UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
REDE NORDESTE EM BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE UMA MICROEMULSÃO CONTENDO RIPARINA C PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

Kayo Alves Figueiredo

Teresina – Piauí

Abril/2019

KAYO ALVES FIGUEIREDO

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE UMA MICROEMULSÃO CONTENDO RIPARINA C PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

Tese de doutorado submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia com ponto focal na Universidade Federal do Piauí, como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima

Co-orientador: Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho

Teresina – Piauí

Abril/2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco Serviço de Processamento Técnico

F475d Figueiredo, Kayo Alves.
Desenvolvimento tecnológico de uma microemulsão contendo riparina C para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar: obtenção, caracterização e avaliação farmacológica. / Kayo Alves Figueiredo . - 2019.
141 f.: Il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, RENOBIO - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Teresina, 2019.
"Orientação: Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima".
"Coorientador: Prof. Dr. André Luis Menezes"

1. Leishmaniose. 2. Aniba riparia. 3. Nanotecnologia. I. Título.

CDD: 616.936 4

renorbio
rede nordeste de biotecnologia

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: KAYO ALVES FIGUEIRÊDO

TÍTULO DO PROJETO: "Desenvolvimento tecnológico de uma microemulsão contendo riparina C para o tratamento da leishmaniose tegumentar: obtenção, caracterização e avaliação farmacológica.."

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima

BANCA EXAMINADORA:	**CONCEITO**	**ASSINATURA**
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima - UESPI (Presidente)	Satisfatório	
Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho- UFPI (Co-orientador)	Satisfatório	
Profa. Dra Rita de Cássia Meneses Oliveira - UFPI (Examinadora)	Satisfatório	
Profa. Dra. Rogéria de Souza Nunes – UFS (Examinadora)	Satisfatório	
Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho - UFPI (Examinador)	Satisfatório	
Profa. Dra. Marcília Pinheiro da Costa - UFPI (Examinadora)	Satisfatório	

DATA DA AVALIAÇÃO: 05 de abril de 2019.
HORÁRIO: 14h00
LOCAL Auditório do Curso de Farmácia

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITORA

Profª. Drª. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Profª. Drª. Regina Lúcia Ferreira Gomes

COORDENADORIA GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Welter Cantanhêde da Silva

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA/RENORBIO

Profª. Drª. Carla Eiras

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA/RENORBIO

Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, meu ser maior, pela existência e por todas as conquistas em minha vida.

Aos *meus pais*, pelo amor, incentivo e por tudo o que sempre fizeram e batalharam por mim.

A *Jéssica Freire*, ao amor e companheirismo a mim dedicados e por me fazer sentir uma pessoa melhor a cada dia.

A todos os *amigos, irmãos, tios, primos e toda a família* pelo apoio e por entenderem os muitos momentos de ausência.

Ao *Prof. Francisco das Chagas Alves Lima*, meu orientador, pela oportunidade, contribuições e pelo incentivo ao trabalho.

Ao *Prof. André Luis Menezes Carvalho*, pelo incentivo para iniciar o doutorado, pelas várias idéias e grandiosas contribuições. A motivação recebida foi importantíssima neste trabalho.

Ao *RENORBIO* e a *UFPI*, pela contribuição ao meu crescimento científico.

Aos colegas de *RENORBIO*, pelo incentivo e várias discussões nas aulas.

Ao *GQQC&PF*, especialmente a Rayla Kelly pela grande ajuda com os cálculos quânticos e a Jefferson Rocha, pela ajuda com a docagem molecular e com a publicação.

A *Farmácia Escola da UFPI*, pela cessão dos laboratórios para a realização dos protocolos experimentais.

Aos *colegas do LADERMO*, pela ajuda e incentivo com trabalho.

A *Gláucia Laís*, pela disponibilidade em sempre ajudar e pelas ótimas dicas com as formulações.

A *Beatriz e Ana Cristina*, pela grande ajuda com os protocolos experimentais.

Ao *Prof Stanley Juan*, pela disponibilidade em sempre ajudar e pela concessão das riparinas.

Ao *Prof Fernando Aécio*, pela sua excelente acolhida no LAA e pelas contribuições ao trabalho.

A *Michel Muálem*, pelo incentivo, ajuda com os protocolos experimentais e inúmeras contribuições ao trabalho. Você foi fundamental meu amigo!

Aos *alunos e demais pesquisadores do LAA*, como Lucas, Ingredy, Layane, Rita, Rodolfo e Prof Daniel pela acolhida e pela ajuda neste trabalho.

Ao *NPPM*, pela concessão do biotério para a realização dos protocolos *in vivo* e ao NTF e LITE pela disponibilidade dos laboratórios.

Ao *Prof Ricardo Ramos* e *Prof Janildo*, pela disponibilidade e contribuições ao trabalho.

A *Profa Márcia Rizzo* pela ajuda com a realização do exame histopatológico.

Ao *Prof. Guilherme Rodolfo* da UFS pelas análises de microscopia de luz polarizada, ao *Prof. Victor Hugo Sarmento*, Departamento de Química-UFS, pelas análises de SAXS e ao Prof Welter Cantanhede, Laboratório de Automontagem Supramolecular-UFPI, pela análises no DLS.

A meus locais de trabalho, *Departamento de Saúde do IFPI* e *Farmácia HUT*, pelo total apoio nos momentos que necessitei, pela incentivo e pela ajuda com a liberação da licença para capacitação.

Enfim, a todos, o meu MUITO OBRIGADO!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS 9
LISTA DE FIGURAS 11
LISTA DE TABELAS 12
LISTA DE QUADROS 13
RESUMO 14
ABSTRACT 15
1.INTRODUÇÃO 16
2. OBJETIVOS 19
2.1 Geral 19
2.2 Específicos 19
3. REVISÃO DA LITERATURA 20
3.1. LEISHMANIOSES 20
3.1.1 Definição 20
3.1.2 Etiologia e características clínicas 20
3.1.3 Epidemiologia 22
3.1.4 Diagnóstico e tratamento das leishmanioses 24
3.2 PLANTAS MEDICINAIS 26
3.3 *Aniba riparia* 26
3.4 RIPARINAS E ANÁLOGOS SINTÉTICOS 27
3.5 ESTUDOS *IN SILICO* 28
3.6. MICROEMULSÕES 29
3.6.1 Definição e características especiais 29
3.6.2 Microemulsões e penetração cutânea de fármacos 31
3.6.3 Fármacos em microemulsões para tratamento de leishmaniose cutânea 33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 34

4. CAPÍTULO I 42
Prospecção de alvos bioquímicos para docagem molecular na quimioterapia antileishmania 43
1. INTRODUÇÃO 43
2. MATERIAL E MÉTODOS 45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
4. CONCLUSÃO 56

REFERÊNCIAS 56

5. CAPÍTULO II 61

Atividade antileshmania dos análogos estruturais das riparinas A-F de *aniba riparia:* avaliação biológica, ADME-Tox *in silico* e docagem molecular 62

RESUMO 62

1. INTRODUÇÃO 63

2. MATERIAL E MÉTODOS 64

2.1 Substâncias químicas e reagentes 64

2.2 Atividade antileishmania contra formas promastigotas de *Leishmania major* e atividade citotóxica em macrófagos murinos 65

2.3 Avaliação ADMET-Tox *in silico* e docagem molecular 66

2.4 Analise estatística 68

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO 68

3.1 Atividade antileishmania contra formas promastigotas de *Leishmania major* e atividade citotóxica em macrófagos murinos 68

3.2 Avaliação ADMET-Tox *in silico* e docagem molecular 69

4. CONCLUSÃO 87

MATERIAL SUPLEMENTAR 88

REFERENCIAS 92

6. CAPÍTULO III 100

Microemulsão contendo riparina c para tratamento da leishmaniose cutânea: obtenção, controle de qualidade e atividade antileishmania *in vivo* 101

RESUMO 101

1. INTRODUÇÃO 101

2. MATERIAL E MÉTODOS 103

2.1 Reagentes 103

2.2 Obtenção das formulações 103

2.3 Caracterização físico-química 104

2.4 Validação de metodologia analítica para determinação de RipC em ME 105

2.5 Estabilidade preliminar 106

2.6 Cinética de liberação *in vitro* de RipC em ME 107

2.7 Permeação cutânea em pele de camundongos Balb/c 107

2.8 Atividade antileishmania *in vivo* 107

2.9 Análise estatística 109
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 110
3.1 Obtenção das formulações e caracterização físico-química 110
3.2 Validação de metodologia analítica para determinação de RipC em microemulsão..... 115
3.3 Estabilidade preliminar 117
3.4 Cinética de liberação *in vitro* de RipC em ME 118
3.5 Permeação *in vitro* em pele de camundongos Balb/c 120
3.6 Atividade antileishmania *in vivo* 121
4. CONCLUSÃO 126
REFERÊNCIAS 127

7. CONCLUSÃO 134
PERSPECTIVAS 136
ANEXOS 137

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
μM	Micromolar
ADME-Tox	Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade
A/O	Água em óleo
AMB3%	Gel de poloxamer com 3% de anfotericina B.
ABS	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
BHE	Barreira hematoencefálica
BVS	Biblioteca Virtual em Saúde
CI_{50}	Concentração inibitória média
CC_{50}	Concentração citotóxica média
CRE	Creatinina
CV	Coeficiente de variação
CYP	Citocromo P450
DL_{50}	Dose letal média
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
EE	Energia eletrônica
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EtOH	Etanol
GULT	Glucoroniltransferase
HBD	Nº de átomos doadores de H
HBA	Nº de átomos receptores de H
HOMO	Orbital molecular de mais alta energia ocupado
IS	Índice de seletividade
IPD	Índice de polidispersividade
Jss	Fluxo no *steady state*
Ki	Constante de inibição
Kl	Constante de liberação
LC	Leishmaniose cutânea
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação

LogP	Coeficiente de partição octanol-água
*Lm*LEI	Leishmanolisina de *L. major*
*Lm*NMT	N-miristoiltransferase de *L. major*
LV	Leishmaniose visceral
LUMO	Orbital molecular de mais baixa energia ocupado
MD	Momento dipolo
ME1	Microemulsão 1 sem RipC
ME2	Microemulsão 2 sem RipC
ME1-RipC	Microemulsão 1 com 1% de RipC
ME2-RipC	Microemulsão 2 com 1% de RipC
MIP	Miristato de isopropila
OMS	Organização Mundial da Saúde
O/A	Óleo em água
Pa	Probabilidade de atividade
PDB	*Protein Data Bank* (Banco de dados de proteínas)
PENTA	Pentamidina
PH	Potencial hidrogeniônico
Pgp	Glicoproteina-P
PM	Peso molecular
PPB	Ligação a proteínas plasmáticas
QED	*Quantitative estimate of drug-likeness* (Estimativa quantitativa de semelhança a fármacos)
r^2	Coeficiente de determinação
r	Coeficiente de correlação
RipC	Riparina C
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SULT	Sulfotransferase
TGO	Transaminase glutamico-oxalacética
TGP	Transaminase glutamico-pirúvica
TPSA	Área de superfície polar topológica
URE	Ureia
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA
Figura 1. Ciclo biológico da *Leishmania* sp. 21
Figura 2. Distribuição de novos casos de LV no mundo no ano de 2015..... 23
Figura 3. Distribuição de novos casos de LC no mundo no ano de 2015. 23
Figura 4. Índice composto de leshmaniose cutânea (ICLc) no Brasil. 24
Figura 5. Estrutura molecular das riparinas sintéticas (B, C, D, E e F) baseada na estrutura fundamental da riparina A..... 28
Figura 6. Estrutura das microemulsões. 30
Figura 7. Representação esquemática de um diagrama de fases. 31
Figura 8. Barreiras para a penetração cutânea de fármacos. 32

CAPÍTULO 1
Figura 1. Metodologia para realização da prospecção científica. 45
Figura 2. Classificação dos artigos encontrados de acordo com o ano de publicação. 46
Figura 3. Evolução do número de estruturas encontradas e ano da primeira publicação conforme Protein Data Bank por espécie de *Leishmania*. 47
Figura 4. Distribuição dos artigos encontrados de acordo com o país de origem do autor principal. 48
Figura 5. Distribuição dos artigos encontrados de acordo a espécie de *Leishmania* sp. estudada. .. 49
Figura 6. Distribuição dos artigos encontrados de acordo a classificação PDB da proteína alvo. ... 50

CAPÍTULO 2
Figura 1. Interações moleculares das riparinas A-F e PENTA em *Lm*NMT. 82
Figura 2. Diagramas Ligplot 2D que mostram as interações receptor-ligante por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. 88

CAPÍTULO 3
Figura 1. Estrutura química da RipC. 102
Figura 2. Diagramas de fase pseudoternários. 111
Figura 3. Comportamento reológico das formulações. 114
Figura 4. Fotografia das amostras avaliadas através de microscopia de luz polarizada. 115
Figura 5. Gráfico de SAXS das amostras avaliadas. 115
Figura 6. Cinética de liberação in vitro de ME1-RipC, ME2-RipC e Solução controle contendo RipC em células de difusão de Franz. 119
Figura 7. Permeação *in vitro* de ME1-RipC e ME2-RipC em pele de camundongos Balb/c. 121
Figura 8. Aspecto das lesões leishmanióticas ao final do experimento. 122
Figura 9. Avaliação do tamanho das lesões até 70 dias após infecção. 123
Figura 10. Avaliação da carga parasitárias das lesões..... 123

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Frequência das principais revistas científicas de acordo com a busca realizada. 47
Tabela 2. Principais alvos para quimioterapia antileishmania avaliados nos estudos de docagem molecular.....51
Tabela 3. Alguns alvos para quimioterapia antileishmania e seus respectivos inibidores de acordo com os estudos de docagem molecular. 55

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Efeito antileishmania e citotóxico das riparinas A-F em 48 h. 69
Tabela 2. Parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos avaliados pelo FAFdrugs4.....70
Tabela 3. Parâmetros de drug-likeness e ADME-Tox avaliados pelo PreADMET e GUSAR. 73
Tabela 4. Perfil de atividades biológicas das riparinas A-F avaliadas pelo Molinspiration e PASS online.....75
Tabela 5. Descritores moleculares das riparinas A-F obtidos no Gaussian. 77
Tabela 6. Parâmetros de afinidade de docagem molecular das riparinas em alvos de *Leishmania major*. 79
Tabela 7. Correlação *in silico/ in vitro* entre Ki (µM) em alvos de *Leishmania major* e CI_{50} de atividade antileishmania.....81
Tabela 8. Interações das riparinas obtidas pelo software Ligprot+ para as conformações escolhidas por docagem molecular em alvos de *Leishmania major*.....83

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Solubilidade da RipC em tensoativos, co-tensoativos, óleos e água.....110
Tabela 2. Descrição das formulações obtidas no estudo e sua caracterização físico-química.....112
Tabela 3. Descrição dos parâmetros tamanho de gotícula (nm), IPD e potencial zeta (mV) das formulações obtidas. 114
Tabela 4. Parâmetros obtidos na validação do método analítico de determinação de ripC em microemulsão. 116
Tabela 5. Estabilidade preliminar das formulações testados após 30, e 180 dias à temperatura ambiente, estresse térmico e ciclo gelo-degelo. 118
Tabela 6. Avaliação do parâmetros da cinética de liberação *in vitro* em células de Franz.....119
Tabela 7. Avaliação do tamanho da lesão e frequência de ulceração ao final do experimento. 124

LISTA DE QUADROS

REVISÃO DA LITERATURA

Quadro 1. Fármacos usados no tratamento das leishmanioses. 25
Quadro 2. Vantagens e desvantagens relacionadas ao uso de medicamentos pela via cutânea. 33

Desenvolvimento tecnológico de uma microemulsão contendo riparina C para o tratamento da leishmaniose tegumentar: obtenção, caracterização e avaliação farmacológica. KAYO ALVES FIGUEIREDO. Orientador: Francisco das Chagas Alves Lima. 141f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia. Ponto focal: Piauí, Universidade Federal do Piauí, 2019.

RESUMO

As leishmanioses afetam mais de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo. São consideradas pela Organização Mundial da Saude (OMS) como uma das principais doenças negligenciadas no mundo, afetando principalmente a população pobre de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. O alto custo e a falta de eficácia dos tratamentos tradicionais vêm sendo um estímulo na busca de alternativas terapêuticas para as leishmanioses. Este trabalho objetiva realizar a avaliação *in silico* e antileishmania *in vitro* das riparinas A-F, assim como o desenvolvimento tecnológico de uma microemulsão contendo RipC e para tratamento da leishmaniose cutânea. No capítulo I, foi realizada uma prospecção de estudos de docagem molecular de alvos bioquímicos através de uma busca de literatura científica de macromoléculas de *Leishmania sp* e, assim, servir de subsídio teórico para estudos *in silico* na triagem de novos fármacos para a terapia antileishmania. No capítulo II, foi realizado um estudo de avaliação biológica de atividade antileishmania, ADMET-tox *in silico* e docagem molecular das riparinas A - F. As riparinas A-F apresentaram uma potente ação citotóxica *in vitro* em formas promastigotas de *Leismania major*, principalmente para RipC e RipE. Quanto ao perfil ADME-Tox, as riparinas A-F apresentaram pequenas diferenças quanto a suas propriedades físico-químicas. Nos estudos por docagem molecular os ligantes apresentaram constante de inibição <1 μM para *Lm*NMT (N-Miristoiltransferase) e *Lm*LEI (Leishmaniosina). As moléculas com maior atividade citotóxica contra o parasita, RipC e E, apresentaram índice de seletividade (IS) de 7,22 e 12,90, respectivamente. As RipD e F apresentaram bons resultados de atividade antileishmania, porém com menor IS. No capítulo III, realizou-se a obtenção de uma microemulsão (ME) contendo RipC, ME1-RipC e ME2-RipC, para o tratamento da leishmaniose cutânea através da administração tópica em camundongos Balb/c. Além disso, analisou-se a sua estabilidade preliminar, caracterização físico-química e outros ensaios de controle de qualidade. Os diagramas de fase foram obtidos com Polissorbato 80, Transcutol®, miristato de isopropila e água purificada. As formulações mantiveram-se estáveis nos ensaios de estabilidade preliminar. O método analítico de determinação de RipC em microemulsão demonstrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto. As formulações apresentaram alta capacidade de liberar a RipC na cinética de liberação *in vitro* e com modelos cinéticos diferentes. Tais formulações foram capazes ainda de permear a pele da região dorsal de camundongos Balb/c, com destaque para ME2-RipC. Na avaliação da atividade antileishmania *in vivo*, ME1-RipC, ME2-RipC e AMB3% foram capazes de retardar o desenvolvimento das lesões leishmanióticas e a frequência de ulcerações em relação aos grupos controles, com $p<0,05$ apenas para ME2-RipC e o controle positivo AMB3%. ME1-RipC, ME2-RipC e AMB3% foram capazes de reduzir de forma estatisticamente significativa a carga parasitária nas lesões em relação a ME1 e ME2. Foi observado a ausência de toxicidade do tratamento proposto para o parâmetros peso, hematócrito, função renal e hepática, bem como a ausência de sinais clínicos de toxicidade aguda. Desta forma, a ME obtida tem potencial para uma futura aplicação tópica, podendo compor um sistema de liberação de fármacos para o tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: Leishmanioses; *Aniba riparia*; Estudos *in silico;* Sistemas microemulsionados; Nanotecnologia.

Technological development of a microemulsion containing riparine C for the treatment of tegumentary leishmaniasis: obtention, characterization and pharmacological evaluation. KAYO ALVES FIGUEIREDO. Advisor: Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima. 141p. Doctor's Thesis. Graduate Program in Biotecnology/RENORBIO, UFPI, 2019.

ABSTRACT

Leishmaniasis affects more than 12 million people around the world. It is considered by World Health Organization (WHO) as one of the most important neglected diseases in the world, affecting mainly the poor population of underdeveloped and developing countries. The high cost and lack of efficacy of traditional treatments have been a stimulus in the search for therapeutic alternatives for leishmaniasis. This work aims to perform the *in silico* and antileishmanial *in vitro* evaluation of riparins A-F, as well as the technological development of a microemulsion containing RipC for treatment of cutaneous leishmaniasis. In Chapter I, a prospective study of the molecular docking of biochemical targets was carried out through a search of the scientific literature on *Leishmania sp.* macromolecules and, thus, a theoretical basis for *in silico* studies in the screening of new drugs for antileishmania therapy. In Chapter II, a biological evaluation of antileishmania activity, ADMET-tox *in silico* and molecular doping of riparinas A-F was carried out. The riparinas AF presented a potent cytotoxic action *in vitro* in *Leismania major* promastigotes, mainly for RipC and RipE. As for the ADME-Tox profile, the A-F riparines presented small differences in their physicochemical properties. In molecular docking studies the ligands showed inhibition constant <1 μM for *Lm*NMT (N-Miristoyltransferase) e *Lm*LEI (Leishmaniosine). The molecules with the highest cytotoxic activity against the parasite, RipC and E, presented selectivity index (IS) of 7.22 and 12.90, respectively. The RipD and F presented good results of antileishmania activity, but with lower IS. In Chapter III, a microemulsion (ME) containing RipC was obtained, ME1-RipC e ME2-RipC, for the treatment of cutaneous leishmaniasis through topical administration in Balb/c mice. In addition, their preliminary stability, physico-chemical characterization and other quality control tests were analyzed. Phase diagrams were obtained by Polysorbate 80, Transcutol®, isopropyl myristate and purified water. The formulations were stable in the preliminary stability tests. The analytical method proved to be specific, linear, precise, accurate and robust. The formulations showed good release kinetics profiles *in vitro* and with different kinetic models. Formulations were still capable of permeates the skin of the dorsal region of Balb/c mice, especially ME2-RipC. In the study of antileishmania activity *in vivo*, ME1-RipC, ME2-RipC and AMB% were able to retard the development of leishmaniotic lesions and the frequency of ulcerations in relation to the control groups, with $p < 0.05$ only for ME2-RipC and the positive control AMB3%. ME1-RipC, ME2-RipC and AMB3% were able to statistically reduce the parasitic load on the lesions in relation to ME1 and ME2. The toxicity of the proposed treatment for the parameters evaluated for body weight, hematocrit, renal and hepatic function and absence of clinical signs of acute toxicity was observed. In this way, the ME obtained has the potential for a future topical application, being able to compose a system of drug release for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis; *Aniba riparia*; *In silico;* Microemulsion systems; Nanotechnology.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera as leishmanioses como umas das principais doenças negligenciadas no mundo, afetando principalmente a população pobre de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2010). São um grupo de doenças, com variadas manifestações clínicas, causadas por protozoários parasitas de mais de 20 espécies de *Leishmania*. A infecção por parasitas deste gênero causa um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo as formas subclínica (inaparente), localizada (lesões na pele), e infecções disseminadas (cutânea, mucosa, ou visceral) (GRIMALDI; TESH, 1993; ASHFORD, 2000).

As leishmanioses afetam mais de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo e outras 200 milhões estão sob risco de contrair a doença, principalmente no Brasil e outros países tropicais. A cada ano são registrados dois milhões de novos casos e 350 milhões de pessoas se encontram em área de risco. Das formas clínicas apresentadas, a mais fatal é a visceral e estima-se que as 500.000 pessoas afetadas por ela morrerão anualmente (WHO, 2016).

Quanto ao tratamento, há uma necessidade de novas alternativas terapêuticas uma vez que, desde 1940, os antimônios pentavalentes Estibogluconato de sódio e Antimoniato de Meglumine além da Anfotericina B são a principal linha quimioterapêutica para o tratamento das leishmanioses, limitando-se a via de administração parenteral. Esta é uma via invasiva e, além disso, há uma necessidade de uma terapia de longa duração, com alta toxicidade e que vem apresentando uma crescente falha terapêutica especialmente por falta de adesão ao tratamento pelos pacientes (LAHIRY et al., 2018). Dessa forma, o alto custo e a falta de eficácia dos tratamentos tradicionais vêm sendo um estímulo na busca de alternativas terapêuticas (KEDZIERSKI et al., 2009).

Com o objetivo de identificar novos compostos com atividade leishmanicida, há vários anos, uma diversidade de pesquisas com plantas abordando várias compostos incluindo neoligninas (BARATA, 2000), alcalóides cantin-6-ona (FERREIRA, 2002), terpenos (GLASER et al., 2015), α-pineno (RODRIGUES et al., 2015), lupeol (SOUZA et al., 2017), ácido gálico e ácido elágico (ALVES et al., 2017) e alfa-pineno (ZADEH MEHRIZI et al., 2018) tem demonstrando atividade leishmanicida contra várias espécies de *Leishmania.*

Conhecida popularmente como “louro”, *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) tem o centro da sua diversidade na Amazônia e nas Guianas, podendo estender-se para os Andes, para as montanhas do norte da Venezuela, leste e sul do Brasil (NUNES et al., 2013). Alcalóides do tipo alcamida foram isolados do fruto verde da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), as riparinas I, II e III. Esses compostos possuem atividades farmacológicas comprovadas em estudos pré clínicos, como atividade espasmolítica (THOMAS et al., 1994), antinociceptiva (ARAUJO et al., 2009),

antimicrobiana (CATÃO et al., 2010), antiinflamatória (CARVALHO et al., 2013), ansiolítica e antidepressiva (VASCONCELOS et al., 2015) e vasodilatadora (GARCIA et al., 2016).

