koen et al. α -Ketoheterocycles as Inhibitors of Leishmania mexicana Cysteine Protease CPB. **ChemMedChem**, v. 5, n. 10, p. 1734-1748, 2010.

STEVANOVIC, Strahinja et al. Synthesis, in silico, and in vitro evaluation of anti-leishmanial activity of oxadiazoles and indolizine containing compounds flagged against anti-targets. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1282, 2019.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237-252, 2015.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 14, n. 1, p. 53-63, 2013.

SUNDAR, Shyam et al. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: response to 15 daily versus alternate-day infusions. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 5, p. 556-561, 2007.

SUNDAR, Shyam et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **New England journal of medicine**, v. 347, n. 22, p. 1739-1746, 2002.

SUN, Xiao-Wen et al. Synthesis and antibacterial activity of 4-aryl-1-(1-p-chlorophenyl-5-methyl-1, 2, 3-triazol-4-carbonyl) thiosemicarbazides and their related heterocyclic derivatives. 1999.

TAHA, Muhammad et al. Synthesis and molecular modelling studies of phenyl linked oxadiazole-phenylhydrazone hybrids as potent antileishmanial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 126, p. 1021-1033, 2017.

TEIXEIRA, Dirceu E. et al. The cell biology of Leishmania: how to teach using animations. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.

TONG, M. L.; CHEN, X. M. Synthesis of Coordination Compounds and Coordination Polymers. *Modern Inorganic Synthetic Chemistry*, ch. 8. 2017.

TORRES-GUERRERO, Edoardo et al. Leishmaniose: uma revisão. **F1000Research**, v. 6, 2017.

TOUTAIN, Pierre-Louis; BOUSQUET-MÉLOU, Alain. Volumes of distribution. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 441-453, 2004.

TRIPATHI, K. D. *Essentials of medical pharmacology*. **JP Medical Ltd**, 2013.

VAIDYA, Ankur et al. Synthesis and biological activities of oxadiazole derivatives: A review. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 16, n. 10, p. 825-845, 2016.

VAN DEN ANKER, Johannes N.; SCHWAB, Matthias; KEARNS, Gregory L. Developmental pharmacokinetics. **Pediatric clinical pharmacology**, p. 51-75, 2011.

VAN DE WATERBEEMD, Han; GIFFORD, Eric. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise?. **Nature reviews Drug discovery**, v. 2, n. 3, p. 192-204, 2003.

VAN GRIENSVEN, Johan; DIRO, Ermias. Visceral leishmaniasis: recent advances in diagnostics and treatment regimens. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 79-99, 2019.

VARMA, R. S.; BAJPAI, Vinita; KAPIL, A. 4-heterocyclic aminomethyl-2-(3'-nitro-4'-benzyloxy phenyl)-1, 3, 4-oxadiazoline-5-thiones and their antileishmanial activity. **Indian Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 281-284, 1999.

VERMA, Navin K.; DEY, Chinmoy S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3010-3015, 2004.

VILA-NOVA, Nadja S. et al. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandragardneriana* and *Platymiscium floribundum*, native plants from Caatinga biome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 1164-1168, 2012.

YAMAMOTO, Eduardo Seiji et al. Tolnaftate inhibits ergosterol production and impacts cell viability of *Leishmania* sp. **Bioorganic Chemistry**, v. 102, p. 104056, 2020.

YAMAMOTO, Masahiro et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science**, v. 301, n. 5633, p. 640-643, 2003.

YANG, S. et al. 1, 2, 4-Oxadiazole-Based Bio-Isosteres of Benzamides: Synthesis, Biological Activity and Toxicity to Zebrafish Embryo. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 5, p. 2367, 2021.

YAR, Mohammad Shahar; AKHTER, Mohammad Wasim. Synthesis and anticonvulsant activity of substituted oxadiazole and thiadiazole derivatives. **Polish Pharmaceutical Society**, v. 66, n. 4, p. 393-397, 2009.

WARING, Michael J. et al. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. **Nature reviews Drug discovery**, v. 14, n. 7, p. 475-486, 2015.

WENZEL, Jan; MATTER, Hans; SCHMIDT, Friedemann. Predictive multitask deep neural network models for ADME-Tox properties: learning from large data sets. **Journal of chemical information and modeling**, v. 59, n. 3, p. 1253-1268, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2023. Leishmaniose. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2015. Unveiling the neglect of leishmaniasis. Disponível em: https://www.who.int/images/default-source/departments/ntd-library/leishmaniasis/unveiling-the-neglect-of-leishmaniasis-infographic.png?sfvrsn=6b662033_1.