A partir do desenvolvimento de uma nova rota de síntese da riparina III, foi possível a adaptação de uma metodologia simples e de resultados seguros para obtenção dos análogos sintéticos das riparinas naturais (riparinas A, B, C, D, E e F). Diversos trabalhos vem sendo publicados com estas moléculas análogas. As riparinas A-F apresentaram atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* com avaliação do estresse oxidativo, testes de citotoxicidade, antimicrobiana, antihelmíntica e estudos comportamentais (NUNES et al., 2013). Outras moléculas apresentaram atividade antiinflamatória (riparina B) (SANTIAGO et al., 2015), antioxidante e citotóxica sobre células tumorais (riparinas C, D, E, F) (NUNES, 2014). Já a molécula riparina A apresentou significativa atividade leishmanicida *in vitro* sobre *L. amazonensis* (ARAÚJO et al., 2016).

RipC é uma substância que se apresenta como um pó branco, cristalino e de baixa solubilidade aquosa. Apresenta um radical OH adicionado a riparina A capaz de formar ligações de H com importantes alvos moleculares de *Leishmania major* (dados não publicados), apresenta potente atividade antibacteriana *in vitro* (COSTA et al., 2016). Além disso, apresentou efetividade máxima contra esquistossomas em baixas concentrações (NUNES et al., 2013). No entanto, apresenta baixa solubilidade aquosa, necessitanto ser veiculada em formulações especiais como as microemulsões.

As microemulsões apresentam aplicação como sistemas de liberação de fármacos que vem sendo desenvolvidos em todo mundo e possuem inúmeras vantagens, como: aumento da solubilização e das taxas de dissolução de fármacos; protegem moléculas instáveis da degradação; possuem elevada superfície de contato, facilitando, assim, o transporte extravascular e penetração cutânea de princípios ativos (WESTESEN et al., 2001; MEHTA; KAUR, 2010). A pele é composta pelas camadas epiderme, derme e hipoderme (tecido conjuntivo frouxo ou adiposo), que funcionam como barreiras para a penetração cutânea de fármacos. A epiderme possui camadas de estrato córneo (composto por células mortas queratinizadas) e compõe a principal barreira para a permeação de diversos fármacos (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008).

Diante das limitações na terapêutica atual das leishmanioses, alguns trabalhos vem apresentando abordagens terapêuticas alternativas, incluindo a identificação e o estudo de formulações para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea (SANTOS et al., 2008; COELHO et al., 2018). Fármacos incorporados em sistemas microemulsionados tem potencial aplicação na terapêutica antileishmania (MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2016; KHALIL et al., 2018). Diversos estudos vem avaliando a utilização de alguns fármacos incorporados em microemulsão, como a anfotericina B (MORAIS et al., 2018), fluconazol (OLIVEIRA et al., 2015), paromomicina

(KHALIL et al., 2018) e derivados de produtos naturais como a quercetina (GUPTA et al., 2015) como potencial alternativa terapêutica para tratamento das leishmanioses.

Dess forma, tendo em vista as inúmeras vantagens no emprego das microemulsões para administração cutânea e que fármacos incorporados em sistemas microemulsionados tem potencial aplicação na terapêutica das leishmanioses e que a Riparina C apresenta uma potente atividade citotóxica *in vitro,* este trabalho objetiva realizar a avaliação *in silico* e antileishmania *in vitro* das riparinas A-F, assim como o desenvolvimento tecnológico de uma microemulsão contendo RipC e para tratamento da leishmaniose cutânea

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Realizar a avaliação *in silico* e antileishmania *in vitro* das riparinas A-F, assim como o desenvolvimento tecnológico de uma microemulsão contendo RipC para tratamento da leishmaniose cutânea

2.2 Específicos

- Realizar estudos *in silico* de ADME-Tox, modelagem e docagem molecular das riparinas A-F;
- Avaliar a atividade antileishmania *in vitro* das riparinas A-F sobre formas promastigotas de *Leishmania major;*
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* das riparinas A-F sobre macrófagos murinos*;*
- Obter e realizar a caracterização físico-química de uma microemulsão contendo riparina C;
- Desenvolver uma metodologia analítica de determinação de RipC em microemulsão por espectrofotometria;
- Realizar estudo de estabilidade preliminar das formulações;
- Realizar um estudo da cinética de liberação *in vitro* em células de difusão do tipo Franz das formulações;
- Avaliar a permeação cutânea *in vitro* utilizando pele de camundongos Balb/c em células de difusão do tipo Franz das formulações;
- Realizar avaliação *in vivo* da eficácia das formulações através da administração tópica após infecção experimental por *Leishmania major* em camundongos BALB/c.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. LEISHMANIOSES

3.1.1 Definição

Doenças tropicais são globalmente dispersas e de grande impacto socio-econômico, afetando principalmente pessoas pobres nos países em desenvolvimento. O interesse comercial no desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos (TROUILLER et al., 2002; RENSLO; MCKERROW, 2006) para estas doenças é limitado, pois o seu tratamento deverá ser acessível para garantir o acesso da população afetada (CRUZ et al., 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera as leishmanioses como umas das principais doenças negligenciadas no mundo, afetando principalmente a população pobre de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2010). São um grupo de doenças, com variadas manifestações clínicas, causadas por protozoários parasitas de mais de 20 espécies de *Leishmania*. A infecção por parasitas deste gênero causa um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo as formas subclínica (inaparente), localizada (lesões na pele), e infecções disseminadas (cutânea, mucosa ou visceral) (GRIMALDI; TESH, 1993; ASHFORD, 2000).

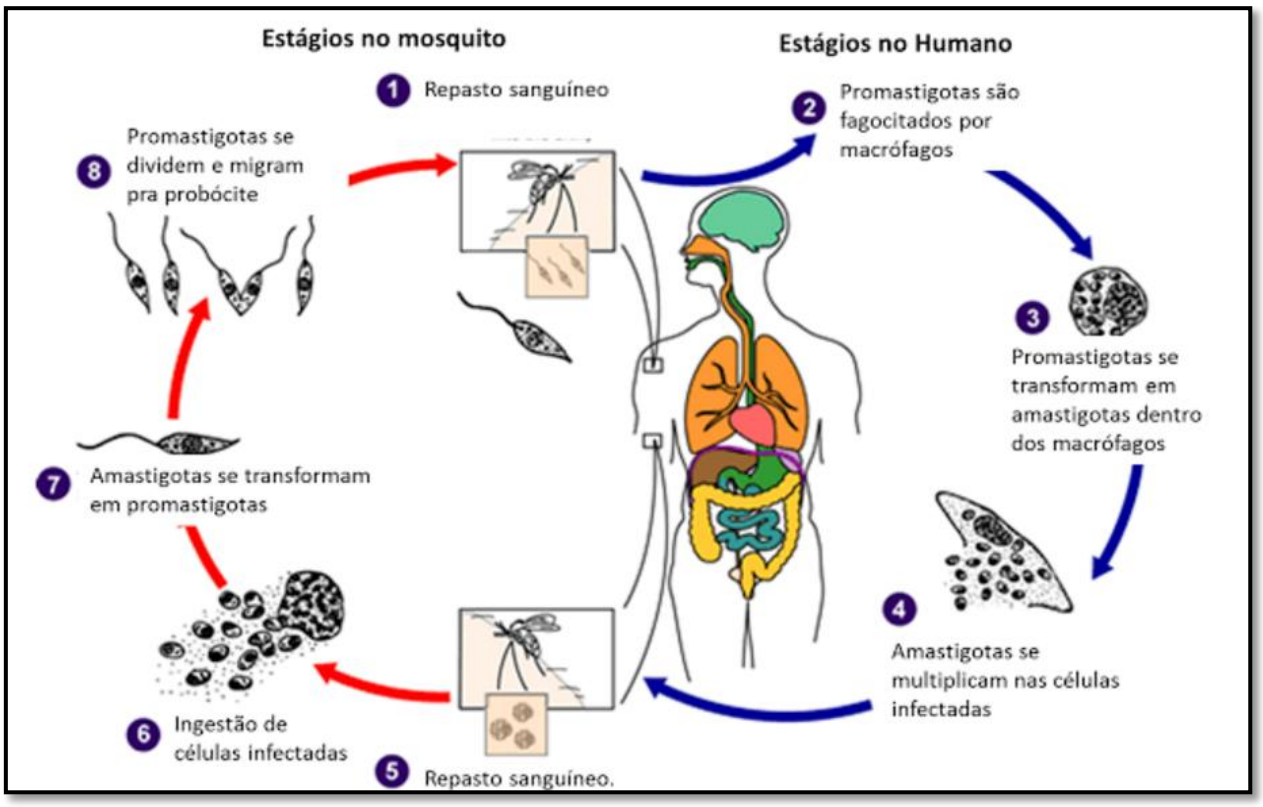
3.1.2 Etiologia e características clínicas

A infecção humana é causada por cerca de 21 de 30 espécies que infectam mamíferos. Estas incluem: o complexo *L. donovani* com 2 espécies (*L. donovani; L. infantum* no Velho Mundo ou *L. chagasi* no Novo Mundo); o complexo *L. mexicana* com 3 espécies principais (*L. mexicana, L. amazonensis* e *L. venezuelensis*); o subgênero *Viannia* com 4 espécies principais (*L. (V.) braziliensis, L. (V.) guyanensis, L. (V.) panamensis e L. (V.) peruviana*); e as espécies *L. tropica, L. major, L. aethiopica*; As diferentes espécies são morfologicamente indistinguíveis, mas podem ser diferenciadas por análise isoenzimática, métodos moleculares ou anticorpos monoclonais (CDC, 2018).

O ciclo biológico de *Leishmania spp*. apresenta estágios nos hospedeiros vertebrados e nos insetos vetores e se inicia quando o hospedeiro vertebrado é infectado com as formas promastigotas através da inoculação pelas fêmeas dos flebotomíneos durante o repasto sanguíneo (1), conforme esquema apresentado na Figura 1. Quando se encontram no organismo hospedeiro, os parasitas são fagocitados principalmente por macrófagos (2). No interior da célula, a forma promastigota se transforma em amastigota e inicia o processo de sucessivas multiplicações (3). Posteriormente, a célula hospedeira é rompida e as amastigotas resultantes das multiplicações (4), são liberadas, podendo ser interiorizadas por outras células fagocíticas mononucleares. Os insetos

vetores não infectados podem ser infectados durante o repasto sanguíneo (5) em um ser humano infectado ou em animais infectados, ocorrendo a ingestão (6) de amastigotas (sangue, na linfa interstícial, células fagocíticas). No trato digestivo do inseto, as amastigotas se convertem em promastigotas procíclicos (6) se dividem por fissão binária e migram (já como promastigotas metacíclicos, ou seja, infectantes) para a probóscide do inseto (8) e podem ser transmitidos para os hospedeiros vertebrados através de sua picada, reiniciando o ciclo (NEVES, 2004; CDC, 2018).

Figura 1. Ciclo biológico da *Leishmania sp.*



FONTE: Adaptado de CDC (2018).

Em relação a suas características clínicas, as leishmanioses podem se apresentar em duas formas: leishmaniose visceral (LV), que atinge os órgãos internos, leishmaniose tegumentar (LT), que se subdivide em leishmaniose cutânea (LC), que atinge a pele e a leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), as mucosas e a pele. No Brasil existem as três formas: A LV, a mais agressiva das leishmanioses, tem caráter sistêmico e afeta, principalmente órgãos como fígado, baço e medula óssea. Se não tratadas, leva a óbito em 90% dos casos, e atinge principalmente crianças menores de 10 anos. A LC, sendo a mais comum, é caracterizada pelo aparecimento de lesões localizadas e até mesmo dissemizadas, as quais são indolores, com bordas bem definidas, base eritematosa e fundo avermelhado. Já a LCM causa lesões destrutivas localizadas na mucosa, em geral nas vias aéreas superiores, provocando grau elevado de deformidades (WHO, 2010; ALVES et al., 2013).

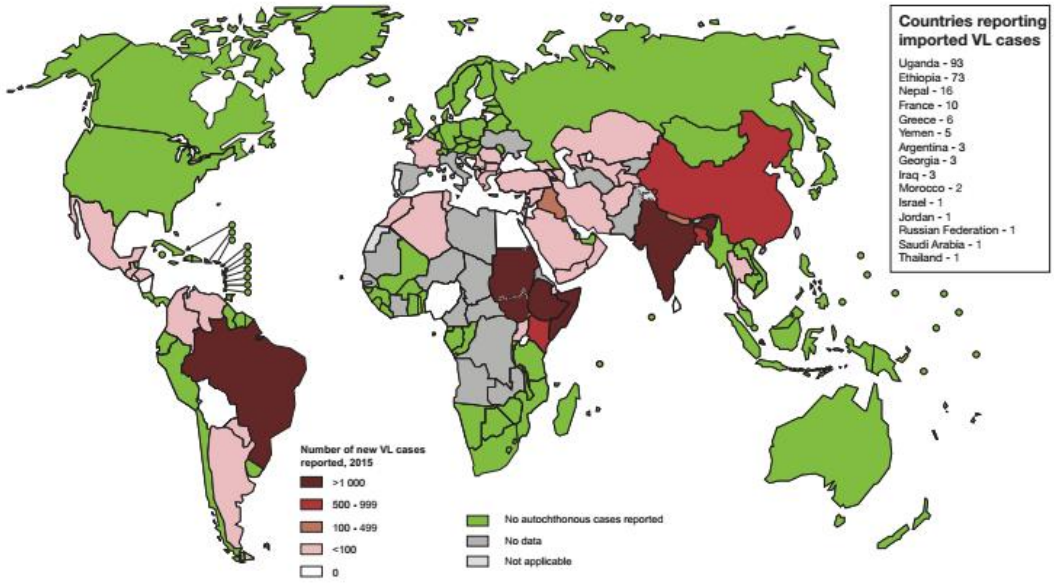
Alguns trabalhos científicos que tratam da biologia, imunologia e genética dos parasitas causadores destas doenças (OPREA; BRAUNACK-MAYER; GERICKE, 2009), porém todo esse conhecimento não consegue se reverter em novas ferramentas terapêuticas para as pessoas afetadas (ROCHA et al., 2005; LUIZE et al., 2005). Ao contrário, tais doenças têm sido progressivamente marginalizadas por aqueles encarregados pelos programas de pesquisa tanto do setor público quanto do privado. Como a maioria desses pacientes é pobre demais para custear qualquer tratamento, eles não representam praticamente nenhum mercado e a maioria fica excluída do escopo dos esforços de pesquisa e desenvolvimento da indústria farmacêutica por não representar um mercado lucrativo (OPREA; BRAUNACK-MAYER; GERICKE, 2009).

3.1.3 Epidemiologia

As leishmanioses afetam mais de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo e outras 200 milhões estão sob risco de contrair a doença, principalmente no Brasil e outros países tropicais. A cada ano são registrados dois milhões de novos casos e 350 milhões de pessoas se encontram em área de risco. Das formas clínicas apresentadas, a mais fatal é a visceral e as 500.000 pessoas (estimadas) afetadas por ela anualmente morrerão (WHO, 2016).

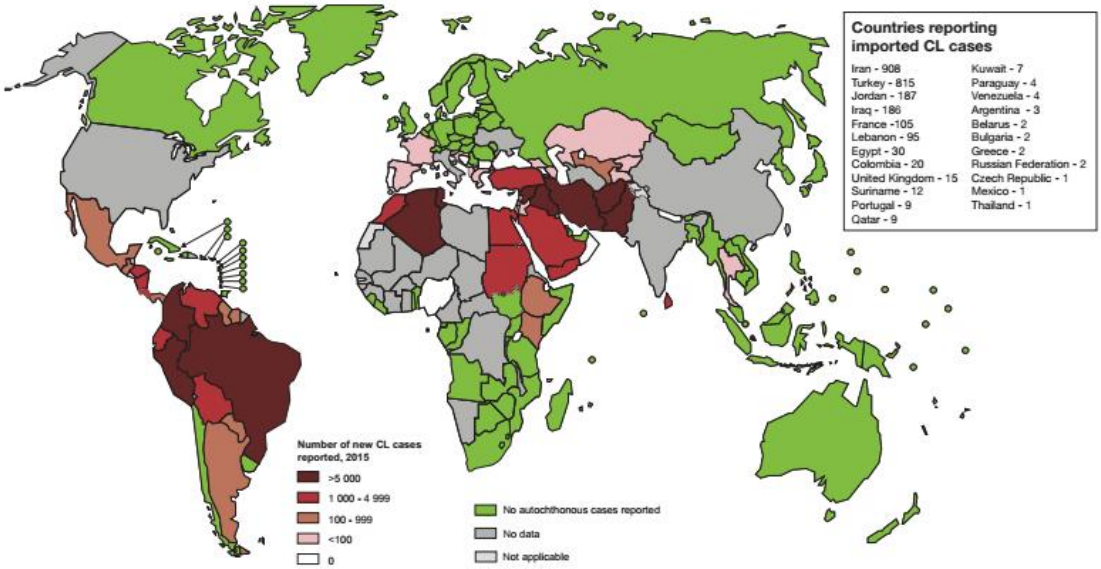
Epidemias recorrentes de leishmaniose visceral (LV) no leste da África, incluindo Etiópica, Quênia, Sudão do Sul e Sudão, além de vários casos no Brasil, tem causado alta morbidade e mortalidade na população afetada (Figura 2). Já a sua forma cutânea (LC) tem gerado grande epidemias em diferentes partes do Afeganistão e na Síria (Figura 3). De acordo com os dados disponíveis até 2014, estima-se que 90% dos novos casos de LV ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão e a maioria dos casos de LC ocorreram no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria. Quase 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2018).

Figura 2. Distribuição de novos casos de LV no mundo no ano de 2015.



FONTE: WHO (2018).

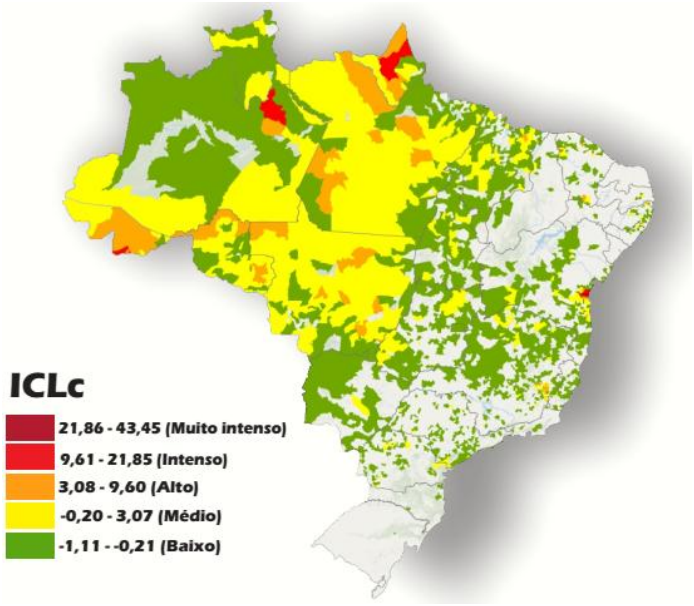
Figura 3. Distribuição de novos casos de LC no mundo no ano de 2015.



FONTE: WHO (2018).

Segundo dados da OMS para 2016, o Brasil apresentou um índice composto de casos de leishmaniose cutânea considerado intenso (Figura 4), com uma incidência total de 13 casos para cada 100.000 habitantes e uma ocorrência de 12.690 novos casos (SISLEISH, 2017). A LC apresentada na região das Américas é complexa, com variações intra e interespecíficas nos ciclos de transmissão, hospedeiros reservatórios, vetores de flebotomíneos, manifestações clínicas e resposta à terapia, e com múltiplas espécies de *Leishmania* circulantes na mesma área geográfica (WHO, 2018).

Figura 4. Índice composto de leshmaniose cutânea (ICLc) no Brasil.



FONTE: SISLEISH (2017)

3.1.4 Diagnóstico e tratamento das leishmanioses

O diagnóstico laboratorial das leishmanioses baseia-se na visualização dos parasitas nos tecidos, na sorologia e na cultura de células. Exames moleculares que utilizam a reação em cadeia da polimerase são ainda pouco utilizados na rotina de laboratórios para diagnóstico, apesar de ser uma opção útil na detecção do parasita devido a sua grande sensibilidade (MURRAY et al. 2005).

Outros métodos de diagnósticos importantes são os imunológicos, os quais utilizam a eletroforese de enzimas e anticorpos monoclonais, usados também na identificação da espécie infectante. Entre os métodos imunológicos, o teste de intradermorreação de Montenegro é o mais utilizado no Brasil para a leishmaniose cutânea, sendo fundamentado na visualização da resposta celular, e testes sorológicos para o diagnóstico preciso da leishmaniose visceral (BRASIL, 2014).

Quanto ao tratamento, há uma necessidade de novas alternativas terapêuticas uma vez que, desde 1940, os antimônios pentavalentes estibogluconato de sódio (Pentostan®) e Antimoniato de Meglumine (Glucantime®), além da Anfotericina B lipossomal (Ambisome®) são a principal linha quimioterapêutica para o tratamento das leishmanioses, limitando-se a via de administração parenteral. Esta é uma via invasiva e, além disso, há uma necessidade de uma terapia de longa duração, com alta toxicidade e que vem apresentando uma crescente falha terapêutica especialmente por falta de adesão ao tratamento pelos pacientes (LAHIRY et al., 2018). Dessa forma, o alto custo e a falta de eficácia dos tratamentos tradicionais vêm sendo um estímulo na busca de alternativas terapêuticas (KEDZIERSKI et al., 2009)**.**

Os efeitos adversos dos antimoniais estão relacionados principalente a toxicidade cardíaca, hepática, pancreática, renal e do sistema músculo-esquelético. A cardiotoxicidade traduz-se,

principalmente, por distúrbios da repolarização ventricular, sendo essas alterações dose e tempo dependentes. As reações relacionadas ao aparelho gastrintestinal são frequentes e incluem náuseas, anorexia e dor abdominal (NEVES et al., 2011; BRASIL, 2014). Uma síntese dos principais fármacos e suas características é apresentado no Quadro 1.

Quadro 1. Fármacos usados no tratamento das leishmanioses.

Fármaco	**Estrutura química**	**Vantagens**	**Mecanismo de ação**	**Desvantagens**
Antimoniais pentavalentes	Estibogluconato de sódio (Pentostan®) e Antimoniato de meglumina (Glucantime®)	Droga de 1ª linha	Mata os parasitas por fragmentação do DNA	Incidencia de resistência é crescente e vem perdendo sua eficácia devido a uso irracional.
Anfotericina B	Antifúngico poliênico (Ambisome®)	95% de eficácia. Alta afinidade pelo ergosterol, esteróide predominante na membrana de fungos e leishmanias.	Formação de poros na membrana celular de promastigotas	Alto custo. Efeitos adversos renais.
Miltefosine	Alquilfosfocolina (Milteforan®**)**	Primeiro medicamentos oral usado na LV.	Causa apoptose em *L. donovani*. Reduz a proliferação de parasitas	Uso prolongado e teratogenicidade
Paromomicina	Antibiótico aminoglicosídeo	Cura LV e LC. Novo, simples e facilmente administrado.	Efeitos sobre a mitocôndria	Terapia tópica de alto custo para LC.Disponibilida-de limitada.
Sitamaquina (descontinuado)	8-aminoquinolina	Desenvolvido somente para LV. Administração oral. Sem relato de resistência nos ensaios clínicos.	Afeta a motilidade, morfologia e crescimento.	Efeitos adversos como vômitos, dispepsia, cianose, síndrome nefrótica, glomerulonefrite.
Pentamidina	Diamina aromática	Administrado na forma de sal para LV.	Age sobre transportadores de arginina e poliaminas	↓ da eficácia e alta resistência. Efeitos tóxicos: hipoglicemia e nefrotoxicidade

Fonte: (BEKHIT et al., 2018)

O uso ineficiente das terapias existentes vem conduzindo ao aumento da resistência aos medicamentos de primeira linha e, em algumas áreas endêmicas, seu uso já é limitado devido à falta de eficácia. O grupo de fármacos de segunda linha usadas no tratamento da leishmaniose incluem diamidinas (pentamidina) e anfotericina B, mas estas também são tóxicas e apresentam efeitos

colaterais graves, como anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia, alterações cardíacas e hipotensão (NEVES et al. 2011; BRASIL, 2014).

A ausência crescente de resposta terapêutica e o alto custo dos tratamentos tradicionais evidencia a necessidade de novas alternativas terapêuticas. A busca por novas entidades químicas que possam contribuir neste cenário, tem sido desafiadora para os pesquisadores (KEDZIERSKI et al, 2009), considerando o alto custo dos antimoniais, o tratamento prolongado e a via de administração parenteral que dificultam a terapia antileishmania. Dessa foram, a inserção de novas ferramentas terapêuticas se faz necessária (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

3.2 PLANTAS MEDICINAIS

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20 % do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, bastante escasso nos países desenvolvidos, tem atualmente um valor econômico inestimável em diversas áreas, porém é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2005). A necessidade de estimular pesquisas sobre plantas brasileiras, com vista na descoberta de substâncias com atividades biológicas, já se tornou evidente no meio científico nacional e internacional. Este interesse tem sido mais expressivo devido à grande variedade de espécies e às mais diversas propriedades que muitas delas apresentam, tais como: tintoriais, odoríferas, estimulantes, alucinógenas, dentre outras (GOTTLIEB; MORS, 1978).

Um dos maiores e mais importantes fatores para esse interesse em novos compostos com propriedades farmacológicas é a enorme diversidade de constituintes químicos que podem ser selecionados, devido à complexidade da constituição química das plantas (BADKE et al., 2012). Os produtos das transformações químicas executadas pelo metabolismo secundário das plantas, tais como compostos terpênicos, alcalóides, glicosídios e outros derivados naturais, têm sido objetos de estudo ao longo de muitos anos (MATOS, 1998).

Com o objetivo de identificar novos compostos com atividade leishmanicida, há vários anos, uma diversidade de pesquisas com plantas abordando várias compostos incluindo neoligninas (BARATA, 2000), alcalóides cantin-6-ona (FERREIRA, 2002), terpenos (GLASER et al., 2015), α-pineno (RODRIGUES et al., 2015), lupeol (SOUZA et al., 2017), ácido gálico e ácido elágico (ALVES et al., 2017) e alfa-pineno (ZADEH MEHRIZI et al., 2018) tem demonstrando atividade leishmanicida contra várias espécies de *Leishmania.*

3.3 *Aniba riparia*

A família Lauraceae é largamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. É constituída por 52 gêneros e 2000 a 3000 espécies (TAKAKU; HABER; SETZER, 2007). Possui

vasta exploração comercial, como na culinária, em marcenaria e construção civil, na fabricação de papel, na indústria de perfumaria e ainda na indústria química e medicina popular.

Conhecida popularmente como “louro”, *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) tem o centro da sua diversidade na Amazônia e nas Guianas, podendo estender-se para os Andes, para as montanhas do norte da Venezuela, leste e sul do Brasil (NUNES et al., 2013). Alcalóides do tipo alcamida foram isolados do fruto verde da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), as riparinas I, II e III. Esses compostos possuem atividades farmacológicas comprovadas em estudos pré clínicos, como atividade espasmolítica (THOMAS et al., 1994), antinociceptiva (ARAUJO et al., 2009), antimicrobiana (CATÃO et al., 2010), antiinflamatória (CARVALHO et al., 2013), ansiolítica e antidepressiva (VASCONCELOS et al., 2015) e vasodilatadora (GARCIA et al., 2016).

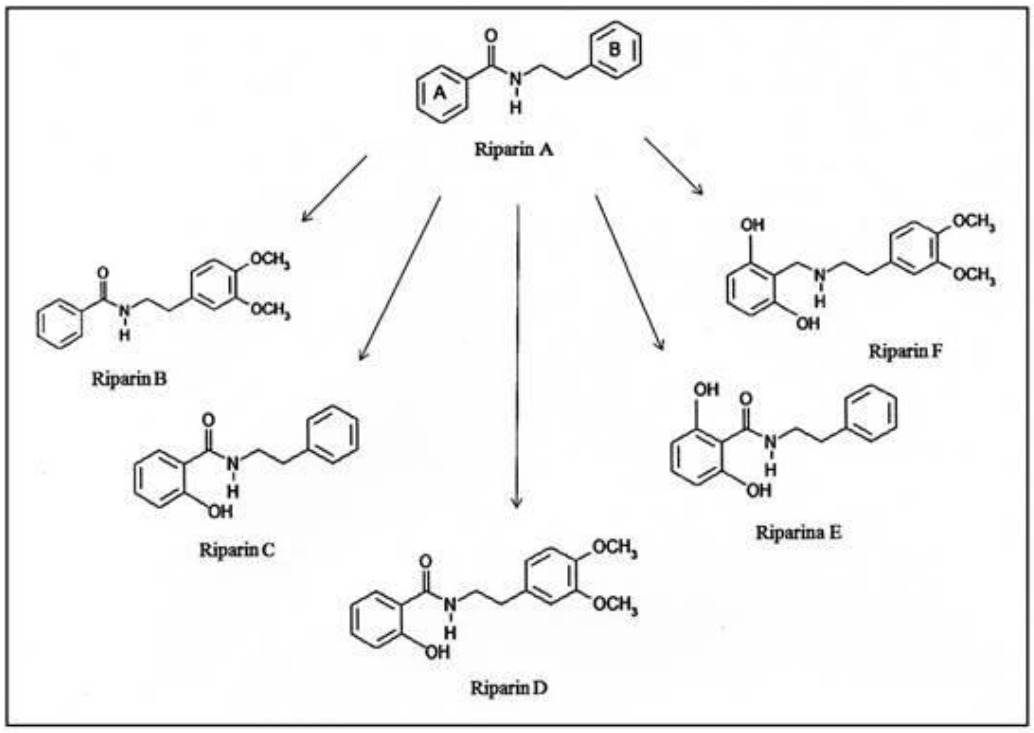
3.4 RIPARINAS E ANÁLOGOS SINTÉTICOS

Ainda que a pesquisa com plantas medicinais seja de suma importância, muitas vezes sua exploração comercial é dificultada devido ao baixo rendimento nos processos extrativos. Assim, a síntese de compostos de interesse encontrados em plantas ou mesmo de análogos é uma alternativa a esse obstáculo, já que há o benefício da atividade biológica sem os mesmos custos e a demora de obtenção do produto natural. Além disso, a síntese de análogos permite a otimização da atividade encontrada, pois há a possibilidade de síntese de uma molécula com propriedades semelhantes, porém com grupos em posições diferentes, descartando características desinteressantes e aumentando o potencial terapêutico do composto (COSTA et al., 2009).

A descoberta de fármacos baseada na modificação estrutural de moléculas conhecidas leva à identificação de novos compostos-protótipos que atuam pelo mesmo mecanismo farmacológico da molécula de origem. Esta estratégia tem sido largamente empregada na indústria farmacêutica para melhoria de medicamentos já comercializados (NIELSEN;SCHREIBER, 2008).

As riparinas provém da *Aniba riparia* que, do ponto de vista fitoquímico, apresentam uma classe predominante de alcalóides com função alcamida (CUSTODIO; DA VEIGA JUNIOR, 2014). Na natureza encontram-se as riparinas I, II e III, no entanto, em quantidades limitadas para suprir os estudos e futura produção de medicamentos. A partir do desenvolvimento de uma nova rota de síntese da riparina III, foi possível a adaptação de uma metodologia simples e de resultados seguros para obtenção dos análogos sintéticos das riparinas naturais (riparinas A, B, C, D, E e F). Através da reação de Schotten-Bauman (cloreto de ácido e feniletilamina com trietilamina 15 em DCM), foram obtidas a N-benzoiltiramina (riparina A) e, a partir da condensação dos seus ésteres metílicos com as fenetilaminas substituídas a 2,6-diídroxi-N-fenetil-benzamida, obteve-se as riparinas E e F (GUTIERREZ, 2007), conforme demonstrado na Figura 5.

Figura 5. Estrutura molecular das riparinas sintéticas (B, C, D, E e F) baseada na estrutura fundamental da riparina A.



Fonte: (ARAUJO et al., 2016).

Alguns trabalhos vem sendo publicados com estas moléculas análogas. As riparinas A-F apresentaram atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* com avaliação do estresse oxidativo, testes de citotoxicidade, antimicrobiana, antihelmíntica e estudos comportamentais (NUNES et al., 2013). Outras moléculas apresentaram atividade antiinflamatória (riparina B) (SANTIAGO et al., 2015) e antioxidante e citotóxica sobre células tumorais (riparinas C, D, E, F) (NUNES, 2014). Já a molécula riparina A apresentou significativa atividade leishmanicida *in vitro* sobre *L. amazonensis* (ARAÚJO et al., 2016).

A RipC é uma substância que se apresenta como um pó branco, cristalino e de baixa solubilidade aquosa. Apresenta um radical OH adicionado a riparina A (Figura 1) capaz de formar ligações de H com importantes alvos moleculares de *Leishmania major* (dados não publicados), apresentou efetividade máxima contra esquistossomas em baixas concentrações (NUNES et al., 2013) e apresenta potente atividade antibacteriana *in vitro* (COSTA et al., 2016).

3.5 ESTUDOS *IN SILICO*

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, tendo suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008). Os avanços expressivos da química e biologia e a melhor compreensão de

vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo.

A farmacocinética teórica *in silico* é uma abordagem muito utilizada no estudo inicial das propriedades ADME-Tox (Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) com o objetivo de diminuir o gasto desnecessário em ensaios biológicos de compostos com elevada probabilidade de problemas farmacocinéticos e tóxicos futuros, economizando tempo e investimento (KADAN; ROY, 2007). Além desta abordagem, estudos de docagem molecular são de grande importância no planejamento de fármacos e na descoberta de novos alvos terapêuticos para o tratamento das leishmanioses (MAMIDALA et al., 2016).

A triagem virtual e, em particular a triagem virtual baseada em receptores, surgiu como um método confiável e acessível para identificar novos compostos através da triagem *in silico* de bases de dados químicas (AMMAR, 2017). A pesquisa de novos compostos contra *Leishmania* spp. permitem identificar inibidores específicos de alvos moleculares do parasita (REBOLLO; OLIVERO-VERBEL; REYES, 2013) e há uma necessidade urgente para o desenvolvimento de fármacos mais seguros e mais eficazes contra este parasita. Dessa forma, estudos de docagem molecular podem ser usados na busca de compostos com similaridade a drogas leishmanicidas e que tem potencial chances de interações com receptores específicos nos parasitas (MUTLU, 2014; SHALEV et al., 2015; MAMIDALA, R. et al., 2016).

3.6. MICROEMULSÕES

3.6.1 Definição e características especiais

A mistura de um óleo e de um composto tensoativo com água forma, no geral, uma emulsão leitosa-turva que apresentam separação de fases após um tempo. Em 1943, Hoar e Schulman observaram que essa emulsão turva e instável podia ser convertida em um líquido opticamente transparente e termodinamicamente estável por adição de um álcool. Em 1959, o termo microemulsão foi empregado pela primeira vez para designar este sistema (SILVA et al., 2015). As microemulsões podem ser definidas ainda como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes, de dois líquidos imiscíveis (usualmente água e óleo) estabilizados por um filme de compostos tensoativos (com ou sem cotensoativos), localizados na interface óleo/água (LAWRENCE, 1994).

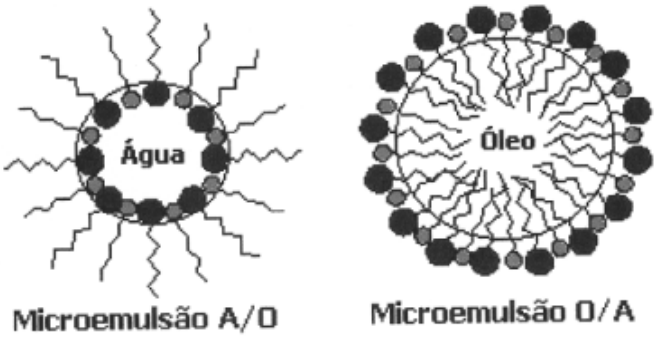
Há equívocos na literatura relacionados ao uso do termo, em razão, principalmente, do prefixo “micro” utilizado para denotar esses sistemas e ao crescente uso do prefixo “nano” para este mesmo fim. As dimensões que caracterizam as microemulsões encontram-se não em escala micrométrica, mas sim em escala nanométrica, normalmente da ordem de 10 a 140 nm

(YACUBIAN, 2002). Além disso, as microemulsões diferem das nanoemulsões por apresentarem maior estabilidade termodinâmica, enquanto as nanoemulsões apresentam uma maior estabilidade cinética. Microemulsões são sistemas translúcidos e apresentam gotículas com dimensões menores do que as formadas nas nanoemulsões (SILVA et al., 2015).

Formulações microemulsinadas diferem das emulsões convencionais por características básicas. As microemulsões possuem tensão interfacial muito baixa quando comparadas a emulsões convencionais, podendo levar à sua formação espontânea e um tamanho nanométrico das suas gotículas (DAMASCENO et al., 2011). Além disso, a emulsão é termodinamicamente instável e pode eventualmente separar fases e as emulsões são turvas enquanto microemulsões são transparentes ou translúcidas. As emulsões requerem grandes quantidades de energia para seu preparo, enquanto as microemulsões podem ser preparadas a frio e com leve agitação. Isto tem grande importância nos seus custos tecnológicos (KLEIN, 2007).

De forma geral e de maneira semelhante as emulsões, podem-se ser do tipo água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), conforme Figura 6, dependendo do tipo e proporção do seus componentes. Para O/A, a fase contínua ou externa é constituída por água e as gotículas de óleo constituem a fase interna, e A/O a fase externa é oleosa e fase interna composta por gotículas de água. Além disso, podem ser formadas ainda formar as estruturas bicontínuas, quando as concentrações de fase aquosa e fase oleosa são similares (ARAÚJO, 2009).

Figura 6. Estrutura das microemulsões.

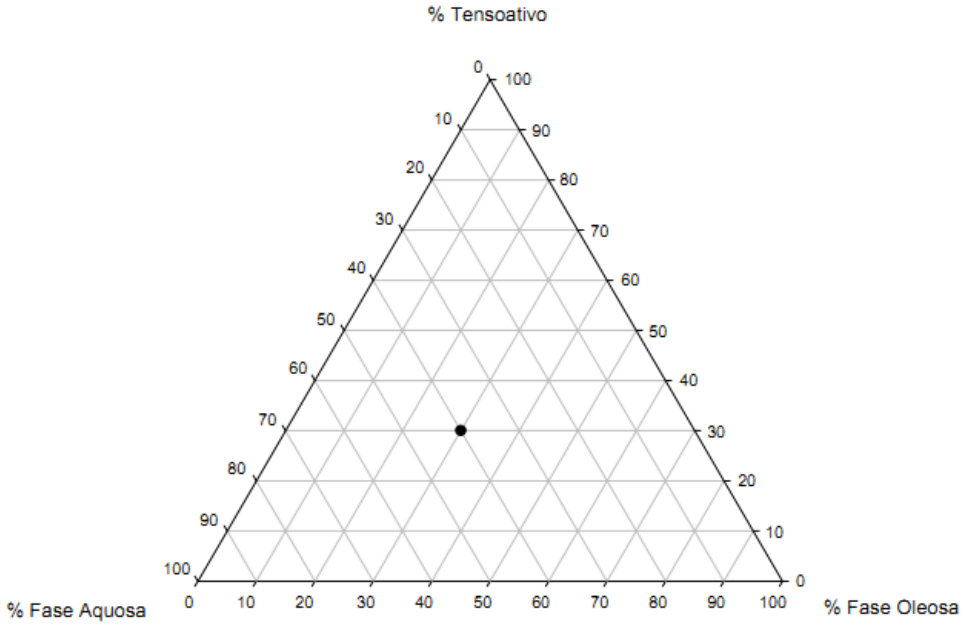


Fonte: (OLIVEIRA et al., 2004).

Formulações de microemulsões são geralmente desenvolvidas utilizando diagramas de fase ternários, nos quais é possível identificar os componentes mais adequados e suas proporções relativas para a obtenção de sistemas fisicamente estáveis (SILVA et al., 2015). Em tal diagrama de fases, cada vértice do diagrama representa 100% de um dos seus componentes (Figura 7) e no caso da utilização de um cotensoativo, geralmente é utilizada uma mistura com o tensoativo escolhido e forma-se um diagrama pseudoternário. O diagrama é construído através da preparação de uma série

de misturas binárias e a titulação com um terceiro componente, obtendo as regiões de microemulsão (KLEIN, 2007). Na Figura 7, o ponto destacado no diagrama é de uma preparação com composição de 40% de fase aquosa, 30% de fase oleosa e 30% de tensoativo.

Figura 7. Representação esquemática de um diagrama de fases.



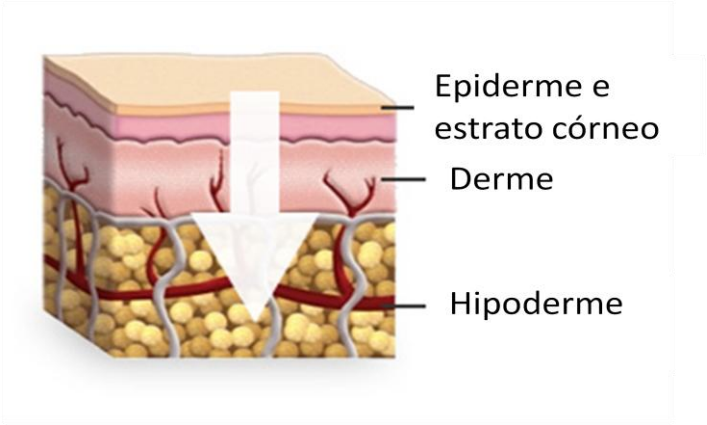
Fonte: KLEIN (2007).

As microemulsões apresentam aplicação como sistemas de liberação de fármacos que vem sendo desenvolvidos em todo mundo e possuem inúmeras vantagens, como: aumento da solubilização e das taxas de dissolução de fármacos; protegem moléculas instáveis da degradação; possuem elevada superfície de contato, facilitando, assim, o transporte extravascular e penetração cutânea de princípios ativos (WESTESEN et al., 2001; MEHTA; KAUR, 2010).

3.6.2 Microemulsões e penetração cutânea de fármacos

Na atualidade, os fármacos são veiculados em formas farmacêuticas ditas convencionais e geralmente não conseguem atingir concentrações apreciáveis no tecido alvo do organismo porque, entre o local de aplicação e o alvo onde deve exercer seu efeito farmacológico, interpõem-se uma série de barreiras biológicas (DAMASCENO; SILVA; OLIVEIRA et al., 2011). Um exemplo clássico de barreira biológica que dificulta a absorção de fármacos é a pele, como demonstrado na Figura 8.

Figura 8. Barreiras para a penetração cutânea de fármacos.



Fonte: Adaptado de Wellsprings, 2013.

A pele é composta pelas camadas epiderme, derme e hipoderme (tecido conjuntivo frouxo ou adiposo), que funcionam como barreiras para a penetração cutânea de fármacos (Figura 8). A epiderme possui camadas de estrato córneo (composto por células mortas queratinizadas - os corneócitos) e compõe a principal barreira para a permeação de diversos fármacos (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008). Além disso, os corneócitos são revestidos por uma fina camada de manto hidrolipídico, que consiste no sebo secretado pelas glândulas sebáceas, juntamente com o suor, bactérias e células mortas da pele. Esta camada é uma barreira adicional à permeação de fármacos através do estrato córne (PROW et al., 2011).

O desenvolvimento de formulações para aplicação na pele é uma estratégia interessante para transportar fármacos cuja ação é a própria pele, ou até mesmo para ação sistêmica, como é o caso dos sistemas transdérmicos (SOARES et al., 2015). Isto representa uma alternativa para superar aspectos indesejados relacionados às características farmacológicas dos fármacos e a utilização de outras vias de administração (SILVA et al., 2015). Algumas vantagens e desvantagens relacionadas ao uso de medicamentos pela via cutânea podem ser resumidas no Quadro 2.

Quadro 2. Vantagens e desvantagens relacionadas ao uso de medicamentos pela via cutânea.

VANTAGENS	
Rota controlada e não invasiva de administração de medicamentos, propiciando concentração plasmática mais constante.	Pode ser aplicado pelo próprio paciente, e ainda sem dores durante a aplicação, evitando traumas associados à terapia parenteral.
Possibilidade de interromper a liberação do medicamento em casos de superdosagem, no caso de adesivos e microagulhas.	Aumenta a tolerabilidade e eficácia de alguns medicamentos que ao serem administrados por via oral sofrem excessiva degradação na primeira passagem no metabolismo.
Pode aumentar a adesão do paciente em função da reduzida frequência de administração.	Rota alternativa para medicamentos que podem causar irritação gastrointestinal, ou sangramentos ao serem consumidos via oral
DESVANTAGENS	
Nem todas as substâncias são passíveis de administração pela via cutânea.	A aplicação a médio e longo prazo pode causar irritação cutânea.
Em alguns casos a metabolização pelas enzimas da pele evita que o medicamento alcance a região vascularizada.	As doses de medicamentos liberadas são quantitativamente menores quando comparadas com injetáveis.

Fonte: Adaptado de SERAFIM et al., 2013.

De modo geral, na administração cutânea de medicamentos, a penetração cutânea dos fármacos é limitada, tendo em vista a pele ser importante barreira biológica que deixa penetrar apenas algumas substâncias em determinadas condições (OLIVEIRA et al., 2004). O desenvolvimento de formulações que garantam uma penetração eficiente através do estrato córneo é fundamental e a taxa de penetração de uma droga através de membranas biológicas, como a pele, pode ser aumentada pela utilização de promotores de permeação como as microemulsões (TSAI et al., 2011). Estas, não só aumentam a permeabilidade da pele, como também aumentam a solubilização do fármaco na formulação e a sua partição para a pele (DUANGJIT et al., 2012).

3.6.3 Fármacos em microemulsões para tratamento de leishmaniose cutânea

Embora não seja fatal, a leishmaniose cutânea ou também chamada nas Américas de leishmaniose tegumentar americana é uma das afecções dermatológicas de grande importância pelo grau de deformidades que pode provocar no ser humano, com reflexos no campo social e econômico. Com isso, a doença deve ser tratada de forma a acelerar sua cura, reduzir as lesões e prevenir a disseminação do parasito ou as recorrências, reduzindo assim a morbidade associada (WHO, 2010).

Diante das limitações na terapêutica atual das leishmanioses, alguns trabalhos vem apresentando abordagens terapêuticas alternativas, incluindo a identificação e o estudo de formulações para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea (SANTOS et al., 2008; COELHO et

al., 2018). Esse tipo de tratamento pode ser interessante nos casos de doença não disseminada, oferecendo muitas vantagens em comparação ao tratamento convencional, como facilidade de administração do medicamento, menor incidência de efeitos adversos e redução dos custos associados ao tratamento (RODRIGUES, 2012).

Recentemente, sistemas de liberação de fármacos para aplicação cutânea utilizando microemulsões como agentes carreadores de fármacos com baixa solubilidade aquosa vem sendo desenvolvidos (FIGUEIREDO et al., 2015; LIMA et al., 2018; BENIGNI et al., 2018; CARVALHO et al., 2018). Tais sistemas são conhecidas por aumentarem a disponibilização de certos fármacos para as camadas mais profundas da pele tendo em visto suas características especiais, composição e seu reduzido tamanho de gotícula (CALLENDER et al., 2017).

Fármacos incorporados em sistemas microemulsionados tem potencial aplicação na terapêutica antileishmania (MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2016; KHALIL et al., 2018). Dessa forma, alguns estudos vem avaliando a utilização de alguns fármacos incorporados em microemulsão, como a anfotericina B (MORAIS et al., 2018), fluconazol (OLIVEIRA et al., 2015), paromomicina (KHALIL et al., 2018) e derivados de produtos naturais como a quercetina (GUPTA et al., 2015) como potencial alternativa terapêutica para tratamento das leishmanioses.

Dessa forma, tendo em vista as inúmeras vantagens no emprego das microemulsões para administração cutânea e que fármacos incorporados em sistemas microemulsionados tem potencial aplicação na terapêutica antileishmania e que a Riparina C apresenta uma potente atividade citotóxica *in vitro,* este trabalho objetiva realizar a avaliação *in silico* e antileishmania *in vitro* das riparinas A-F, assim como o desenvolvimento tecnológico de uma microemulsão contendo RipC e sua avaliação farmacológica *in vivo* da atividade antileishmania.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C.F.; FIGUEIREDO, M.M.F.; SOUZA, C.C.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; RASO, P.; SOARES, R.P.; TAFURI, W.L. American tegumentary leishmaniasis: Effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of *Leishmania* in skin. **PLoS ONE.** v. 8, n.5, p. e63343, 2013.

ALVES, M.M.M.; BRITO, L.M.; SOUZA, A.C.; QUEIROZ, B.C.S.H.; DE CARVALHO, T.P.; BATISTA, J.F.; OLIVEIRA, J.S.S.M.;, DE MENDONÇA, I.L.; LIRA, S.R.S.; CHAVES, M.H.; GONÇALVES, J.C.R.; CARNEIRO, S.M.P.; ARCANJO, D.D.R.; CARVALHO, F.A.A. Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by Leishmania major. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** v.390, n.9, p.893-903, 2017.

AMMAR, Q. *In silico* pharmacodynamics, toxicity profile and biological activities of the Saharan medicinal plant *Limoniastrum feei*. **Braz. J. Pharm. Sci.** v. 53, n.3, e 61, 2017.

ARAUJO, É.J.F.; LIMA, L.K.F.; SILVA, O.A.; JÚNIOR, L.M.R.; GUTIERREZ, S.J.C.; CARVALHO, F.A.A.; LIMA, F.C.A.; PESSOA, C.; FREITAS, R.M.; FERREIRA, P.M.P. *In vitro* antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A, an analog of the Amazon alkamides from *Aniba riparia* (Lauraceae). **Acta Amaz**. v. 46, n. 3, p. 309-314, 2016.

ARAUJO, F.L. MELO, C.T. ROCHA, N.F.; MOURA, B.A.; LEITE, C.P.; AMARAL, J.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; VASCONCELOS, S.M.; VIANA, G.S.; SOUSA, F.C. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol**. v.380, n.4, p.337-344, 2009.

ASHFORD, R.W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **J. Parasitol**. v.30, n.12-13, p.1269–1281, 2000.

BADKE, M.R.; BUDÓ, M.L.D.; ALVIM, N.A.T.; ZANETTI, G.D.; HEISLER, E.V. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto & Contexto - Enferm.** v.21, n.2, p.363-370, 2012.

BARATA, L.E.S.; SANTOS, L.S.; FERRI, P.H.; PHILLIPSON, J.D.; PAINE, A.; CROFT, S.L. Antileishmanial activity of neolignans from Virola species and synthetic analogues. **Phytochem.** v.55, p.589-595, 2000.

BEKHIT, A.A.; EL-AGROUDY, E.; HELMY, A.; IBRAHIM, T.M.; SHAVANDI, A.; BEKHIT, A.E.A. Leishmania treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. **Eur. J. Med. Chem.** v. 160, p.229-244, 2018.

BENIGNI, M.; PESCINA, S.; GRIMAUDO, M.A.; PADULA, C.; SANTI, P.; NICOLI, S. Development of microemulsions of suitable viscosity for cyclosporine skin delivery. **Int. J. Pharm.** v. 545, n.1-2, p.197-205, 2018.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **J. Ethnopharmacol**. v.100, p.131-134, 2005.

CALLENDER, S.P.; MATHEWS, J.A.; KOBERNYK, K.; WETTIG, S.D. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **Int. J. Pharm**. v. 526, n. 1-2, p. 425-442, 2017.

CARVALHO, A.L.M.; SILVA, J.A.; LIRA, A.A.M.; ALMEIDA, E.D.P.; NUNES, R.S.; SARMENTO, V.H.V.; VERAS, L.M.C.; DE ALMEIDA LEITE, J.R.; LEAL, L.B.; DE SANTANA, D.P. Third-Generation Transdermal Delivery Systems Containing Zidovudine: Effect of the Combination of Different Chemical Enhancers and a Microemulsion System. **AAPS PharmSciTech.** v. 19, p.7, p. 1-9, 2018.

CARVALHO, A.M. VASCONCELOS, L.F.; RIOS, E.R.; DIAS, M.L.; SILVA, M.I.; DE FRANÇA FONTELES, M.M.; FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.; DE SOUSA, F.C. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methil-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chem. Biol. Interact**. v.205, n.3, p.165-172, 2013.

CATÃO, R. M. R. BARBOSA-FILHO, J.M.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; SILVA, M.A.R.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.N.P. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de

riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus.* **Rev. Bras. Anál. Clín.** v.42, n.1, p.9-14, 2010.

CDC. Center of Disease Control. Disponível em: http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html. Acesso em: 19 Nov. 2018.

COELHO, E. S. ; LOPES, G. L. N. ; PINHEIRO, I. M. ; HOLANDA, J. N. P. ; ALVES, M. M. M. ; NOGUEIRA, N. C. ; CARVALHO, F. A. A. ; CARVALHO, A. L. M.. Emulgel based on amphotericin B and bacuri butter (Mart.) for the treatment of Cutaneous Leishmaniasis: characterisation and assays. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 44, n.10, p. 1713-1723, 2018.

COSTA, L.M.; DE MACEDO, E.V.; OLIVEIRA, F.A.; FERREIRA, J.H.; GUTIERREZ, S.J.; PELÁEZ, W.J.; LIMA, F.C.; DE SIQUEIRA JÚNIOR, J.P.; COUTINHO, H.D.; KAATZ, G.W.; DE FREITAS, R.M.; BARRETO, H.M. Inhibition of the NorA efflux pump of Staphylococcus aureus by synthetic riparins. **J. Appl. Microbiol**. v. 121, n.5, p.1312-1322, 2016.

COSTA, P.R.R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Rev. Virt. Quím.** v. 1, n. 1, p. 58-66, 2009.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin. Microb. Rev.** v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CRUZ, A. K.; TOLEDO, J.S.; FALADE, M.; TERRÃO, M.C.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; KYLE, D.E.; UTHAIPIBULL, C. Current treatment and drug discovery against Leishmania spp. and Plasmodium spp.: a review. **Curr. Drug Targets.** v.10, n.3, p.178–192, 2009.

CUSTODIO, D.L.; DA VEIGA JUNIOR, V.F. Lauraceae alkaloids. **RSC Adv.** v. 4, n. 42, p. 21864-21890, 2014.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Rev. Ciên. Farma. Básica Apl.** v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

FERREIRA, M.E.; ARIAS, A.R.; ORTIZ, S.T.; INCHAUSTI, A.; NAKAYAMA, H.; THOUVENEL, C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. angustifolium. **J. Ethnopharmacol.**. v.80, p.199-202, 2002.

FIGUEIREDO, K.A.; MEDEIROS, S.C.; NEVES, J.K.; DA SILVA, J.A.; DA ROCHA TOMÉ, A.; CARVALHO, A.L.; DE FREITAS, R.M. *In vivo* evaluation of anticonvulsant and antioxidant effects of phenobarbital microemulsion for transdermal administration in pilocarpine seizure rat model. **Pharm. Biochem. Beha.** v. 131, p. 6-12, 2015.

GARCIA, D.C., PEREIRA, A.C., GUTIERREZ, S.J., BARBOSA-FILHO, J.M., LEMOS, V.S., CÔRTES, S.F., Structure-related blockage of calcium channels by vasodilator alkamides in mice mesenteric artery. **Vasc. Pharmacol.** v. 82, p. 60–65, 2016.

GLASER, J.; SCHULTHEIS, M.; MOLL, H.; HAZRA, B., HOLZGRABE, U.Antileishmanial and cytotoxic compounds from Valeriana wallichii and identification of a novel nepetolactone derivative. **Molecules**. v. 20, n.4, p. 5740-5753, 2015.

GOTTLIEB, O.R.; MORS, W.A. Fitoquímica amazônica: uma apreciação em perspectiva. **Interciência**. v.34, p.252-263, 1978.
GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008.

GRIMALDI, J.R.; G.; TESH, R.B. Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev**. v.6, n.3, p.230–250, 1993.

GUIDO, R.V.C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Virtual screening and its integration with modern drug designtechnologies. **Curr. Med. Chem.** v.15, n.1, p.37-46, 2008.

GUPTA, S.; MOULIK, S.P.; LALA, S.; BASU, M.K.; SANYAL, S.K.; DATTA, S. Designing and testing of an effective oil-in-water microemulsion drug delivery system for *in vivo* application. **Drug Deliv.** v. 12, n.5, p.267-273, 2015.

GUTIERREZ, S. J. C. Synthesis of Bowdenol, a dihydrobenzofuranoid isolated from *Bowdichia virgilioides* and preparation of derivatives of Riparina isolated from *Aniba riparia* with potential biological activity. 2007. 134f. (Tese) Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. UFPB/CCS. João Pessoa-PB.

KADAN, R.U.; ROY, N. Recent trends in drug likeness prediction: a comprehensive review of in silico methods. **Ind. J. Pharm. Sci.** v.69, n.5, p.609-615, 2007.

KEDZIERSKI, L.; SAKTHIANANDESWAREN, A.; CURTIS, J.M.; ANDREWS, P.C.; JUNK, P.C.; KEDZIERSKA, K. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. **Curr. Med. Chem.** v.16, n.5, p.599-614, 2009.

KHALIL, E.A.; ALKAWAREEK, M.Y.; OTHMAN, G.; TBAKHI, B.; AL-BAKRI, A.G. Evaluation of paromomycin sulphate permeation using *ex vivo* human skin model. **Pharm. Dev. Technol.** v.13, p.1-4, 2018.

KLEIN, T. Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetilico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra esporotricose. 114. f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP, 2007.

LAHIRY, S.; DAS, A.K.; DAS, S.N.; MANNA, M. Ethanolic leaf extract of Coccinia grandis is effective against both drug resistant and drug sensitive clinical isolates of Indian Kala-azar. **J. Parasit. Dis.** v. 42, n.3, p.433-441, 2018.

LAWRENCE, M. J. Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. **Eur. J. Drug Metab. Pharm.** v. 19, n. 3, p. 257 - 269, 1994.

LIMA, M.P.D.; LOPES, E.M.; GOMES, L.D.S.; FRANÇA, A.R.S.; ACHA, B.T.; CARVALHO, A.L.M.; ALMEIDA, F.R.C. Technological development of microemulsions with perspectives for pain treatment: a patent review. **Expert. Opin. Ther. Pat**. v.28, n.9, p.691-702, 2018.

LUIZE, P.S.; TIUMAN, T.S.; MORELLO, L.G.; MAZA, P.K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and Trypanosoma cruzi. **Rev. Bras. Ciên. Farm**. v.41, n.1, p. 85-94, 2005.

MAMIDALA, R.; MAJUMDAR, P.; JHA, K. K.; BATHULA, C.; AGARWAL, R.; CHARY, M. T.; MAJUMDER, H. K.; MUNSHI, P.; SEN, S. Identification of *Leishmania donovani* Topoisomerase 1 inhibitors via intuitive scaffold hopping and bioisosteric modification of known Top 1 inhibitors. **Sci. Rep.** v.20, n.6, p.28120, 2016.

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; TORRES, E.C.; BARUD HDA, S.; ZOCCAL, K.F.; FACCIOLI, L.H.; HORI, J.I.; BERRETTA, A.A. Physicochemical characterization by AFM, FT-IR and DSC and biological assays of a promising antileishmania delivery system loaded with a natural Brazilian product**. J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 123, p.195-204, 2016.

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, p.126, 1998.

MEHTA, S. K.; KAUR, G. Microemulsions as carriers for therapeutic molecules. **Recent Pat. Drug Deliv. Formul.** v. 4, n. 1, p. 35-48, 2010.

MORAIS, A.R.V.; SILVA, A.L.; COJEAN, S.; BALARAMAN, K.; BORIES, C.; POMEL S.; BARRATT, G.; DO EGITO, E.S.T.; LOISEAU, P.M. *In-vitro* and *in-vivo* antileishmanial activity of inexpensive Amphotericin B formulations: Heated Amphotericin B and Amphotericin B-loaded microemulsion. **Exp. Parasitol**. v. 192, p. 85-92, 2018.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet.** v. 366, n. 29, p. 1561–77, 2005.

MUTLU, O. J. Molecular modeling, structural analysis and identification of ligand binding sites of trypanothione reductase from Leishmania mexicana. **J. Vector Borne Dis.** v.50, n.1, p.38-44, 2013.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana.** 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NEVES, L.O.; TALHARI, A.C.; GADELHA, E.P.N.; SILVA JÚNIOR, R.M.; GUERRA, J.A.O.; FERREIRA, L. C. L.; TALHARI, S. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por Leishmania guyanensis. **An. Bras. Dermatol**. v. 86, n. 6 , p.1092-101, 2011.

NIELSEN, T.E.; SCHREIBER, S.L. Towards the optimal screening collection: a synthesis strategy. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl. Angewandte.** v. 47, n. 1, p. 48-56, 2008.

NUNES, G.B.L. Avaliação pré-clinica e bioprospeccção de produtos derivados das riparinas. 2014. 143f. (Tese) Doutorado Rede Nordeste de Biotecnologia - Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI.

NUNES, G.B.L. COSTA, L.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; NUNES, L.C.C.; FREITAS, R. M. Prospecção científica e tecnológica da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). **Cad. Prospec.**, v.6, n.4, p.447-458, 2013.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quím. Nova**. v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, M. B.; CALIXTO, G.; GRAMINHA, M.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; CHORILLI, M. Development, characterization, and in vitro biological performance of fluconazole-loaded microemulsions for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Biomed. Res. Int.** v. 2015, 396894, 2015.

OPREA, L.; BRAUNACK-MAYER, A.; GERICKE, C.A. Ethical Issues in Funding Research and Development of Drugs for Neglected Tropical Diseases. **J. Med. Ethics.** v.35, p.310-314, 2009.

PROW, T.W.; GRICE, J.E.; LIN, L.L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev**. v. 63, n.6, p.470-491, 2011.

REBOLLO, J.; OLIVERO-VERBEL, J.; REYES, N. New agents with potential leishmanicidal activity identified by virtual screening of chemical databases: New agents with potential leishmanicidal activity. **Rev. Univ. Ind. Santander**. Salud, Bucaramanga, v. 45, n. 1, p. 33-40, 2013.

RENSLO, A.R.; MCKERROW, J. H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nat. Chem. Biol**. v.2, n.2, p.701–710, 2006.

ROCHA, L.G.; J.R.G.S. ALMEIDA, R.O. MACÊDO, J.M. BARBOSA-FILHO. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytom.** v.12 n.6-7, p.514-535, 2005.

RODRIGUES, K.A.; AMORIM, L.V.; DIAS, C.N.; MORAES, D.F.; CARNEIRO, S.M.; CARVALHO, F.A. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α-pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation *in vitro*. **J. Ethnopharmacol.** v.160, p.32-40, 2015.

RODRIGUES, L. F. Avaliação da atividade *in vivo* do antimoniato de meglumina e de sua associação com o tratamento tópico sobre Leishmania (Viannia) braziliensis isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea. (Tese) Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

SANTIAGO, R.F.; BRITO, T.V.; DIAS, J.M.; DIAS, G.J.Jr.; DA CRUZ, J.S.Jr.; BATISTA, J.A..; SILVA, R.O.; SOUZA, M.H.; DE ALBUQUERQUE RIBEIRO, R.; GUTIERREZ, S.J.; FREITAS, R.M.; MEDEIROS, J.V.; DOS REIS BARBOSA, A.L. Riparin B, a Synthetic Compound Analogue of Riparin, Inhibits the Systemic Inflammatory Response and Oxidative Stress in Mice. **Inflammation**., v.38, n.6, p.2203-2215, 2015.

SANTOS, A. M.; NORONHA, E. F.; FERREIRA, L.A.M.; CARRANZA-TAMAYO, C.O.; CUPOLILLO, E.; ROMERO, G.A.S. Efeito de uma formulação hidrofílica de paromomicina tópica na leishmaniose cutânea em pacientes com contra-indicações de tratamento com antimonial pentavalente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.41, n.5, p.444-448, 2008.

SERAFIM, M.C.; GOBBI, C.M.S.; MILANESE, F.E.; BARBOSA, L.H.; MILANESE, M.E.B. The use of transdermal route as a therapeutic possibility in anthroposophic medicine. **Arte Méd. Ampli.** v. 33, n.4, p.153-159, 2013.

SHALEV, M.; ROZENBERG, H.; SMOLKIN, B.; NASEREDDIN, A.; KOPELYANSKIY, D.; BELAKHOV, V.; SCHREPFER, T.; SCHACHT, J.; JAFFE, C.L.; ADIR, N.; BAASOV, T. Structural basis for selective targeting of leishmanial ribosomes: aminoglycoside derivatives as promising therapeutics. **Nucleic Acids Res**. v.30, n.17, p.8601-8613, 2015.

SILVA, J.D.F.; SILVA, Y.P.; PIATNICKI, C.M.S.; BÖCKEL, W.J.; MENDONÇA, C.R.B. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Quim. Nova.** v.38, n. 9, 1196-1206, 2015.

SISLEISH. OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Serviços de Vigilância. Acesso em: 01 Dez de 2017.

SOARES, M.; VITORIANO, C.; SOUSA, J.; PAIS, J. Permeação cutânea: desafios e oportunidades. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**. v. 36, n. 3, p.337-348, 2015.

SOUZA, A.C.; ALVES, M.M.M.; BRITO, L.M.; OLIVEIRA, L.G.C.; SOBRINHO-JÚNIOR, E.P.C.; COSTA, I.C.G.; FREITAS, S.D.L.; RODRIGUES, K.A.D.F.; CHAVES, M.H.; ARCANJO, D.D.R.; CARVALHO, F.A.A. *Platonia insignis* Mart., a Brazilian Amazonian Plant: The Stem Barks Extract and Its Main Constituent Lupeol Exert Antileishmanial Effects Involving Macrophages Activation. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 3126458, 2017.

TAKAKU, S.; HABER, W.A.; SETZER, W.N. Leaf essential oil composition of 10 species of Ocotea (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Biochem. Syst. Ecol**. v.35, p.525-532, 2007.

THOMAS, G.; BRANCO, U. J.; BARBOSA FILHO, J.M.; BACHELET, M.; VARGAFTIG, B.B.Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl-)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl)tyramine, a constituent of Aniba riparia (Nees) Mez. (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea-pig alveolar leucocytes. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.46, n.2, p.103-107,1994.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**, v.359, n.9324, p.2188–2194, 2002.

TSAI, Y. H.; CHANG, J. T.; CHANG, J. S.; HUANG, C. T.; HUANG, Y. B., WU, P. C. The effect of component of microemulsions on transdermal delivery of buspirone hydrochloride. **J. Pharm. Scie.** v. 100, n. 6, p. 2358-2365, 2011.

VASCONCELOS, A.S.; OLIVEIRA, I.C.; VIDAL, L.T.; RODRIGUES, G.C.; GUTIERREZ, S.J.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, S.M.; DE FRANÇA FONTELES, M.M.; GASPAR, D.M.; DE SOUSA, F.C. Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. **Fundam. Clin. Pharmacol.** v.29, n.4, p.394-403, 2015.

WELLSPRINGS. **Transdermal Creams - How they work and why.** Disponível em: <http://www.wellsprings-health.com/pages/transdermal-creams-how-they-work-and-why>. Acesso em: 18 dez. 2018.

WESTESEN, K.; BUNJES, S.; HAMMER, G.; SIEKMANN, B. Novel colloidal drug delivery systems. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 55, n. 4, p. 240-247, 2001.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. In: WHO Technical Report Series, Organization, W.H., p. 201. Editora World Health Organization. 2010.

WHO. **Epidemiological situation.** Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> . Consulta em 19 Nov 2018.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly epidemiological record**. v. 91, n. 22, p. 285 - 296, 2016.

YACUBIAN, E. M. T. Tratamento da epilepsia na infância. **J. Pediatr.** v. 78, n. 1, p. 19-27, 2002.

ZADEH MEHRIZI, T.; SHAFIEE ARDESTANI, M.; HAJI MOLLA HOSEINI, M.; KHAMESIPOUR, A.; MOSAFFA, N.; RAMEZANI, A. Novel Nanosized Chitosan-

Betulinic Acid Against Resistant *Leishmania Major* and First Clinical Observation of such parasite in Kidney. **Sci Rep**. v.8, n.1, p.11759, 2018.

4. CAPÍTULO I

PROSPECÇÃO DE ALVOS BIOQUÍMICOS PARA DOCAGEM MOLECULAR NA QUIMIOTERAPIA ANTILEISHMANIA

(Artigo publicado no periódico **Revista Virtual de Química** - Qualis B4, Fator de Impacto SJR 2017 = 0,13)

Prospecção de alvos bioquímicos para docagem molecular na quimioterapia antileishmania

Kayo Alves Figueiredo[a]; Jéssica Freire da Silva Figueiredo[b]; Rayla Kelly Magalhães Costa[c]; Michel Muálem de Moraes Alves[d], Janildo Lopes Magalhães[e], André Luis Menezes Carvalho[f], Francisco das Chagas Alves Lima[c]

[a]Departamento de Saúde, Campus Teresina Central, Instituto Federal do Piauí - IFPI – Teresina/PI – Brasil
[b]Coordenação do Curso de Farmácia, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil
[c]Laboratório de Quântica Computacional & Planejamento de Fármaco, Universidade Estadual do Piauí - UESPI - Teresina/PI – Brasil
[d]Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil
[e]Departamento de Química, Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil
[f]Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil

RESUMO

O objetivo deste trabalho é realizar uma prospecção de estudos de docagem molecular em alvos bioquímicos de *Leishmania* sp. A prospecção de estudos de docagem molecular foi realizada em maio/2017 e com base na busca de artigos na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). No período de 2006-2017 foram selecionados 84 artigos de vários países, incluindo Índia, Brasil e México. Segundo a classificação do Protein Data Bank (PDB), foram encontrados alvos moleculares de oxidorredutases, hidrolases, transferases, isomerases, DNA, proteases, etc. As principais espécies de *Leishmania* sp. foram: *L. major, L. donovani, L. infantum, L. amazonensis*, entre outras. Os 3 alvos moleculares principais encontrados foram tripanotiona redutase, pteridina redutase e topoisomerase I, além de alvos diversos envolvidos no sistema imune, metabolismo dos carboidratos, ATP, bases nitrogenadas, aminoácidos, entre outros. Neste estudo, foi possível encontrar as 3 enzimas mais estudadas (tripanotiona redutase - 2JK6; pteridina redutase 1 - 1E7W; topoisomerase I - 2B9S) e que desempenham importantes funções biológicas nos parasitas e são promissores alvos moleculares para o desenvolvimento tecnológico de novos fármacos antileishmania.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses parasitárias e afetam mais de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo. É considerada pela OMS como uma das principais doenças negligenciadas no mundo, afetando principalmente a população pobre de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (OMS, 20170. No Brasil, alguns dados mostram uma incidência para leishmaniose visceral semelhante a de alguns países subdesenvolvidos, com até 1,58 para cada 100.000 hab/ano (DATASUS, 2016).

A infecção por parasitas do gênero *Leishmania* causa um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo as formas subclínica (inaparente), localizada (lesões na pele) e infecções

disseminadas (cutânea, mucosa, ou visceral) (ASHFORD, 2000). Apresentam em seu ciclo de vida apenas duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e extracelular, e a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos (FIOCRUZ, 2018).

O estibogluconato de sódio (Pentostan®), o antimoniato de meglumine (Glucantime®) e anfotericina B lipossomal (Ambisome®) são a principal linha quimioterapêutica para o tratamento das leishmanioses. O alto custo, as limitações e o fato do parasita já apresentar resistência (LAHIRY et al., 2018), tem limitado o uso dos tratamentos convencionais e isso vem sendo um estímulo na busca de alternativas terapêuticas para as leishmanioses (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008; BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017).

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, sendo ligado as inovações científicas e tecnológicas (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008). A triagem virtual e, em particular, a triagem virtual baseada em receptores surgiu como um método confiável e acessível para identificar novos compostos, além da triagem *in silico* de bases de dados químicas (RODRIGUES et al., 2012; AMMAR, 2017). A pesquisa de novos compostos contra *Leishmania* spp. permite identificar inibidores específicos de moléculas alvo do parasita (REBOLLO; OLIVERO-VERBEL; REYES, 2013).

O planejamento de fármacos antiparasitários se baseia, especialmente, na investigação de vias bioquímicas do parasita e, quando apropriado, na comparação dessas com a do hospedeiro. Isso objetiva identificar possíveis alvos para modulação seletiva por pequenas moléculas. Dessa forma, é de grande importância conhecer a estrutura molecular de diversas proteínas em vitais vias metabólicas do parasita (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

A disponibilidade de dados genômicos de *Leishmania* sp. vem permitindo a avaliação de vários alvos farmacológicos uma vez que as sequências genômicas completas permitem a identificação de genes de proteção ao parasita. A triagem virtual in silico e procedimentos de ancoragem usando modelos de homologia são abordagens preditivas para projetar novos medicamentos contra alvos específicos do parasita (REGUERA et al., 2014). No entanto, tais modelos construídos a partir de dado genômicos de outras espécies podem apresentar baixa identidade entre as sequencias de aminoácidos em relação a macromolécula construída (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

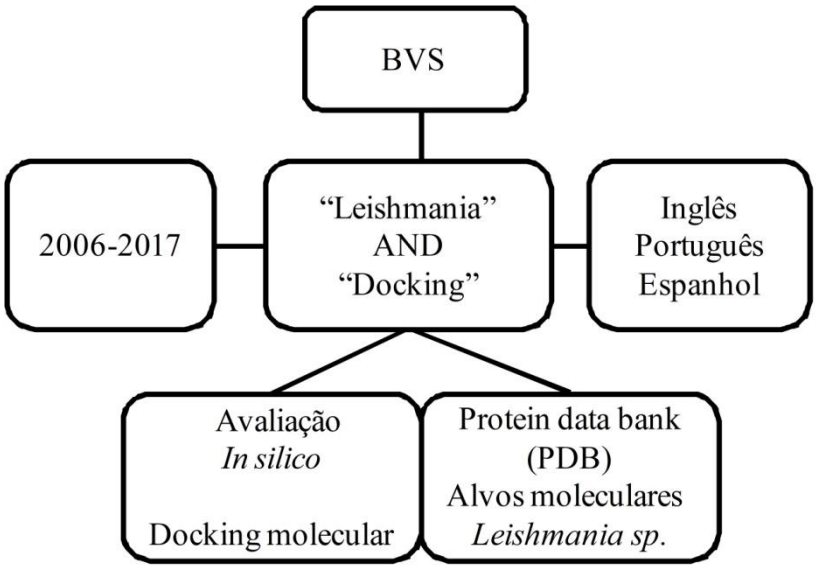
A pesquisa de novos fármacos antileishmania envolve a busca dos alvos bioquímicos relacionados aos mecanismos de defesa, metabolismo de RNA, DNA, glicose, esteróis, ácidos graxos, vias das purinas, nucleotídeos ou qualquer rota bioquímica do parasita que possa ser atacada pela molécula e que seja seguro para o hospedeiro (SCOTTI et al., 2015). Dessa forma, o objetivo deste trabalho é apresentar uma prospecção de estudos de docagem molecular de alvos bioquímicos

através de uma busca de literatura científica de macromoléculas de *Leishmania sp* e, assim, servir de subsídio teórico para estudos *in silico* na triagem de novos fármacos para a terapia antileishmania.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A prospecção científica foi realizada em Maio/2017 e com base na busca de artigos na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) utilizando a associação dos descritores "Leishmania" e "Docking/Docagem" (português, inglês e espanhol e descritos no DECS), conforme esquema apresentado pela Figura 1. Foi realizada a leitura exploratória dos resumos e como critérios de inclusão foram utilizados: artigos publicados entre 2006-2017 e relacionados a estudos de docagem molecular em alvos moleculares de espécies de *Leishmania sp*. Foram incluídas no trabalho estruturas PDB obtidas tanto por técnicas de purificação a partir do parasita assim como aquelas obtidas por modelagem por homologia utilizando estruturas de outras espécies (citando o código PDB). Foram excluídos artigos que não apresentaram o código PDB da molécula, a espécie do parasita, ausência de ligantes na docagem molecular, artigos fora do tema e de revisão. Realizou-se ainda a busca de estruturas protéicas de *Leismania* sp. publicadas no *Protein Data Bank.*

Figura 1. Metodologia para realização da prospecção científica.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a busca na BVS (descritores em inglês), foram encontrados 152 artigos e, de acordo com os critérios de inclusão, foi possível selecionar 84 trabalhos científicos que abordavam o tema proposto. Com os descritores em português e espanhol nenhum artigo foi encontrado.

Nas Figura 2 e 3, pode-se observar a evolução ano a ano de tais estudos. Publicações referentes a tal tema vem se tornando mais frequentes e novas estruturas PDB de diversas espécies de *Leishmania* vem sendo publicadas.

A conclusão do projeto genoma humano resultou em um número crescente de novos alvos terapêuticos para a descoberta de fármacos. Ao mesmo tempo, o surgimento de novas técnicas de purificação de proteínas, além das técnicas de cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear (RMN) contribuíram para muitos detalhes estruturais desses alvos moleculares. Tais avanços vêm permitindo que novas ferramentas computacionais sejam incorporadas ao estudo de novos candidatos a fármacos. Comparado aos testes experimentais tradicionais, os estudos *in silico* como a docagem molecular são uma abordagem do desenvolvimento de fármacos mais direta e racional e tem a vantagem de ser bastante eficaz e de baixo custo (MENG et al., 2011).

Métodos de triagem virtual de fármacos baseados em docagem molecular vem se destancando como uma poderosa ferramenta na descoberta de novas moléculas bioativas. Estes são capazes de calcular o modo de ligação e a afinidade de um dado ligante ao sítio ativo do receptor (MORRIS et al., 2009). Geralmente são utilizados banco de dados de alvos moleculares (como o PDB, entre outros) e é realizada a análise dos cálculos de energia de ligação ligante-receptor, indicando, assim, uma possibilidade de potencial ação farmacológica. Dessa forma, métodos *in silico* de docagem molecular podem reduzir gastos com purificação de proteínas, além de ter grande importância na elucidação na estrutura trimensional de biomoléculas (KORENDOVYCH, 2018), previsão de efeitos adversos/tóxicos e no reposicionamento da utilização de fármacos já existentes no mercado (XU; HUANG; ZOU, 2018).

Figura 2. Classificação dos artigos encontrados de acordo com o ano de publicação.

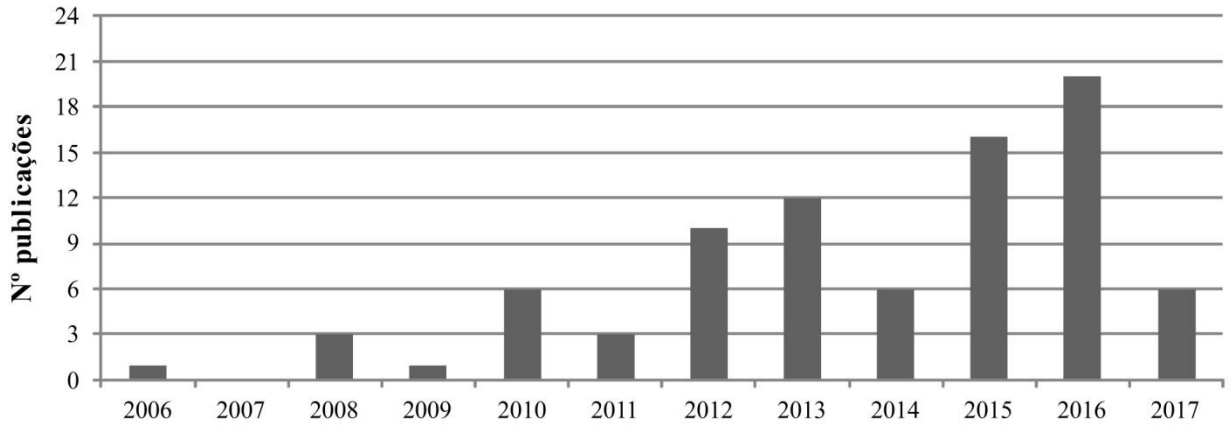
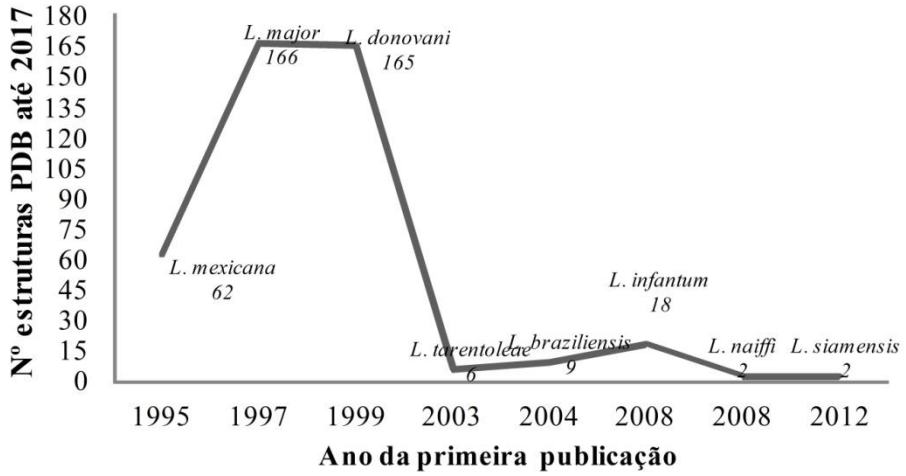


Figura 3. Evolução do número de estruturas encontradas e ano da primeira publicação conforme Protein Data Bank por espécie de Leishmania.



Pode-se observar na Tabela 1 que o periódico da Université Paris Descartes *European Journal of Medicinal Chemistry* foi responsável por 17,9% dos trabalhos encontrados. Tal revista científica publica artigos relacionados a síntese orgânica, caracterização e avaliação farmacológica de compostos, desenho de fármacos, QSAR, modelagem molecular, interações fármaco-receptor, aspectos moleculares do metabolismo de fármacos, o direcionamento de fármacos e a síntese de pró-fármacos. As outras revistas científicas apresentaram frequência entre 2,4 a 6,0% dos trabalhos.

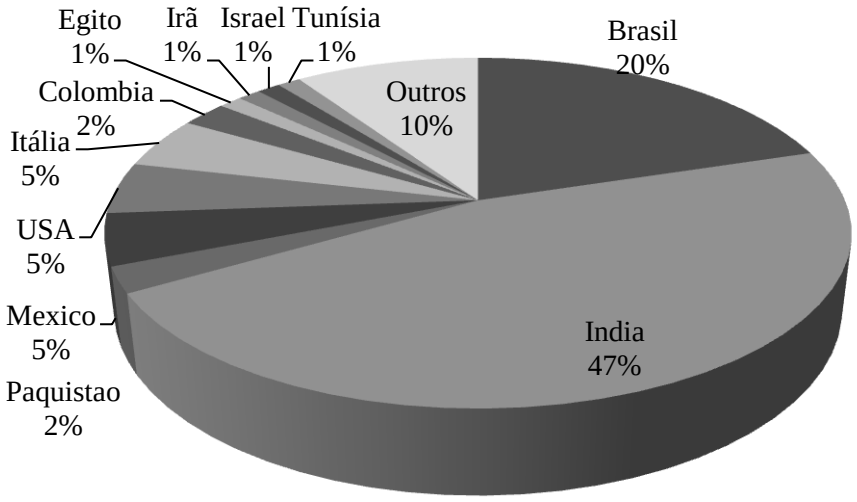
Tabela 1. Frequência das principais revistas científicas de acordo com a busca realizada.

Periódico	**JCR 2016**	**Nº**	**%**
European Journal of Medicinal Chemistry	4.519	15	17,9
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	2.454	5	6,0
Journal of Biomolecular Structure and Dynamics	3.123	4	4,8
ChemMedChem	3.225	3	3,6
Experimental Parasitology	1.724	3	3,6
ACS Medicinal Chemistry Letters	3.746	2	2,4
Antimicrobial Agents and Chemotherapy	4.302	2	2,4
Journal of Chemical Information and Modeling	3.760	2	2,4
Journal of Antimicrobial Chemotherapy	5.071	2	2,4
Molecular BioSystems	2.781	2	2,4
Molecules	2.861	2	2,4
Plos One	2.806	2	2,4
Scientific Reports	4.259	2	2,4
Archiv der Pharmazie	1.994	1	1,2
Outras		37	44,0
Total		84	100

Na Figura 4, Brasil e Índia representam 67% dos países de origem dos estudos analisados. Dados da OMS mostram que, em 2014, mais de 90% dos novos casos de leishmaniose ocorreram

em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Para o Brasil, segundo dados de 2014, a taxa de incidência de novos casos (a cada 10.000 hab/ano) é de 0,54 e 1,67 para a leishmaniose visceral (LV) e cutânea (LC), respectivamente. Na Índia, a incidência de LV é de 0,71 e fortemente mais elevada em países como o Sudão (11,05 e 7,18, respectivamente) (OMS, 2017).

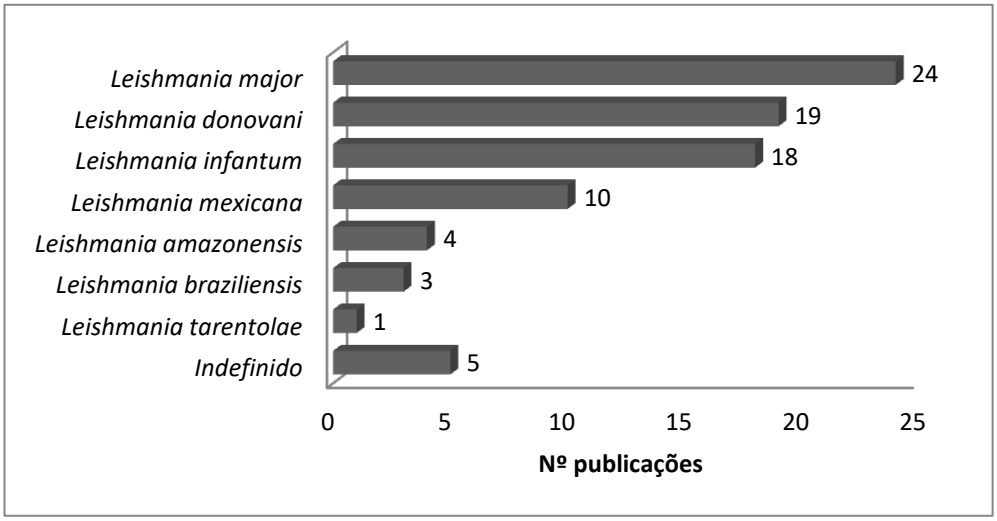
Figura 4. Distribuição dos artigos encontrados de acordo com o país de origem do autor principal.



Há muitas espécies de *Leishmania* que podem infectar humanos e são responsáveis por diferentes formas clínicas da doença: mucocutânea, cutânea, visceral e cutânea difusa (ASHFORD, 2000). *L. donovani* e *L. infantum* são os principais agentes da LV, enquanto *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis* e *L. mexicana* causam principalmente a forma cutânea (OMS, 2010).

No Brasil, a leishmaniose mucocutânea é causada por *L. braziliensis* e desenvolve úlceras na pele e mucosas enquanto a forma cutânea é causada por *L. major*. A LV pode ser causada por qualquer espécie como *L. donovani, Leishmania (L.) infantum chagasi*. Esta é a forma mais grave da doença, que pode ser fatal se não tratada. A cutânea difusa é causada por *L. amazonensis* e gera ulcerações crônicas na pele que são difíceis de tratar (SHUKLA et al., 2010). *L. major* e *L. donovani* foram aquelas mais encontradas nos estudos de docagem molecular (Figura 5), o que corrobora os dados da Figura 4, pois a Índia apresentou quase 50% do estudos e que tais espécies são encontradas na Ásia e África (READY, 2014). Além disso, tais espécies apresentaram o maior número de estruturas PDB publicadas até 2017 (Figura 3).

Figura 5. Distribuição dos artigos encontrados de acordo a espécie de *Leishmania sp*. estudada.



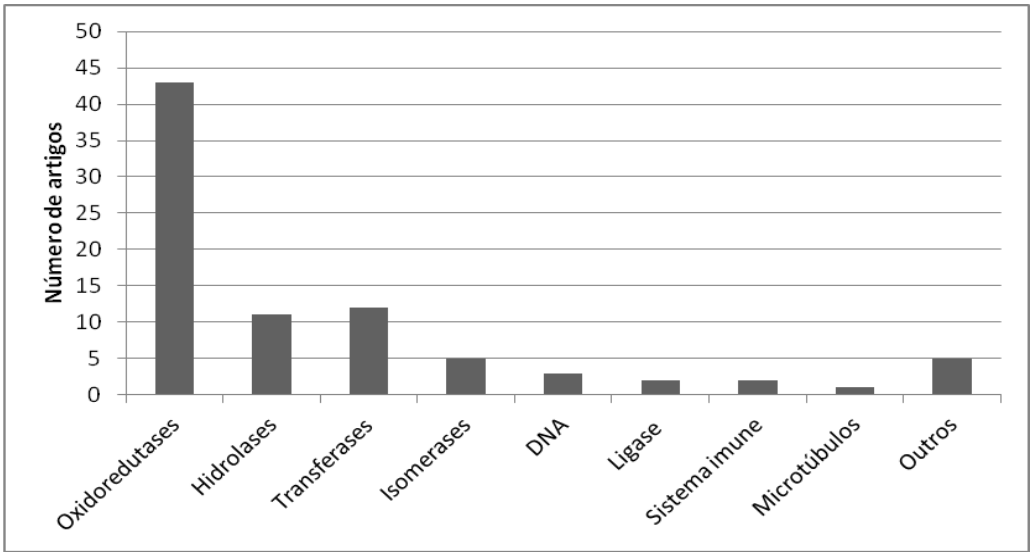
A disponibilidade de um grande número de estruturas 3D de proteínas estimulou o desenvolvimento de metodologias teóricas para a busca de alvos de moléculas bioativas em um processo chamado de docagem reversa (ROGNAN, 2010) e que permite a seleção de compostos para posteriores testes bioquímicos e/ou biológicos (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008). Dessa forma, conhecer os alvos moleculares em um dado parasita/alvo é de grande importância no desenvolvimento de novos fármacos. Neste trabalho, conforme Tabela 2, foi possível identificar várias proteínas que são potenciais alvos moleculares antileishmania.

Estudos recentes mostraram que mais de 29 enzimas de *L. major, L. donovani, L. mexicana e L. infantum* poderiam ser utilizadas como alvos terapêuticos (BERNAL; COY-BARRERA, 2014). A base de dados do Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais da OMS fornece um banco de alvos potenciais obtidos a partir de dados bioquímicos, genéticos e farmacológicos de vários patógenos bem conhecidos. No topo desta lista podem ser encontrados os alvos necessários para a sobrevivência do parasita, tais como a tripanotiona redutase, a dihidrofolato redutase, a cisteína-protease B, as DNA topoisomerases, entre outras (REGUERA et al., 2014).

De acordo com a Figura 6, pode-se notar a classificação das diversas proteínas encontradas, sendo as oxidorredutases, mais particularmente a tripanotiona redutase a principal proteína encontrada em 19 dos 84 artigos.

Leishmania e outros tripanossomatídeos apresentam um sistema bioquímico para remoção do estresse oxidativo e manter o equilíbrio redox análogo ao dos mamíferos, porém único: o sistema tripanotiona redutase. Tal enzima é a única flavoenzima NADPH dependente que combate o estresse oxidativo pela manutenção de níveis adequados de tripanotiona reduzida (VENKATESAN et al., 2011). De tal forma, este alvo molecular tem grande importância para o desenvolvimento de inibidores da sobrevivência dos parasitas (VENKATESAN; SHUKLA; DUBEY, 2010).

Figura 6. Distribuição dos artigos encontrados de acordo a classificação PDB da proteína alvo.



Outra enzima envolvida no equilíbrio redox é triparedoxina peroxidase I (Tabela 2). Ela tem papel importante na redução do peróxido de hidrogênio a água pelos grupos ditiol da tripanotiona (BRINDISI et al., 2015) e tem sido demonstrado que é vital para sobrevivência do parasita através da depleç do seu gene em amastigotas de *L. infantum* (ROMAO et al., 2009).

A γ-glutamilcisteína sintetase, outra enzima do metabolismo redox dos tripanosomatídeos e que funciona como fator de virulência frente a sua sobrevivência dentro dos macrófagos (Tabela 2), uma proteína essencial da via biossintética da tripanotiona que catalisa a ligação ATP-dependente de L-cisteína a L-glutamato, formando γ-glutamilcisteína (AGNIHOTRI et al., 2017).

A *Leishmania* requer pteridinas reduzidas (pterinas e folatos) para a biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas e, portanto, captam a biopterina ou folato das células do seu hospedeiro. Estes dois compostos sofrem duas reduções sucessivas para gerar a forma ativa de tetra-hidrofolato. A diihidrofolato-redutase-timidilato sintase bifuncional (DHFR-TS) e a pteridina redutase são as duas enzimas que realizam estas reações (NARE et al., 1997). Além disso, é a principal enzima para a redução do folato e 7,8-dihidrofolato (DHF) para 5,6,7,8-tetrahidrofolato (THF) e é vital para o crescimento *in vivo* dos parasitas (SIENKIEWICZ; ONG; FAIRLAMB, 2010). Entretanto, inibidores do DHF (metotrexato) falham ao inibir esta via por desvio no metabolismo (HARDY et al., 1997).

Tabela 2. Principais alvos para quimioterapia antileishmania avaliados nos estudos de docagem molecular.

ALVOS	Nº	PDB	ESPÉCIE	VIA METABÓLICA/FUNÇÃO
Tripanotiona redutase	19	2JK6	*L. infantum*	Metabolismo redox (sobrevivência do parasita)
Pteridina redutase	17	1E7W, 2XOX	*L. major, L. donovani*	Metabolismo de ácidos nucléicos
Topoisomerase I	5	2B9S	*L. donovani*	Relaxamento na tensão na hélice de DNA
Arginase	5	1RLA, 1T5F	Homologia	Metabolismo de aminoácidos
DNA	3	1D64	Homologia	DNA
MAPK4 (proteína quinase ativada por mitogeno)	3	1PME, 2Y9Q	Homologia	Serina/treonina quinase (sinalização intracelular)
6-Fosfogliconolactonase	2	3CH7	*L.braziliensis*	Via das pentose fosfato
Triparedoxina peroxidase I	2	3TUE	*L. major*	Metabolismo redox (sobrevivência do parasita)
Proteinase leishmanolisina (gp63)	1	1LML	*L. major*	Fator de virulência
Adenina fosforibosil transferase	1	1QB8	*L. donovani*	Metabolismo de ácidos nucléicos
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	2	1GYP, 1N1E	*L. mexicana*	Metabolismo da glicose
Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase	1	1PZM	*L. tarentolae*	Metabolismo de ácidos nucléicos
Oligopeptidase B	1	2XE4	*L. major*	Protease/fator de virulência
γ-Glutamilcisteína sintetase	1	3LVV	Homologia	Metabolismo redox (sobrevivência do parasita)
Nucleosídeo hidrolase	1	1EZR	*L. major*	Metabolismo de ácidos nucléicos
Alvos diversos	21	-	-	-
Total	84			

As proteases de parasitas são fatores de virulência para o hospedeiro e são alvos promissores, uma vez que são expressas em todo o ciclo de vida do parasita e não foram identificadas em seres humanos. A oligopeptidase B é uma proteína citoplasmática e há evidências de que está presente nas vesículas (endossomas) (MATOS GUEDES et al., 2008). A leishmaniosina (gp63), fator de virulência para a infecção em *L. major, L. mexicana* e *L. donovani*, é responsável pela inibição da lise pelas proteínas do complemento e sua liberação extracelular pode facilitar a migração e difusão da forma evolutiva promastigota através dos tecidos. Gp63 também cliva MHC e fatores de ativação de macrófagos (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004).

A sobrevivência e o crescimento das leishmanias dependem de bases de poliamina, principalmente a espermidina, as quais são sintetizadas em um processo metabólico que envolve a enzima arginase (TAHA et al., 2016). Interferir neste processo pode ser uma potencial solução para finalizar o ciclo de vida destes parasitas. Conforme Tabela 2, cinco estudos avaliaram o potencial

inibitório *in silico* de algumas moléculas sobre arginases (SILVA; MÉNDEZ-CUESTA; MÉNDEZ-LUCIO; CASTILLO, 2012; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012; REIS et al., 2013; MANJOLIN et al., 2013; MAQUIAVELI et al., 2016). Em tais trabalhos, a estrutura 3D foi construída através de homologia com a enzima de *Rattus norvegicus*. No entanto, como relatado anteriormente, modelos de homologia podem apresentar baixa identidade com o receptor de interesse, podendo não refletir nas reais interações moleculares fármaco-receptor.

A via de salvamento de purinas é importante para a sobrevivência do parasita e que têm uma variedade de funções que incluem processos celulares e metabólicos vitais, como produção de energia, sinalização celular, síntese de cofatores e ácidos nucleicos. Ao contrário das células hospedeiras, em *Leishmania sp.* não há uma alternativa para a síntese de purinas (ANSARI et al., 2016), o que a torna um alvo molecular atraente para a descoberta de fármacos antiparasitários.

A enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase desempenha um papel central no processo de aquisição de purinas e que é responsável por reciclar a purina dentro de células parasitárias (ANSARI et al., 2012). Esta via de recuperação recupera purinas (adenina e guanina) dos produtos de degradação do metabolismo de nucleotídeos e de hipoxantina e xantina. Em *Leishmania*, três fosforribosiltransferases estão envolvidas na reciclagem de purinas: hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase, adenina fosforribosiltransferases e xantina fosforribosiltransferases todas as quais são alvos potenciais para drogas (ANSARI et al., 2016). As características das duas primeiras enzimas podem ser encontradas na Tabela 2.

Ainda na via do metabolismo de ácidos nucléicos, outra importante enzima foi encontrada nos estudos de docagem molecular: a nucleosídeo hidrolase. Ela é capaz de catalisar a hidrólise de N-ribosila de todas as purinas e pirimidinas. Os parasitas usam a via de salvamento de purinas em vez de obter nucleósidos de seu hospedeiro. As nucleosídeo hidrolases foram encontradas em procariotas e eucariotas, mas não em mamíferos (RENNÓ et al., 2012), tornando-as alvos interessantes para o desenvolvimento de drogas mais seletivas. Tal enzima é um marcador filogenético importante em *Leishmania*, pois é o antígeno principal da primeira vacina licenciada contra a LV canina (NICO et al., 2010).

Pesquisas recentes têm sido focadas nas topoisomerases de DNA, enzimas que modulam a replicação, transcrição e recombinação do DNA (MAMIDALA et al., 2016) e a topoisomerase I foi o terceiro alvo mais encontrado nos estudos (Tabela 2). O DNA do cinetoplasto do parasita possui vários locais de ligação apropriados para fármacos antileishmania e a replicação do DNA cinetoplástico circular interligado parece ser particularmente sensível a tais inibidores. Não existem estruturas de DNA conhecidas nos seres humanos que sejam equivalentes aquelas pertencentes ao cinetoplasto, sendo assim, uma via seletiva para a terapia antileishmania (CHAI et al., 2014).

Fazendo parte da família das proteínas de sinalização intracelular das serina/treonina quinases, as MAPKs (proteína quinase ativada por mitogeno) foram encontradas em três estudos com docagem realizada por meio de modelagem por homologia (Tabela 2). As MAPK possuem função de transdução de sinal que regulam as funções celulares essenciais para a sobrevivência, a morfogênese de tecidos, rearranjos do citoesqueleto, proliferação, diferenciação e respostas imunológicas e resposta ao stress (GUPTA et al., 2016). Em protozoários, as MAPK4 auxiliam na fuga do sistema imunológico do hospedeiro e desempenha um papel significativo na diferenciação morfológica de promastigotas em formas amastigotas do parasita. As MPK4 de *L. mexicana* apresentam consideráveis diferenças em relação as sequências de aminoácidos com as MAPKs de mamífero, tornando-se, assim, um potencial alvo para agentes antileishmania (GUPTA et al., 2013).

Por último, abordamos aqui as proteínas da via glicolítica, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, e da via das pentose fosfato, a 6-fosfogliconolactonase. O metabolismo energético dos tripanossomatídeos depende unicamente das fontes de carbono disponíveis no hospedeiro. Como os parasitas carecem de um ciclo funcional de Krebs, eles usam a glicólise como a única fonte de geração de ATP (OPPERDOES, 1987). Sete das enzimas glicolíticas são compartimentalizadas em organelas de tipo peroxissomo, os glicosomas, que é uma característica única dos tripanosomatídeos. Isto indica que é possível bloquear a produção de energia por síntese de inibidores específicos das enzimas da via glicolítica, uma vez que a glicólise é a única fonte de energia para esses parasitas (CHAWLA; MADHUBALA, 2010).

Além das enzimas da via glicolítica, alvos promissores para inibição também incluem as enzimas da via pentose fosfato, que convertem glicose-6-fosfato em ribose-5-fosfato. Tal etapa metabólica tem papel crucial na proteção desses parasitas contra o stress oxidativo, assim como na produção de precursores dos nucleotídeos (MATTA et al., 2015).

SCOTTI et al. (2015) descreveu vários alvos moleculares de diversas vias metabólicas que foram excluídos deste trabalho: via das pentose fosfato (ribose-5-fosfate isomerase); metabolismo do lipídeos (esterol 24-C metiltransferase); via glicolítica (fosfoglicomutase); reguladores da expressão gênica (histona desacetilase); metabolismo do folato e ácidos nucléicos (serina hidroximetiltransferase); síntese de glicoproteínas de superfície (manosiltransferase); via da respiração anaeróbia (fumarate redutase), síntese de poliaminas (spermidina sintase, S-adenosilmetionina descarboxilase); enzimas proteolíticas (dipeptidil carboxipeptidase).

Recentes publicações vem apresentando a estrutura 3D de várias proteínas essenciais ao parasita: fumarato hidratase de *L. major*, que participa do ciclo de Krebs e que possui mecanismo distinto da enzima de seres humanos (FELICIANO; DRENNAN; NONATO, 2016); o transportador de Fe MIT1, que regula a função mitocondrial (MITTRA et al., 2016); a proteína NLRP3 envolvida

no processo inflamatório e na produção de IL-1β durante a infecção da celulas por leishmania (NOVAIS et al., 2017). Dessa forma, novos alvos farmacológicos vêm sendo estudados e sua estrutura 3D desvendada, tornando possível ampliar os estudos de triagem por meio dos estudos de docagem molecular para novas moléculas para a terapia antileismania.

A ligação do inibidor e consequente bloqueio do alvo farmacológico é uma condição necessária, mas não suficiente para o sucesso terapêutico. O parasita na sua forma amastigota intracelular é localizado dentro do vacúolo parasitóforo do macrófago, onde o composto deve entrar e permanecer ativo. A molécula deverá ser permeável o suficiente para passar através de várias membranas, bem como permanecer estável em um ambiente ácido e não deve ser substrato de enzimas metabolizadoras xenobióticas. Além disso, muitos compostos concebidos contra alvos específicos do parasita apresentam geralmente baixa seletividade (REGUERA et al., 2014).

Na Tabela 3, podem encontrar detalhes de alguns trabalhos encontrados sobre alvos para quimioterapia antileishmania e seus respectivos inibidores de acordo com os estudos de docagem molecular analisados. Alguns estudos avaliaram alvos moleculares clássicos por docagem molecular - tripanotiona redutase (VENKATESAN; SHUKLA; DUBEY, 2010), nucleosídeo hidrolase (RENNÓ et al., 2012), entre outros - e com base em investigações preliminares. Já em outros, vários alvos foram avaliados numa tentativa de encontrar aqueles com maior possibilidade de interação com candidatos a fármaco (VENKATESAN et al., 2011; BERNAL; COY-BARRERA, 2014; AMMAR, 2017). Em alguns deles, foram realizados ainda estudos pré-clinicos com roedores, bem como testes enzimáticos (AGNIHOTRI et al., 2017).

De forma complementar aos estudos de docagem molecular, é de grande importância a avaliação da dinâmica molecular, técnica computacional que avalia a evolução temporal das posições e velocidades dos átomos do complexo proteína-ligante e que vem sendo utilizada por alguns autores (GROVER et al., 2012; SHINDLE et al., 2014; AGNIHOTRI et al., 2017). Os estudos de docagem molecular, associados aos estudos *in vitro* e *in vivo*, vem demonstrando ser uma etapa essencial no planejamento de novos fármacos. Novos alvos moleculares essenciais ao metabolismo e sobrevivência do parasita vem sendo descobertos. Além disso, o aprimoramento das técnicas cristalográficas e espectroscópicas vem evoluindo na descoberta de novas estruturas tridimensionais e com melhor resolução.

Tabela 3. Alguns alvos para quimioterapia antileishmania e seus respectivos inibidores de acordo com os estudos de docagem molecular.

ALVO/PDB	INIBIDOR	PAIS	INFERENCIAS	REFERENCIA
Oligopeptidase B (2XE4)	Antipain e outros	Brasil	Modelos 3D de oligopeptidades em *L. amazonensis* foram obtidos usando modelagem comparativa da enzima de *L. major*. Os modelos foram utilizados para a triagem virtual. Os compostos selecionados neste estudo mostraram importantes interações as enzimas com resíduos importantes, como Tyr490, Glu612 e Arg655, indicando que poderiam atuar como inibidores dessas proteínas. Avaliações farmacocinéticas e de toxicidade também mostraram bons resultados.	SODERO et al., 2017
Pteridina redutase (1E7W)	Híbridos oxadiazol-benzohidrazonas	Malaysia	O índice de seletividade mostrou que os compostos com maior número de grupos hidroxilas têm esse índice baixo. Os compostos di-hidroxi apresentaram um bom índice de atividade e seletividade. Entre os compostos halogenados, os compostos com substituição de flúor exibiram boa atividade e índice de seletividade com a ordem de 2-F> 3-F> 4-F.	TAHA et al., 2016
Tripanotiona redutase (2JK6)	Híbridos aminoácido-triazol	India	18 compostos 1,2,3-triazol híbridos com L-aminoácido (Phe / Pro / Trp) foram sintetizados e avaliados quanto a sua atividade antileishmaniana contra a forma promastigotas de *L. donovani*. Alguns compostos não apresentaram citotoxicidade em relação às células de macrófagos. Em estudos de docagem molecular, os inibidores líderes mostraram interações com resíduos chave no sítio catalítico de tripanotiona redutase.	MASSOD et l., 2017
Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (1PZM)	2′-deoxiguanosina 5′-difosphato	India	O complexo enzima-inibidor mostrou-se estável após 24 ns em simulação de dinâmica molecular com interação aminoácidos Glu125, Ile127, Lys87 e Val186. Conclui-se que a pontuação de docagem molecular foi inversamente proporcional a sua atividade biológica.	ANSARI et al., 2016
Proteinase leishmanolisina (1LML)	Peptídeos	Tunísia	A docagem molecular mostrou que um dos peptideos tem energia de interação mínima e a complementaridade máxima da forma com o sítio ativo da proteína. Inibe ainda a cinética de crescimento das leishmanas *in vitro* e reduz as lesões cutâneas em camundongos BALB/c.	RHAIEM; HOUIMEL, 2016
Topoisomerase 1 (2B9S)	Derivados furopiridinodionas	India	A avaliação i*n vitro* dos compostos contra a enzima humana e do parasita (LdTop1) revelou inibição seletiva para LdTop1 em que seis compostos exibiram atividade com EC50 na gama de 1-30 μM. Também exibiu atividade contra promastigotas de *Leishmania donovani*. A investigação da modelagem molecular com LdTop1 revelou supostos sítios de ligação na enzima que poderiam ser aproveitados para o desenvolvimento de moléculas com melhor potência.	MAMIDALA et al., 2016
6-Fosfoglicono lactonase (3CH7)	Dialquilfosforil hidrazonas	Brasil	Os compostos mais ativos contra *L. braziliensis* apresentaram valores de CI50 na gama 10^{-2} mM, semelhante a pentamidina. Dois compostos mostraram uma diminuição dose-dependente no índice de infecção de macrófagos infectados. Usando docagem molecular com 15 enzimas de *L. braziliensis* indicou que o alvo provável dos compostos ativos é hexocinase, a primeira enzima da via glicolítica.	MATTA et al., 2015
DNA (2B3E)	Arilimidamidas	USA	Os compostos formam complexos 1:1 com sequências AT no sulco menor de DNA e a força de ligação varia com o tamanho do substituinte, carga e polaridade. Os resultados estruturais e estudos de modelagem molecular fornecem uma explicação para as diferenças nas afinidades de ligação para as arilimidamidas.	CHAI et al., 2014
Nucleosídeo hidrolase (1EZR)	Análogos de nucleosídeos	Brasil	Os compostos apresentaram alta afinidade para a enzima. A docagem molecular mostrou a forma de ligação dos compostos no interior do local ativo da nucleosídeo hidrolase revelando os resíduos essenciais para uma inibição eficaz.	RENNÓ et al., 2012
Tripanotiona redutase (2JK6)	Derivados triciclicos, fenotiazinas e quinonas	India	Foi observado um padrão de pontes de H em todos estes compostos com os resíduos Thr335, Lys60, His461. Com o fato de estes resíduos ajudarem na orientação do FAD para o local ativo formando o núcleo do domínio de ligação ao FAD, o design de compostos seletivos e potentes que poderiam substituir o FAD *in vivo* durante a síntese de Tripanotiona redutase pode ser implementado como uma estratégia eficaz em conceber novos fármacos para a Leishmaniose.	VENKATESAN; SHUKLA; DUBEY, 2010

4. CONCLUSÃO

De acordo com este estudo, foram selecionados 84 importantes artigos científicos. Foi possível encontrar várias proteínas que desempenham importantes funções biológicas nos parasitas e são promissores alvos moleculares para o desenvolvimento tecnológico de novos fármacos antileishmania, sendo as principais: tripanotiona redutase (2JK6), pteridina redutase 1 (1E7W) e topoisomerase I (2B9S). O presente estudo é um excelente ponto de partida para futuros estudos de docagem molecular com compostos *leads* que podem apresentar potencial atividade antileishmania.

REFERÊNCIAS

AGNIHOTRI, P.; MISHRA, A. K.; MISHRA, S.; SIROHI V. K.; SAHASRABUDDHE, A. A.; PRATAP, J. V. Identification of novel inhibitors of Leishmania donovani γ - glutamylcysteine synthetase using structure based virtual screening, docking, molecular dynamics simulation and *in vitro* studies. **J. Chem. Inf. Model**. v. 57, n.4, p. 815-825, 2017.

AMMAR, Q. *In silico* pharmacodynamics, toxicity profile and biological activities of the Saharan medicinal plant *Limoniastrum feei*. **Braz. J. Pharm. Sci.** v.53, p.61, 2017.

ANSARI, M. Y.; DIKHIT, M. R.; MANSURI, R.; RANA, S.; ALI, V.; SAHOO, G. C.; DAS, P. Establishment of correlation between in-silico and in-vitro test analysis against Leishmania HGPRT to inhibitors. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 83, p. 78-96, 2016.

ANSARI, M. Y.; DIKHIT, M. R.; SAHOO, G. C.; DAS, P. Comparative modeling of HGPRT enzyme of *Leishmania donovani* and binding affinities of different analogs of GMP. **Int. J. Biol. Macromol.** v.50, p.637, 2012.

ASHFORD, R.W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.** v.30, p.1269-1281, 2000.

BERNAL, F.A., COY-BARRERA, E. *In silico* analyses of sesquiterpene-related compounds on selected leishmania enzyme-based targets. **Molecules**. v. 19, p. 5550-5569, 2014.

BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. **Rev. Virt. Quím.** v.9, p.861, 2017.

BRINDISI, M.; BROGI, S.; RELITTI, N.; VALLONE, A.; BUTINI, S.; GEMMA, S.; NOVELLINO, E.; COLOTTI, G.; ANGIULLI, G.; DI CHIARO, F.; FIORILLO, A.; ILARI, A.; CAMPIANI, G. Structure-based discovery of the first non-covalent inhibitors of *Leishmania major* tryparedoxin peroxidase by high throughput docking. **Sci Rep.** v. 5, p. 9705, 2015.

CHAI, Y.; MUNDE, M.; KUMAR, A.; MICKELSON, L.; LIN, S.; CAMPBELL, N. H.; BANERJEE, M.; AKAY, S.; LIU, Z.; FARAHAT, A. A.; NHILI, R.; DEPAUW, S.; DAVID-CORDONNIER, M. H.; NEIDLE, S.; WILSON, W. D.; BOYKIN, D. W. Structure

Dependent Binding of Arylimidamides to the DNA Minor Groove. **Chembiochem.** v. 15, n. 1, p. 68–79, 2014.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in Leishmania. **J. Parasit. Dis**. v. 34, n.1, p. 1–13, 2010.

DATASUS. Leishmaniose visceral. Sistema Nacional de Agravos de Notificação – Sinan. Brasília, Ministério da Saúde, **2016**.

FELICIANO, P.R.; DRENNAN, C.L.; NONATO, M.C. Crystal structure of an Fe-S cluster containing fumarate hydratase enzyme from *Leishmania major* reveals a unique protein fold. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.** v. 113, n. 35, p.9804-9809, 2016.

FIOCRUZ. Fundação Osvaldo Cruz. **As leishmanioses**. Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia. Rio de Janeiro, 2018.

GROVER, A.; KATIYAR, S.P.; SINGH, S.K.; DUBEY, V.K.; SUNDAR, D. A leishmaniasis study: structure-based screening and molecular dynamics mechanistic analysis for discovering potent inhibitors of spermidine synthase. **Biochem. Biophys. Acta.** v.1824, p.1476, 2012.

GUIDO, R. V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Curr. Med. Chem**. v.15, n.1, p.37-46, 2008.

GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados**. v. 24, n.70, p. 81-98, 2010.

GUPTA, C. L.; AKHTAR, S.; KUMAR, N.; ALI, J.; PATHAK, N.; BAJPAI, P. *In Silico* Elucidation and Inhibition Studies of Selected Phytoligands Against Mitogen-Activated Protein Kinases of Protozoan Parasites. **Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci**. v.8, p. 41–52, 2016.

GUPTA, C. L.; KHAN, M. K.; KHAN, M. F.; TIWARI, A. K. Homology modeling of LmxMPK4 of Leishmania mexicana and virtual screening of potent inhibitors against It. **Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci**. v. 5, p.136–144, 2013.

HARDY, L. W.; MATTHEWS, W.; NARE, B.; BEVERLEY, S. M. Bio-chemical and genetic tests for inhibitors of Leishmania pteridine pathways. **Exp. Parasitol.** v. 87, p. 157-169, 1997.

KORENDOVYCH, I.V. Rational and Semirational Protein Design. **Methods. Mol. Biol.** v.1685, p.15, 2018.

LAHIRY, S.; DAS, A. K..; DAS, S. N.; MANNA, N. Ethanolic leaf extract of Coccinia grandis is effective against both drug resistant and drug sensitive clinical isolates of Indian Kala-azar. **J. Paras. Dis.** v. 42, p.433, 2018.

MAMIDALA, R.; MAJUMDAR, P.; JHA, K. K.; BATHULA, C.; AGARWAL, R.; CHARY, M. T.; MAJUMDER, H. K.; MUNSHI, P.; SEN, S. Corrigendum: Identification of Leishmania donovani Topoisomerase 1 inhibitors via intuitive scaffold hopping and bioisosteric modification of known Top 1 inhibitors. **Sci Rep**. v. 6, p. 28120, 2016.

MANJOLIN, L. C.; DOS REIS, M. B.; MAQUIAVELI, C. C.; SANTOS-FILHO, O. A.; SILVA, E. R. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania* (Leishmania) *amazonensis* infection. **Food Chem.** v.1, p.2253, 2013.

MAQUIAVELI, C. C.; LUCON-JÚNIOR, J.F.; BROGI, S.; CAMPIANI, G.; GEMMA, S.; VIEIRA, P. C., SILVA, E. R. Verbascoside Inhibits Promastigote Growth and Arginase Activity of Leishmania amazonensis. **J. Nat. Prod.** v.79, p.1459, 2016.

MASOOD, M. M.; HASAN, P.; TABREZ, S.; AHMAD, M. B.; YADAVA, U.; DANILIUC, C.G.; SONAWANE, Y.A.; AZAM, A.; RUB, A.; ABID, M. Anti-leishmanial and cytotoxic activities of amino acid-triazole hybrids: Synthesis, biological evaluation, molecular docking and in silico physico-chemical properties. **Bioorg. Med. Chem. Lett**. v. 27, n. 9, p. 1886-1891, 2017.

MATOS GUEDES, H. L. M.; CARVALHO, R. S. N.; GOMES, D. C. O.; ROSSI-BERGMANN, B.; DE-SIMONE, S. G. Oligopeptidase B-2 from *Leishmania amazonensis* with an unusual C-terminal extension. **Acta Parasitol.** v. 53, p. 197–204, 2008.

MATTA, C. B.; DE QUEIROZ, A. C.; SANTOS, M. S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; GONÇALVES, V. T.; DEL CISTIA, C. N.; SANT'ANNA, C. M.; DA COSTA, J. B. Novel dialkylphosphorylhydrazones: Synthesis, leishmanicidal evaluation and theoretical investigation of the proposed mechanism of action. **Eur. J. Med. Chem.** v. 101, p. 1-12, 2015.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunol. Rev.** v. 201, p. 206-224, 2004.

MÉNDEZ-CUESTA, C. A.; MÉNDEZ-LUCIO, O.; CASTILLO, R. Homology modeling, docking and molecular dynamics of the *Leishmania mexicana* arginase: a description of the catalytic site useful for drug design. **J. Mol. Graphics Model**.v.38, p.50, 2012.

MENG, X. Y.; ZHANG, H. X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Cur. Comput.-Aided Drug Desig.** v.7, p.146, 2011.

MITTRA, B.; LARANJEIRA-SILVA, M. F.;, PERRONE BEZERRA DE MENEZES, J.; JENSEN, J.; MICHAILOWSKY, V.; ANDREWS, N. W. A Trypanosomatid Iron Transporter that Regulates Mitochondrial Function Is Required for Leishmania amazonensis Virulence. **PLoS Pathog.** v. 12, n.1, p. 1005340, 2016.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexiblity. **J. Comput. Chem.** v.16, p.2785, 2009.

NARE, B.; LUBA, J.; HARDY, L.W.; BEVERLEY, S. New ap-proaches to Leishmania chemotherapy: pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity. **Parasitol**. v. 114, S101-110, 1997.

NICO, D.; CLASER, C.; BORJA-CABRERA, G. P.; TRAVASSOS, L. R.; PALATNIK, M.; SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Adaptive Immunity

against *Leishmania* Nucleoside Hydrolase Maps Its C-Terminal Domain as the Target of the CD4+ T Cell–Driven Protective Response. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 4, n.11, p.866, 2010.

NOVAIS, F. O.; CARVALHO, A. M.; CLARK, M. L.; CARVALHO, L. P.; BEITING, D. P.; BRODSKY, I. E.; CARVALHO, E. M.; SCOTT, P. CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1β production. **PLoS Pathog.** v. 13, n.2, p.1006196, 2017.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em: 27 maio 2017.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases.** First WHO Report on Neglected Tropical Diseases, 2010.

OPPERDOES, F. R. Compartmentation of Carbohydrate Metabolism in Trypanosomes. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 41, p. 127-151, 1987.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clin Epidemiol.** v. 6, p. 147-154, 2014.

REBOLLO, J.; OLIVERO-VERBEL, J.; REYES, N. New agents with potential leishmanicidal activity identified by virtual screening of chemical databases: New agents with potential leishmanicidal activity. **Rev. Univ. Ind. Santander.** v. 45, p.33, 2013.

REGUERA, R. M.; CALVO-ÁLVAREZ, E.; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; BALAÑA-FOUCE, R. Target-based vs. phenotypic screenings in Leishmania drug discovery: A marriage of convenience or a dialogue of the deaf? **Int. J. Parasitol: Drugs and Drug Resistance.** v. 4, p. 355–357, 2014.

REIS, M. B. G.; MANJOLIN, L. C.; MAQUIAVELI, C. C.; SANTOS-FILHO, O. A.; SILVA, E. R. Inhibition of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and Rat Arginases by Green Tea EGCG, (+)-Catechin and (−)-Epicatechin: A Comparative Structural Analysis of Enzyme-Inhibitor Interactions. **PLoS One**. v.8, p.78387, 2013.

RENNÓ, M. N.; FRANÇA, T. C.; NICO, D.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; TINOCO, L. W.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Kinetics and docking studies of two potential new inhibitors of the nucleoside hydrolase from Leishmania donovani. **Eur. J. Med. Chem**. v. 56, p.301-307, 2012.

RHAIEM, R. B.; HOUIMEL, M. Targeting Leishmania major parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. **Acta Trop**. v. 159, p.11-19, 2016.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos**. Rev. Virt. Quím.** v. 4, p.739, 2012.

ROGNAN, D. Structure-based approaches to target fishing and ligand profiling. **Mol. Inf.** v. 29, p. 176-187, 2010.

ROMAO, S.; CASTRO, H.; SOUSA, C.; CARVALHO, S.; TOMÁS, A. M. The cytosolic tryparedoxin of *Leishmania infantum* is essential for parasite survival. **Int. J. Parasitol**. v. 39, p. 703–711, 2009.

SANTOS FILHO, O. A; ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. **Quím. Nova.** v.26, p.253, 2003.

SCOTTI, L.; ISHIKI, H.; MENDONÇA JÚNIOR, F. J.; DA SILVA, M. S.; SCOTTI, M. T. *In-silico* Analyses of Natural Products on *Leishmania* Enzyme Targets. **Mini Rev. Med. Chem.** v. 15, p. 3, p. 253-69, 2015.

SHINDE, S.; MOL, M.; JAMDAR, V.; SINGH, S. Molecular modeling and molecular dynamics simulations of GPI 14 in *Leishmania major*: insight into the catalytic site for active site directed drug design. **J. Theor. Biol.** v.351, p.37, 2014.

SHUKLA, A. K.; SINGH, B. K.; PATRA, S.; DUBEY, V. K. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 160, p. 2208-2218, 2010.

SIENKIEWICZ, N.; ONG, H. B.; FAIRLAMB, A. H. *Trypanosoma brucei* pteridine reductase 1 is essential for survival *in vitro* and for virulence in mice. **Mol. Microbiol**. v. 77, p. 658-671, 2010.

SILVA, E. R., MAQUIAVELI, C. C., MAGALHÃES, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania* (Leishmania) *amazonensis* arginase. **Exp. Parasitol.** v.130, p.183, 2012.

SODERO, A. C.; DOS SANTOS, A. C.; MELLO, J. F.; DE JESUS, J. B.; DE SOUZA, A. M.; RODRIGUES, M. I.; DE SIMONE, S. G.; RODRIGUES, C. R.; DE MATOS GUEDES, H. L. Oligopeptidase B and B2: comparative modelling and virtual screening as searching tools for new antileishmanial compounds. **Parasitol.** v. 144, n. 4, p. 536-545, 2017.

TAHA, M.; ISMAIL, N. H., IMRAN, S.; ANOUAR, E. H.; SELVARAJ, M.; JAMIL, W.; ALI, M.; KASHIF, S. M.; RAHIM, F.; KHAN, K. M.; ADENAN, M. I. Synthesis and molecular modelling studies of phenyl linked oxadiazolephenylhydrazone hybrids as potent antileishmanial agents. **Eur. J. Med. Chem.** v. 126, p. 1021–1033, 2016.

VENKATESAN, S. K.; SAUDAGAR, P.; SHUKLA, A. K.; DUBEY, V. K. Screening natural products database for identification of potential antileishmanial chemotherapeutic agents. **Interdiscip. Sci.** v. 3, n. 3, p. 217-231, 2011.

VENKATESAN, S. K.; SHUKLA, A. K, DUBEY, V. K. Molecular docking studies of selected tricyclic and quinone derivatives on trypanothione reductase of *Leishmania infantum*. **J. Comput. Chem**. v.31, n.13, p. 2463-2475, 2010.

XU, X.; HUANG, M.; ZOU X. Docking-based inverse virtual screening: methods, applications, and challenges. **Biophysics Reports**. v.4, p.1, 2018.

5. CAPÍTULO II

ATIVIDADE ANTILESHMANIA DOS ANÁLOGOS ESTRUTURAIS DAS RIPARINAS A-F DE *Aniba riparia*: AVALIAÇÃO BIOLÓGICA, ADME-Tox *IN SILICO* E DOCAGEM MOLECULAR

(Artigo submetido ao periódico **Journal of Medicinal Chemistry** - Qualis A1, Fator de Impacto JCR 2017 = 6,253)

Atividade antileshmania dos análogos estruturais das riparinas A-F de *aniba riparia:* avaliação biológica, ADME-Tox *in silico* e docagem molecular

Kayo Alves Figueiredo[a,b,c]; Rayla Kelly Magalhães Costa[c]; Jefferson Almeida Rocha[c,d]; Stanley Juan Chavez Gutierrez[e], Ricardo Martins Ramos[f], Michel Muálem de Moraes Alves[g], Fernando Aécio de Amorim Carvalho[g], André Luis Menezes Carvalho[h], Francisco das Chagas Alves Lima[b,c]

[a]Departamento de Saúde, Campus Teresina Central, Instituto Federal do Piauí, IFPI, Teresina/PI, Brasil

[b]Universidade Federal do Piauí, UFPI, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO), Teresina-PI, Brasil.

[c]Laboratório de Quântica Computacional & Planejamento de Fármaco, Universidade Estadual do Piauí, UESPI , Teresina/PI, Brasil

[d]Research Group in Natural Sciences and Biotechnology, Federal University of Maranhão, CIENATEC/ UFMA, Grajau, MA, Brazil

[e]Curso de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina/PI, Brasil

[f]Research Laboratory in Information Systems, Department of Information, Environment, Health and Food Production, Federal Institute of Piauí, LAPESI/ IFPI, Teresina, PI, Brazil,

[g]Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina/PI, Brasil

[h]Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina/PI, Brasil

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de avaliação biológica de atividade antileishmania, ADMET-tox *in silico* e docagem molecular das riparinas A - F. Foi realizada avaliação da atividade antileishmania das riparinas A-F sobre formas promastigotas de *Leishmania major*, assim como a atividade citotóxica sobre macrófagos murinos. Foi realizada a predição computacional de parâmetros físico-químicos, perfil drug-likeness, perfil farmacocinético e toxicidade. Foi utilizada a metodologia *in silico* com as moléculas das riparinas A-F para parâmetros físico-quimicos, perfil drug-likeness, perfil ADME-Tox através dos *softwares on line* como Pre-ADMET® e FAF-Drugs3®, além da bioatividade no PASS On line e Molinspiration. A otimização da geometria dos ligantes (riparinas A-F) foi realizada com o software Gaussian 03 e GaussView. A docagem molecular no Auto Dock 4.2.6. analisou as propriedades energéticas da molécula, as interações ligante-receptor mais estáveis com 18 alvos moleculares de *Leishmania major* e identificou os resíduos de aminoácidos envolvidos. As moléculas com maior atividade citotóxica contra o parasita, RipC e E, apresentaram IS de 7,22 e 12,90, respectivamente. As RipD e F apresentaram bons resultados de atividade antileishmania, porém com baixo IS. Quanto ao perfil ADME-Tox, as riparinas A-F apresentaram pequenas diferenças quanto a suas propriedades físico-químicas, principalmente para polaridade e solubilidade aquosa. Todas elas mostraram perfil adequado para *drug-likeness.* Houve um aumento da atividade antileishmania com o aumento do LogP nas riparinas. Nos estudos por docagem molecular os ligantes apresentaram Ki <1 μM para *Lm*NMT e *Lm*LEI. Foram encontradas interações moleculares importantes em resíduos do sítio ativo e de regiões adjacentes de tais enzimas. De posse de tais resultados, as riparinas apresentam um excelente potencial para aplicação na terapêutica antileishmania, principalmente para as riparinas C e E que apresentaram os melhores perfils de resultados *in silico* e *in vitro.*

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses afetam mais de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo. A cada ano são registrados dois milhões de novos casos e 350 milhões de pessoas se encontram em área de risco (WHO, 2016). A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera as leishmanioses como uma das principais doenças negligenciadas no mundo, afetando principalmente a população pobre de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2010). A infecção por parasitas do gênero *Leishmania* causa um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo as formas subclínica (inaparente), localizada (lesões na pele), e infecções disseminadas (cutânea, mucosa, ou visceral) (GRIMALDI; TESH, 1993; ASHFORD, 2000).

Há uma necessidade de novas alternativas terapêuticas uma vez que, desde 1940, os antimônios pentavalentes compostos por estibogluconato de sódio (Pentostan®), Antimoniato de Meglumine (Glucantime®) e Anfotericina B lipossomal (Ambisome®) são a principal linha quimioterapêutica para o tratamento das leishmanioses, limitando-se a via de administração parenteral. Esta é uma via invasiva e, além disso, há uma necessidade de uma terapia de longa duração, com alta toxicidade e que vem apresentando uma crescente falha terapêutica especialmente por falta de adesão ao tratamento pelos pacientes (LAHIRY et al., 2018). Dessa forma, o alto custo e a falta de eficácia dos tratamentos tradicionais vêm sendo um estímulo na busca de alternativas terapêuticas (KEDZIERSKI et al., 2009).

Conhecida popularmente como “louro”, *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) tem o centro da sua diversidade na Amazônia e nas Guianas, podendo estender-se para os Andes, para as montanhas do norte da Venezuela, leste e sul do Brasil (NUNES et al., 2013). Alcalóides do tipo alcamida foram isolados do fruto verde da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), as riparinas I, II e III. Esses compostos possuem atividades farmacológicas comprovadas em estudos pré clínicos, como atividade espasmolítica (THOMAS et al., 1994), antinociceptiva (ARAUJO et al., 2009), antimicrobiana (CATÃO et al., 2010), antiinflamatória (CARVALHO et al., 2013), ansiolítica e antidepressiva (VASCONCELOS et al., 2015) e vasodilatadora (GARCIA et al., 2016).

Com a obtenção da riparina III, por meio de uma nova rota de síntese, os análogos sintéticos das riparinas (riparinas A-F), foram obtidos utilizando uma metodologia simples e de resultados seguros, a reação de Schotten-Bauman (GUTIERREZ, 2007). Diversos trabalhos vem sendo publicados com estas moléculas análogas. As riparinas A-F apresentaram atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* com avaliação do estresse oxidativo, testes de citotoxicidade, antimicrobiana, antihelmíntica e estudos comportamentais (NUNES

et al., 2014). Outras moléculas apresentaram atividade antiinflamatória (riparina B) (SANTIAGO et al., 2015) e antioxidante e citotóxica sobre células tumorais (riparinas C, D, E, F) (NUNES et al., 2014). A molécula riparina A apresentou significativa atividade leishmanicida *in vitro* sobre *L. amazonensis* (ARAÚJO et al., 2016). Já a riparina E apresentou potente atividade antibacteriana (COSTA et al., 2016) e efetividade máxima contra esquistossomas em baixas concentrações (MAFUD et al., 2018).

A farmacocinética teórica *in silico* é uma abordagem atualmente muito utilizada no estudo inicial das propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) com o objetivo de diminuir o gasto desnecessário em ensaios biológicos de compostos com elevada probabilidade de problemas farmacocinéticos e tóxicos futuros, economizando tempo e investimento (KADAN; ROY, 2007; MAQUIAVELI et al., 2016). Estudos de docagem molecular são de grande importância no planejamento de fármacos e na descoberta de novos alvos terapêuticos para o tratamento da leishmaniose (MAMIDALA et al., 2016; FIGUEIREDO et al., 2018). O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de avaliação biológica de atividade antileishmania, ADMET-tox *in silico* e docagem molecular das riparinas A - F.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substâncias químicas e reagentes

As riparinas A-F foram obtidas pela reação de Schoten-Bauman, como descrito anteriormente (GARCIA et al., 2016). Foi realizada a purificação por cromatografia em coluna, usando uma mistura de solventes orgânicos com crescente aumento de polaridade, como descrito por GUTIERREZ (2007). Para classificar os produtos, foi realizado o teste do reagente de Dragendorff em cromatografia em camada delgada. Na Riparina A apresenta 93,33% de pureza; Riparina B, pureza de 89,89%; Riparin C, pureza de 97,39%; Riparina D, pureza de 88,88%; Riparina E, pureza de 96,48%; Riparin F, pureza de 93,83%. A anfotericina B foi adquirida na Fagron (Brasil).

Meios de cultura de Schneider e RPMI 1640, reagente Griess (1% sulfamida em H_3PO_4 a 10% (v/v) em água Milli-Q), antibióticos penicilina e estreptomicina, e outros reagentes de cultura de células, incluindo soro fetal bovino (FBS), tioglicolato, zimosan, vermelho neutro (NR) e sal de tetrazólio (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil-brometo de tetrazólio - MTT) foram adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA). O ácido acético glacial, etanol, dodecilsulfato de sódio (SDS), formaldeído, cloreto de sódio, acetato

de cálcio, anidro sulfato de sódio e dimetilsulfóxido (DMSO, 99% de pureza) foram adquirido na Merck Chemical Company (São Paulo, SP, Brasil).

2.2 Atividade antileishmania contra formas promastigotas de Leishmania major e atividade citotóxica em macrófagos murinos

2.2.1 Animais e macrófagos peritoneais

Para obtenção dos macrófagos foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c machos e fêmeas (4-5 semanas de idades) do biotério Central da Universidade Federal do Piauí, (NPPM/CCS/UFPI), Teresina, Brasil. Os macrófagos da cavidade peritoneal foram obtidos após 72 horas da inoculação intraperitoneal de 1,5 ml de tioglicolato de sódio (Protocolo de aprovação nº CEEA 256/16).

2.2.2 Cultura de células

L. major (IFLA/BR/67/PH8) foi mantida em passagens em camundongos isogênicos BALB/c e de forma *in vitro* como promastigostas a 26°C em meio de Schneider's suplementado, pH 7 (10% de FBS inativado pelo calor, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina) (CARNEIRO et al., 2012).

2.2.3 Atividade contra formas promastigotas de *Leishmania major*

Formas promastigotas de *L. major* na fase logarítmica de crescimento foram plaqueadas na quantidade de $1x10^6$ por poço em uma placa de 96 poços contendo as riparinas A-F em concentrações variando de 800 até 6,25 µg/mL (3550 a 128 µM). Em seguida, a placa foi acondicionada em estufa de demanda biológica de oxigênio (BOD®) a 26º C, durante 48 h. Passado esse período, uma alíquota de cada concentração das substâncias foi retirada e posta em lâmina de microscópio para avaliação da morfologia do parasita através da coloração com panótico rápido®. A citotoxicidade sobre as formas promastigotas do parasita foi avaliada pelo método colorimétrico da Resazurina®, adicionando 20 µL em cada poço na concentração de 1 mM. A leitura foi realizada em leitor de placas a 550 nm após 6 h da adição do corante (CARNEIRO et al., 2012).

2.2.4 Citotoxicidade sobre macrófagos e o cálculo do índice de seletividade (IS)

A avaliação da citotoxicidade foi efetuada em placas de 96 poços usando o ensaio de MTT. Aproximadamente $1x10^6$ macrófagos por poço foram incubados in 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado a 37 ºC e 5% de CO_2 durante 4 h para a adesão celular. As células não aderentes foram removidas por lavagem com meio RPMI 1640. As riparinas A-F foram

diluídas em meio RPMI 1640 suplementado, adicionada a um intervalo de concentrações e incubados a 37ºC com 5% de CO_2 durante 48 h. Após a incubação, a citotoxicidade foi avaliada pela adição de MTT (5 mg/mL). O sobrenadante foi rejeitado e o cristais de formazan foram dissolvidos pela adição de 100 µL de DMSO. Por fim, a absorvância a 550 nm foi medida utilizando um leitor de ELISA. O IS de cada tratamento foi calculado pelo quociente da concentração de citotoxicidade de 50% (CC_{50}) obtida em macrófagos peritoneais pela concentração inibitória média (CI_{50}), obtida da atividade das riparinas contra formas promastigotas de *L. major* (CARNEIRO et al., 2012).

2.3 Avaliação ADMET-Tox in silico e docagem molecular

2.3.1 Avaliação do perfil ADME-Tox

Foi realizada a predição computacional para as riparinas A-F e para o fármaco de referência pentamidina de parâmetros físico-quimicos, perfil drug-likeness, perfil farmacocinético e toxicidade através dos *softwares* gratuitos *on* line Pre-ADMET® (https://preadmet.bmdrc.kr/), PREMETABO® (http://premetabo.bmdrc.kr/) (LEE et al., 2004) e FAF-Drugs4® (http://fafdrugs4.mti.univ-paris-diderot.fr/) (LAGORCE et al., 2017a). Foram avaliados ainda dados de perfil de bioatividade através dos softwares MOLINSPIRATION® (https://www.molinspiration.com/) (JARRAHPOUR et al., 2010) e PASS ON LINE (http://www.pharmaexpert.ru/passonline/) (FILIMONOV et al., 2014). A dose letal média (DL50) foi predita utilizando-se o software GUSAR® (http://www.way2drug.com/gusar/). (LAGUNIN et al., 2011).

2.3.2 Avaliação da interação por docagem molecular das riparinas A-F em receptores de *L. major*

2.3.2.1 Otimização da geometria das riparinas A-F e cálculos quânticos

O estudo de descritores moleculares das riparinas A-F e da pentamidina foram realizados usando o software Gaussian 09 (http://gaussian.com/products/) (FRISCH et al., 2010). O GaussView 5.0.8 foi utilizado para a obtenção das estruturas 3D das moléculas (DENNINGTON; KEITH; MILLAN, 2008). Foram realizados cálculos teóricos de otimização da geometria de equilíbrio das moléculas no vácuo, através do método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT), usando o funcional hibrido B3LYP combinado com o conjunto de base 6-31g(d,p). Após esta etapa, foi realizada outra otimização, utilizando o mesmo funcional, mas com o conjunto de base 6-311++G(d,p) (PM6). Ao final, as moléculas foram convertidas para o formato .pdb para utilização no estudo de docagem molecular.

2.3.2.2 Preparo dos receptores-alvo

As estruturas tridimensionais dos principais alvos identificados foram obtidos do banco de dados de proteínas Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/) (BERMAN et al., 2000). Em seguida, os arquivos de proteínas foram preparados pela remoção de todas as moléculas de água e outros grupos, como íons, usando o software CHIMERA v.13.1 (https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/) (PETTERSEN et al., 2004).

Foram utilizadas as seguintes estruturas de *L. major*: *Lm*NMT - N-miristoiltransferase (PDB ID: 5G21); *Lm*OPB - Oligopeptidase B (PDB ID: 2XE4); *Lm*LEI - Leishmanolisina (PDB ID: 1LML); *Lm*PDE1 - Fosfodiesterase 1 (PDB ID: 2R8Q); *Lm*DOD -Dihidroorotate desidrogenase (PDB ID: 3GYE); *Lm*METR - Metionil-tRNA (PDB ID: 3KFL); *Lm*TRYS - Tripanotiona sintetase (PDB ID: 2VOB); *Lm*PTR1 - Pteridine reductase (PDB ID: 1E92); *Lm*FGM - Fosfoglucomutase (PDB ID: 4QG5); *Lm*FH2 - Fumarato hidratase 2 (PDB ID: 5L2R); *Lm*LAP - Leucilaminopeptidade (PDB ID: 5NTH); *Lm*NH - Nucleosídeo hidrolase (PDB ID: 1EZR); *Lm*TPX -Triparedoxina peroxidase (PDB ID: 4K1F); *Lm*PPX - Pseudoperoxidase (PDB ID: 5VIA); *Lm*FBP - Frutose-1,6-bisfosfatase (PDB ID: 50EZ); *Lm*rRNA - rRNA (PDB ID: 4K32); *Lm*CICLO - Ciclofilina (PDB ID: 2HQJ).

2.3.2.3 Estudo de docagem molecular

Os cálculos de docagem molecular foram realizados com o programa Autodock v. 4.2.6 (http://autodock.scripps.edu/) (MORRIS et al., 2009). Foram analisadas as interações receptor-ligante de 18 alvos moleculares de *L. major*. As proteínas (receptores) e ligantes foram preparados para os cálculos de docagem molecular utilizando o programa Autodock Tools (ADT), versão 1.5.6 (SANNER, 1999). Os receptores foram considerados rígidos enquanto que cada ligante foram considerados flexíveis. As cargas parciais Gasteiger (GASTEIGER; MARSILI, 1980) foram calculadas após a adição de todos os hidrogênios. Os átomos de hidrogênio não polares de proteínas e ligantes foram subsequentemente mesclados. Para os cálculos de docagem, foi empregada uma resolução de 0,375 Å para a malha de afinidade (grid), que consistiu de 60 x 60 x 60 pontos. Os centros dos grids de afinidade foram definidos a partir das coordenadas dos átomos dos resíduos dos sítios ativos de cada alvo. O algoritmo genético Lamarckiano (LGA) com busca global (MORRIS et al., 1998) e pseudo-Solis e Wets com busca local (SOLIS; WETS, 1981) foram os métodos utilizados na docagem molecular. Cada simulação consistiu de 100 corridas independentes (RAMOS et al., 2012). O restante dos parâmetros de docagem foram definidos com os valores padrão. As análises da docagem molecular foram concentradas nos clusters de menor energia. A conformação de menor energia combinada com inspeção visual foi escolhida para uma análise

mais detalhada. A visualização das interações dos complexos com as conformações de menor energia foi realizada no CHIMERA e Ligplot (https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/) (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1996).

2.4 Analise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. Os valores de CI_{50}, CC_{50} foram obtidos através do cálculo de regressão de probitos, utilizando o pacote SPSS® versão 22 e assumindo um nível de confiança de 95% ($p<0.05$). Para o cálculo da correlação de Pearson foi utilizado o software GraphPad Prism v.5.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade antileishmania contra formas promastigotas de Leishmania major e atividade citotóxica em macrófagos murinos

As riparinas A-F avaliadas neste trabalho apresentaram um potencial citotóxico sobre as formas promastigotas de *L. major*, espécie de parasita causadora da leishmaniose cutânea no homem e em outros mamíferos (BUCKNER; SCHWARTZ, 2017). As riparinas C e E apresentaram os menores valores de CI_{50} e uma potente atividade antileishmania: 37,18 e 15,23 µM, respectivamente (Tabela 1). Fármacos clássicos como a anfotericina B apresentam CI_{50}/48 h sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* de 0,17 µM (DUARTE et al., 2016). Outros fármacos também apresentaram boa potência *in vitro* sobre algumas espécies de *Leishmania* sp.: 0,82 a 1,83 µM para a pentamidina (BELL et al., 1990; BAKUNOVA et al., 2009); antimoniato de meglumina (40,0 µM) e 8 a 16 µM para a paranomicina (KHAN et al., 2017). Isso demonstra a boa potência *in vitro* sobre formas promastigotas do parasita das moléculas avaliadas.

Além do potencial citotóxico sobre *L. major*, foi avaliado o efeito das riparinas A-F frente a macrófagos murinos, com um CC_{50} variando de 107,35 a 1249,59 µM (Tabela 1). Dessa forma, tais moléculas apresentaram uma maior seletividade para o parasita da ordem de 1,6 a 15,36. As moléculas com maior atividade citotóxica contra o parasita, RipC e E, apresentaram IS de 7,22 e 12,90, respectivamente. As RipD e F apresentaram bons resultados de atividade antileishmania, porém com menor IS. A anfotericina B, fármaco de referência com potente atividade *in vitro* sobre várias espécies de *Leishmania sp.*, apresentou o menor valor de CI_{50}, porém com um IS menor do que as riparinas A, C e E (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito antileishmania e citotóxico das riparinas A-F em 48h.

	RipA	RipB	RipC	RipD	RipE	RipF	Anf. B
Promastigota CI_{50} (µM)	81,36	128,43	37,18	66,77	15,23	59,87	1,88
Macrófagos CC_{50} (µM)	1249,59	282,62	268,61	107,35	196,48	161,62	9,46
IS	15,36	2,20	7,22	1,60	12,90	2,70	5,02

CI_{50} =concentração inibitória média. CC_{50}=concentração citotóxica média. IS=índice de seletividade (CC_{50}/CI_{50}).

3.2 Avaliação ADMET-Tox in silico e docagem molecular

3.2.1 Avaliação do perfil ADME-Tox

Vários estudos vem investigando a relação entre as propriedades físico-químicas e o perfil ADME-Tox de pequenas moléculas. Um melhor entendimento de tais parâmetros é de grande importância no desenho de novos fármacos capazes de se ligarem a múltiplos alvos biológicos e exibir perfis farmacológicos interessantes, uma situação que deve ser benéfica para o tratamento de doenças com etiologias complexas (LAGORCE et al., 2017b). O perfil ADME-Tox, neste estudo, determinou a atividade fármaco-semelhante (*drug-likeness*) das moléculas avaliadas. Além disso, avaliou a farmacocinética *in silico* (taxa de absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e toxicidade com base no teste de ames, teste de carcinogenicidade em roedores, risco de inibição de hER, DL_{50} em ratos, entre outros.

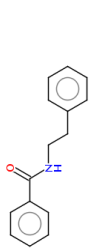
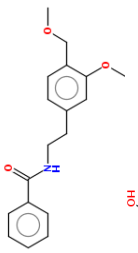
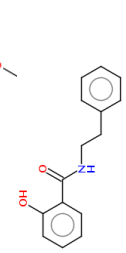
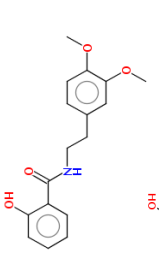
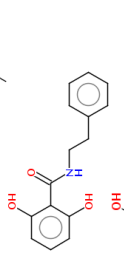
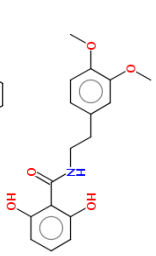
Ao avaliarmos as Tabelas 2 e 3, observamos os parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e toxicológicos avaliados por 3 diferentes softwares, além dos resultados do perfil *drug-likness*. O peso molecular (PM) é uma propriedade físico-química importante na pesquisa de novos fármacos, pois ela pode impactar sobre vários eventos moleculares, como absorção, taxa de eliminação pela bile, penetração pela barreira hemato-encefálica (BHE) e interações com alvos moleculares (GLEESON et al., 2011). Todas as moléculas apresentaram PM dentro do intervalo recomendável.

Propriedades como hidrofobicidade, distribuição eletrônica, características de ligação de hidrogênio, tamanho da molécula, flexibilidade e presença de alguns grupos farmacóforos influenciam o comportamento da molécula em um organismo vivo, incluindo biodisponibilidade, propriedades de transporte, afinidade a proteínas, reatividade, toxicidade, estabilidade metabólica e muitos outros (PIHAN, 2012). Os valores de LogP e TPSA são duas propriedades importantes para a predição da biodisponibilidade oral de candidatos a fármacos (HADDA et al., 2013).

A lipossolubilidade expressada como LogP tem grande importância em parâmetros de ADME-Tox, bem como na sua atividade farmacológica. Por exemplo, poderão haver

significativas alterações na solubilidade e metabolismo quando os valores de lipofilicidade são elevados, enquanto a permeabilidade pelas membranas celulares pode ser diminuída quando este é muito baixo (WARING, 2010). Além disso, valores altos de lipofilicidade estão implicados em propriedades tóxicas como inibição de hERG e CYP450, além de indução de fosfolipidose (GLEESON, 2008). Esta última é uma reação adversa em resposta a fármacos anfifílicos catiônicos (como antidepressivos, antibióticos e hipocolesterolêmicos) que levam a um acúmulo de fosfolipídios polares nos lisossomos (PRZYBYLAK; ALZAHRANI; CRONIN, 2014). Todos os compostos, exceto pentamidina, não são indutores de fosfolipidose.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos avaliados pelo FAFdrugs4.

Parâmetro (ideal)*	**RipA**	**RipB**	**RipC**	**RipD**	**RipE**	**RipF**	**Penta**
Estrutura química							
PM[a] (<450)	225,29	299,37	241,29	301,34	257,28	317,34	340,42
logP[b] (≤4,5)	2,87	2,78	3,47	3,29	3,55	3,49	2,56
logSw[c] (>-4,0)	-3,06	-3,19	-3,53	-3,60	-3,67	-3,82	-3,08
TPSA[d] (<180)	29,1	47,56	49,33	67,79	69,56	88,02	121,68
Lig. rotacion. (≤11)	4	7	4	6	4	6	10
Lig. rígidas (≤30)	14	14	14	14	14	14	14
HBD[e] (≤5)	1	1	2	2	3	3	6
HBA[f] (≤10)	2	4	3	5	4	6	6
Anéis (≤6)	2	2	2	2	2	2	2
Cargas (≤4)	0	0	0	0	0	0	2
Lipinski viol. (<2)	0	0	0	0	0	0	1
Biodispon. oral- Veber	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa
Biodispon. oral - Egan	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa
Ind. fosfolipidose	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
Fsp3[g](>0,36)	0,13	0,28	0,13	0,24	0,13	0,24	0,26
QED[h]	0,851	0,855	0,861	0,859	0,784	0,759	0,299
Resultado	Aceito	Aceito	Aceito	Aceito	Aceito	Aceito	Aceito

a: peso molecular**;** b: coeficiente de partição octanol-água; c: solubilidade aquosa; d: área de superfície polar topológica (Å^2); e: nº de átomos doadores de H; f: nº de átomos receptores de H; g: nº C com hibridização sp3; h: *quantitative estimate of drug-likeness*. *Segundo Drug-Like Soft (PIHAN et al., 2012), Regra dos 5 (LIPINSKI et al., 1997) e LAGORCE et al., 2017a.

Uma maior lipofilicidade apresenta relação com a presença de anéis aromáticos e indução de toxicidade. A presença de 3 ou mais anéis pode implicar no aumento do risco de inibição de hERG e de CYP450, além de aumentar sua ligação as proteínas plasmáticas pelo aumento de afinidade a albumina sérica (LOVERING; BIKKER; HUMBLET, 2009).

TPSA é outro descritor comumente relacionado a ligações de hidrogênio (contagem de átomos de oxigênio e nitrogênio), o qual pode estar implicado com alterações na permeabilidade e biodisponibilidade oral. Além disso, o TPSA pode ser usado em combinação com a contagem de ligações rotacionáveis e avaliar a flexibilidade molecular, o que pode alterar também a biodisponibilidade oral de muitas moléculas (GURUNGA; BHATTACHARJEEA; ALI, 2016). Todas as moléculas analisadas estão dentro do intervalo recomendado para LogP, TPSA e ligações rotacionáveis (Tabela 2).

Outro parâmetro interessante está relacionado a propriedade de doar ou aceitar hidrogênios. Moléculas com a presença de mais HBA (contagem de átomos de O + N) do que HBD (contagem de OH + NH) possuem perfil ADME-Tox mais favorável, uma vez que um grande número de HBD pode implicar em baixas permeabilidade, absorção e biodisponibilidade (LIPINSKI, 2016). Todas as moléculas apresentaram número de HBA e HBD dentro do recomendado (Tabela 2).

Fsp3 define a complexidade molecular, número de carbonos sp3 hibridizados/ contagem total de carbonos. Todos os compostos apresentam tal valor menor do que o recomendado, o que pode implicar em solubilidade aquosa reduzida. Entretanto, para esta solubilidade predita (logSw), os dados da Tabela 2 mostram que todos os compostos possuem valores dentro da faixa aceitável, com o valor para RipF mais próximo do limite inferior (-3,82).

Várias regras foram desenvolvidas para guiar a seleção de compostos candidatos a fármacos (LAGORCE et al., 2017b). A regra de Lipinski ou regra dos 5, foi uma das primeiras aplicações da combinação entre propriedades fisico-químicas de uma molécula e seu perfil drug-likeness. Esta regra afirma que é mais provável que um composto seja permeável as membranas e facilmente absorvido através de difusão passiva no intestino humano se corresponder aos seguintes critérios: LogP≤5; PM≤500; HBA≤ 10 e HBD≤5 (LIPINSKI et al., 1997).

As riparinas não violaram a regra dos 5 e apresentaram resultados positivos para as regras de Veber e Egan (Tabela 2), as quais predizem o perfil de biodisponibilidade oral (KHAN et al., 2018). Além disso, foi realizada uma análise quantitativa do perfil drug-likeness de cada molécula e expressa pelo QED (*quantitative estimate of drug-likeness*). Tal

cálculo envolve 8 descritores (como PM, LogP, TPSA, entre outros) e geram um escore final que, quanto mais próximo de 1, maior a qualidade da molécula como potencial fármaco (BICKERTON et al., 2012). Ao observarmos a Tabela 2, a RipC apresentou o maior valor de QED (0,861).

Além do FAFdrugs4, todas as riparinas apresentaram perfil qualificado para candidato a fármaco pelo PREADMET (Tabela 3) pelas regras de Lipinski, Lead like, CMC like e WDI-like. Para MDDR like, foram classificadas como estrutura com perfil médio. Pentamidina não apresentou resultado positivo em WDI-like, o que era esperado, tendo em vista que algumas drogas presentes no mercado (como alguns antimicrobianos) apresentam exceções em tais regras (LIPINSKI, 2016).

Para o desenvolvimento de moléculas bioativas como agentes terapêuticos, prever a absorção intestinal humana (AIH) e uma boa biodisponibilidade oral é freqüentemente uma consideração de grande relevância. Os dados de HIA são calculados a partir da biodisponibilidade e absorção, além da taxa de excreção. O modelo de células Caco-2 (linhagem celular intestinal bem diferenciada derivada de carcinoma colorrectal humano) e o modelo celular de rim canino Madin-Darby (MDCK) têm sido recomendados como um modelo confiável *in vitro* para a predição da absorção oral de fármacos (KOVAČEVIĆ et 2014). Células Caco-2 exibem muitas das propriedades morfológicas e funcionais das células intestinais humanas, já as células MDCK possuem um período de crescimento mais curto e podem ser utilizadas como uma boa ferramenta para um rápido *screening* de permeabilidade (IRVINE et al. 1993).

Quanto as propriedades de predição de permeabilidade e absorção das riparinas, foram observados perfis farmacocinéticos variáveis (Tabela 3). Como podemos citar, por exemplo, os parâmetros de MDCK, Caco-2 e AIH, com resultados de média (2 a 20 cm/s) a alta (>20cm/s) permeabilidade intestinal (baixa para rip D e F para MDCK) e algumas com absorção intestinal humana próximo a 90% (YAMASHITA et al., 1997; YEE, 1997; JIN et al., 2014). RipA, C e E apresentaram bons valores para estes três parâmetros.

Podemos demonstrar uma relação entre esses valores e o parametros fisico-químicos apresentados. As RipC, E e F apresentaram os maiores valores de LogP e, consequentemente, os menores valores de HIA e Caco-2. Já a pentamidina apresentou uma menor lipofilicidade e menores valores de HIA e Caco-2. Isto pode ser influenciado por outros parâmetros como seu maior PM e TPSA, além de alto HDB (Tabela 2).

As RipC e E apresentaram os maiores valores de solubilidade aquosa, com valores em torno de 500 a 700 mg/L. Porém, estão classificadas como fármacos com baixa

solubilidade em água (BRASIL, 2010), o que pode dificultar o processo de dissolução nos fluidos biológicos e o desenvolvimento de algumas formas farmacêuticas. Para a permeabilidade transdérmica em termos de logKp (cm/h), as riparinas apresentaram valores de -3,75 a -2,29. RipA, C e pentamidina apresentaram os melhores valores. Quanto mais negativo o valor, menos permeável a pele é a molécula. O coeficiente de permeabilidade Kp pode ter relação direta com o PM e a lipofilicidade (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) o que pode ser observado para a RipE com LogP 3,55 e o mais baixo valor de LogKp.

Tabela 3. Parâmetros de drug-likeness e ADME-Tox avaliados pelo PreADMET e GUSAR.

Parâmetro	**RipA**	**RipB**	**RipC**	**RipD**	**RipE**	**RipF**	**Penta**
Drug- likeness							
CMC like	Qualif.	Qualif.	Qualif.	Qualif.	Qualif.	Qualif.	Qualif.
Lead like	Qualif.	Qualif.	Qualif.	Qualif.	Qualif.	Qualif.	Qualif.
MDDR like	Média estrutura	Média estrutura	Média estrutura	Média estrutura	Média estrutura	Média estrutura	Média estrutura
Regra dos 5	Qualif.	Qualif.	Qualif.	Qualif.	Qualif.	Qualif.	Qualif.
WDI like rule	Dentro 90% cut-off	Dentro 90% cut-off	Dentro 90% cut-off	Dentro 90% cut-off	Dentro 90% cut-off	Dentro 90% cut-off	Fora 90% cut-off
ADME							
BHE[a]	1,72	0,13	2,15	0,43	1,52	0,46	0,42
Caco-2[b]	28,64	37,32	21,09	26,75	18,03	18,78	0.48
MDCK[c]	36,28	4,25	30,28	0.42	37,32	0.13	5.03
AIH[d]	97,54	95,54	92,45	92,93	88,32	88,63	65.27
Solub H_2O(mg/L)	255,44	203,69	520,81	262,81	760,52	379,01	128.58
CYP_2C19 inib[e]	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
CYP_2C9 inib[e]	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
CYP_2D6 inib[e]	Inib.	Não	Não	Não	Não	Não	Inib.
CYP_2D6 subs[e]	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
CYP_3A4 inib[e]	Não	Não	Não	Inib.	Inib.	Inib.	Não
CYP_3A4 subst[e]	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Fraco
SULT subst[f]	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
UGT subst[f]	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Perm. transd.(Kp)	-2,29	-2,91	-2,88	-3,13	-3,75	-3,62	-2.39
Pgp inib[g]	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Pgp subst[g]	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
PPB%[h]	92,66	86,28	84,27	82,47	82,46	81,36	59.01
Toxicidade							
Ames teste[i]	Mutag.	Mutag.	Mutag.	Mutag.	Mutag.	Mutag.	Mutag.
Carcino Mouse[i]	+	+	-	-	-	-	+
Carcino Rat[i]	-	-	-	-	-	-	-
Risco hER inib[j]	Médio	Médio	Médio	Médio	Médio	Médio	Médio
DL50 oral (mg/Kg)	2304,00	1035,00	1757,00	1038,00	2248,00	996,70	1834,00
DL50 IP (mg/Kg)	666,10	570,80	608,60	620,90	613,20	669,40	608,00
DL50 IV (mg/Kg)	149,60	44,18	95,09	68,69	114,20	84,08	87,54
DL50 SC (mg/Kg)	752,50	1302,00	1519,00	1691,00	1777,00	1740,00	2967,00

a: Barreira hematoencefálica; b: Ensaio de permeabilidade em células Caco2; c: Ensaio de permeabilidade em células MDCK; d: absorção intestinal humana; e: Inibição ou substrato da enzima Citocromo P450 (CYP); f: Substrato para sulfotransferase/glucoroniltransferase; g:

Inibição/substrato da glicoproteina-P; h: Ligação a proteínas plasmáticas; i: Ensaio de Mutagenicidade/Carcinogenicidade; j: Ensaio de segurança (hERG canal de K); DL_{50} dose letal média (mg/Kg.); IP: intraperitoneal; IV: intravenoso; SC: subcutâneo.

Geralmente apenas a fração não ligada de um fármaco está disponível para difusão ou transporte através das membranas celulares e para interação com um alvo farmacológico. Dessa forma, uma alta PPB influencia na biodistribuição e atividade farmacológica. (KOVAČEVIĆ et 2014). Quanto aos parâmetros farmacocinéticos de distribuição, cinco das moléculas apresentaram PPB menor do que 90% e a ripA apresentou alta PPB. Apresentaram ainda penetração pela BHE de média (0,1 a 2,0) a alta (>2,0) (MA et al, 2005) e, dessa forma, podem apresentar efeito farmacológico sobre o Sistema Nervoso Central, como apresentado em estudos pré-clínicos anteriores (ARAÚJO et al., 2018).

Quanto ao parâmetro de inibição e degradação enzimática: RipA e pentamidina são inibidores da CYP2D6 e esta enzima metaboliza a pentamidina; CYP3A4 é inibida pelas RipD, E e F; RipB é considerada substrato da CYP3A4. Além disso, não foram consideradas como alvo da glicoproteína P, com exceção de RipF e pentamidina. Todas as moléculas são potenciais alvos da SULT e/ou UGT, com exceção da RipB.

A predição da toxicidade é o passo final da análise ADME-Tox das moléculas avaliadas. Em relação a toxicidade *in silico*, todas as riparinas apresentaram resultado positivo para o teste de Ames, negativo para carcinogecinicidade em ratos e positivo nas Rip A e B para camundongos. A previsão *in silico* dos valores de DL_{50} para ratos em quatro vias de administração foi realizada pelo software GUSAR, que inclue as informações sobre cerca de 10.000 estruturas químicas com dados sobre a toxicidade aguda representados nos valores de DL_{50} (LAGUNIN et al., 2011). Os valores de DL_{50} preditos foram considerados bem seguros e as riparinas foram consideradas como categoria 4 para administração oral (OECD, 2001).

Os estudos computacionais vem sendo aplicados para selecionar os possíveis candidatos a fármaco com base em avaliações de propriedades biológicas relevantes através de métodos *in silico* (BALAKRISHNAN; RAJ; KANDAKATLA, 2015). Molinspiration é uma ferramenta web usada para prever o escore de bioatividade de novas moléculas contra receptores humanos, como GPCRs, canais iônicos, quinases, receptores nucleares, proteases e enzimas (PROUDFOOT, 2002). Se a valor do escore de bioatividade é >0, este é considerado um composto ativo para aquele receptor. Mas se tal escore é <-5,0, é um composto inativo, enquanto a faixa entre -5,0 a 0,0, ele são compostos moderadamente ativos (JARRAHPOUR et al., 2010).

Na Tabela 4, podemos observar a predição *in silico* de atividades biológicas com base nos softwares Molinspiration e PASS on line. Para os escores de bioatividade, observamos que as RipA e RipE foram consideradas moderadamente ativas para todos os grupos de receptores avaliados. As outros riparinas apresentaram-se como compostos ativos para GPCR e/ou canal iônico. Pentamidina foi ativa contra quase todos os receptores, com menor atividade sobre a inibição protéica. Como é um fármaco de referência, está presente no banco de dados deste software. Uma relação entre atividade antileishmania *in vitro* e um bom e/ou moderado escore de atividade sobre esses receptores foi também observado por outros autores (UDDIN et al., 2015; SIRAJUDDIN; ALI; MCKEE, 2015).

Ainda na Tabela 4, podemos observar ainda a predição de resultados com o uso do PASS on line, um *software* baseado no "*machine learning methods*", o qual utiliza o algoritmo Bayesiano e descritores de multiníveis de átomos vizinhos. Ele estima a probabilidades de atividade e inatividade para mais de 4000 atividades biológicas a partir da análise das relações de estrutura-atividade para mais de 300.000 compostos biologicamente ativos (LAGUNIN et al., 2011). Quanto maior o número de descritores relevantes, maior será a eficiência e propabilidade de atividade para a molécula em questão (MISHRA et al., 2009).

Tabela 4. Perfil de atividades biológicas das riparinas A-F avaliadas pelo Molinspiration e PASS online.

Parâmetro	**RipA**	**RipB**	**RipC**	**RipD**	**RipE**	**RipF**	**Penta**
Score de bioatividade							
GPCR	-0,15	0,01	-0,07	0,02	-0,04	0,01	0,35
Canal iônico	-0,04	-0,12	0,01	-0,09	-0,11	-0,18	0,17
Proteína quinase	-0,31	-0,16	-0,23	-0,09	-0,18	-0,08	0,10
Receptor nuclear	-0,53	-0,23	-0,27	-0,13	-0,15	-0,07	0,01
Inibidor protéico	-0,23	-0,01	-0,18	-0,08	-0,13	-0,06	-0,09
Inibidor enzimático	-0,10	-0,10	-0,02	-0,04	-0,01	-0,05	0,20
Bioatividade (Pa)							
MTHF redutase (inibidor)	0,863	0,651	0,869	0,724	0,826	0,542	0,475
Antiprotozoário (Leishmania)	0,240	0,209	0,264	0,295	-	0,295	0,704
Antiprotozoário (Trypanosoma)	0,270	-	0,255	0,220	0,255	0,220	0,751
Pin1 (inibidor)	0,860	0,780	0,857	0,847	0,857	0,847	0,545
ATPase transportador de poliaminas (inibidor)	0,798	0,271	0,666	0,365	0,666	0,365	0,476
Oligopeptidase B (inibidor)	0,255	-	0,182	-	0,182	-	0,354
Glicose oxidase (inibitor)	0,553	-	0,602	0,280	-	0,602	0,564
Metabolismo lipídico (regulador)	0,409	0,401	0,444	0,421	0,444	0,421	0,772

Pa: propabilidade de atividade. GPCR: receptor acoplado a proteína G; MTHF: metileno tetrahidrofolato.

Algumas importantes probabilidades de atividades foram observadas (Tabela 4). Pa >0,7, 0,5<Pa<0,7 e Pa<0,5 significa que o composto correspondente apresentado seja muito provável, provável ou pouco provável que demonstre atividade em experimentos, respectivamente. No entanto, alguns estudos com Pa para atividade antileishmania podem apresentar correlação ou não com atividade biológica de atividadade antileishmania *in vitro* (DI GIORGIO et al., 2003; DI GIORGIO et al., 2004).

Algumas riparinas apresentaram Pa acima de 0,7 para o MTHF redutase, enzima chave na via do folato em *Leishmania* sp. (VICKERS; BEVERLEY, 2011), além da Pin1, que pertence a classe das ciclofilinas e faz parte do metabolismo de polipeptídeos (MOORE; POTTER, 2013). Outras vias metabólicas envolvidas foram metabolismo de poliaminas, da glicose e de lipídeos, com valores de Pa variáveis, as quais podem ser potenciais alvos na terapia antileishmania (SCOTTI et al., 2015). Algumas das riparinas apresentaram Pa para a oligopeptidase B, importante fator de virulência em leishmania (SODERO et al., 2017) e que apresentou bons valores de energia de ligação com riparinas em *L. major* (resultados adiante na Tabela 6).

Além do perfil de atividades biológicas, os PASS online poderá prever o perfil de reações adversas dos compostos analisados (FILIMONOV et al., 2014). Algumas riparinas apresentaram para Pa>0,8: galactorréia, hipotensão ortostática, tremores, fibrilação atrial, espasmos musculares, descoloração da urina, palpitação, úlcera, hipercolesterolemia, entre outros. Para a pentamidina foram encontrandos hematúria, galactoréia, hipomagnesemia, acidose metabólica, úlcera, etc.

Um dado importante a se observar é que as moléculas com maior LogP (em torno de 3,5) foram aquelas que apresentaram maior atividade antileishmania *in vitro,* as RipE, C e F respectivamente. Segundo LAGORCE et al., 2017b, após uma análise de vários bancos de dados, foi observados que fármacos com LogP entre 3,1 a 3,5 estão bastante relacionados a interação com GPCR e enzimas. Segundo a Tabela 4, os escores de bioatividade calculados no Molinspiration foram maiores para GPCR, canal iônico e inibidor enzimático, o que corrobora também com os dados deste autor. Este estudo mostra uma forte correlação negativa entre a lipofilicidade (LogP) e o CI_{50} da atividade antileishmania *in vitro* em *L. major* (r= -0,8926; correlação de Pearson). Tal achado pode ter relação com a melhor penetração pela membrana plasmática do parasita, como encontrado por alguns autores (ESTEVEZ et al., 2011; WOODRING et al., 2017).

3.2.2 Avaliação da interação por docagem molecular das riparinas A-F em receptores de *Leishmania major*

A docagem molecular permite ao pesquisador realizar uma triagem virtual de vários candidatos a fármaco com base na sua habilidade de ligação e sua forte afinidade com um receptor alvo (SILVA et al., 2008; ALHAZMI, 2015). No preparo dos ligantes para o estudo de docagem molecular, foi necessária realizar a otimização da sua conformação de menor energia. Dessa forma, foi possível a análise ainda de alguns descritores moleculares obtidos a partir do cálculos de otimização obtidos no Gaussian (Tabela 5).

De acordo com as energias relativas entre as moléculas analisadas, observa-se que a pentamidina apresentou-se como a mais estável, seguida pela RipF e RipD (Tabela 5). As cargas eletrônicas dos compostos são importantes em suas propriedades físico-químicas e muito utilizadas na previsão da reatividade química. O momento dipolo (MD) é um parâmetro usado para descrever a polaridade de uma molécula e tem um papel na interação molécula-receptor (MILADIYAH et al., 2018). Para o cálculo do MD para as moléculas avaliadas, foram encontrados valores variando de 3,96 a 6,06. O acréscimo dos grupos -OH e -OCH_3 a molecula de RipA pode repercutir em diferenças de polaridade e solubilidade aquosa entre as riparinas. Não foi encontrada correlação entre o MD e os valores de CI_{50} da atividade *in vitro* (r=0,1261).

Tabela 5. Descritores moleculares das riparinas A-F obtidos no Gaussian.

Molécula	**EE (Hartree)**	**MD (Debeys)**	**Polarizabilidade (α)**	**E_{HOMO} (eV)**	**E_{LUMO} (eV)**	**Gap_{H-L} (eV)**
RipA	-710,67	3,96	183,70	-0,25023	-0,04528	-0,20495
RipB	-939,72	5,37	221,39	-0,22432	-0,04244	-0,18188
RipC	-785,91	4,97	193,70	-0,24059	-0,04798	-0,19261
RipD	-1014,95	6,06	232,12	-0,21481	-0,04649	-0,16832
RipE	-861,13	4,77	196,86	-0,23552	-0,02560	-0,20992
RipF	-1090,17	5,57	229,58	-0,22091	-0,02080	-0,20011
Penta	-1108,00	4,41	282,66	-0,22609	-0,03364	-0,19245

EE: energia eletrônica; MD: momento dipolo; HOMO: orbital molecular de mais alta energia ocupado; LUMO: orbital molecular de mais baixa energia desocupado; Gap_{H-L}: diferença HOMO-LUMO.

Devido a sua maior eletronegatividade, regiões de moléculas com mais alta densidade eletrônica, como aquelas com ligações C-O, podem representar sítios com maior probabilidade de interações químicas em estudos de docagem molecular (ROCHA et al., 2018). Observa-se na Tabela 2, a presença de grupos OH e NH nas riparinas, indica a

possibilidade de formações de interações polares, principalmente ligações de H, conforme relatado previamente para estas moléculas (MAFUD et al., 2018).

Ainda na Tabela 5, são mostrados os resultados dos cálculos de energia dos orbitais moleculares HOMO e LUMO (E_{HOMO}, E_{LUMO} e energia de Gap_{H-L}) após a otimização molecular. Os valores de E_{HOMO} e E_{LUMO} variaram de -0,25023 a -0,21481 e -0,04798 a -0,02080, respectivamente. Quando a E_{HOMO} de uma molécula aumenta, maior é a sua capacidade de doar elétrons e quanto menor a E_{LUMO} maior será sua facilidade para aceitar elétrons. O maior E_{HOMO} e menor E_{LUMO} foram observadas para as RipD e F, respectivamente. Dessa forma, os orbitais moleculares analisados são bons descritores de reatividade global que exercem importante papel nas reações químicas e nas interações intermoleculares (SANTOS et al, 2014).

Para o Gap_{H-L}, os valores foram de -0,20992 a -0,16832 e RipD apresenta o maior valor, indicando uma maior estabilidade molecular. Moléculas com baixo valor de Gap_{H-L} podem ser altamente reativas. A RipE apresentou o menor valor apresentando e a melhor atividade antileishmania *in vitro*. Como discutido anteriormente, a lipossolubilidade foi um parâmetro de grande importância para tal atividade. Não foi encontrada correlação entre o valor de Gap_{H-L} e os valores de CI_{50} (r=0,4691).

A polarizabilidade é outro descritor global de reatividade molecular e avalia a disposição que a molécula tem de modificar sua distribuição eletrônica e deixar seus eletrons mais reativos. Tal descritor molecular pode ter grande importância na bioatividade de compostos antiparasitários (LUO et al., 2018). Os maiores valores foram encontrados para as Rip D e F (Tabela 5), mas não foi encontrada correlação entre a polarizabilidade e os valores de CI_{50} da atividade *in vitro* (r=0,3330).

As interações das riparinas A-F e pentamidina com 18 alvos moleculares de *L. major* foram analisadas através de estudos de docagem molecular. Os resultados foram organizados com base em parâmetros de afinidade das riparinas por alvos de *L. major* (Tabela 6). Comparando todas as moléculas avaliadas, as riparinas D, F e C apresentaram com maior frequência as menores energias de ligação com as proteínas avaliadas de *L. major*, com 6, 4 e 3 vezes, respectivamente.

Tabela 6. Parâmetros de afinidade de docagem molecular das riparinas em alvos de *Leishmania major*.

Ligante	ΔG lig (kcal/mol)	Ki (μM)	ΔG lig (kcal/mol)	Ki (μM)	ΔG lig (kcal/mol)	Ki (μM)
	*Lm*NMT		*Lm*LEI		*Lm*PDE1	
RIPA	-8,27	0,870	-7,52	3,06	-7,30	4,49
RIPB	-8,49	0,602	-8,62	0,478	-8,11	1,14
RIPC	-8,49	0,595	-7,87	1,70	-7,70	2,26
RIPD	-9,15	0,197	-9,08	0,220	-8,41	0,685
RIPE	-8,62	0,479	-8,08	1,19	-7,82	1,86
RIPF	-8,44	0,653	-8,66	0,448	-8,39	0,705
PENTA	-9,01	0,250	-7,08	6,41	-7,33	4,24
	*Lm*DOD		*Lm*METR		*Lm*TryS	
RIPA	-7,08	6,47	-7,04	6,92	-7,42	3,64
RIPB	-8,78	0,369	-7,29	4,52	-8,29	0,84
RIPC	-7,57	2,83	-7,84	1,80	-6,54	15,17
RIPD	-8,53	0,563	-7,33	4,22	-7,51	3,10
RIPE	-7,21	5,17	-7,79	1,96	-6,82	10,03
RIPF	-7,59	2,74	-7,50	3,19	-7,66	2,42
PENTA	-8,07	1,22	-7,74	2,12	-6,84	9,69
	*Lm*PTR1		*Lm*FGM		*Lm*OPB	
RIPA	-6,83	9,86	-7,43	3,60	-6,73	11,73
RIPB	-7,35	4,09	-7,04	6,87	-7,11	6,09
RIPC	-7,36	4,01	-7,92	1,57	-7,59	2,72
RIPD	-7,49	3,24	-6,52	16,69	-7,02	7,21
RIPE	-7,16	5,65	-8,11	1,13	-7,52	3,07
RIPF	-7,34	4,16	-5,83	53,14	-5,98	41,49
PENTA	-6,94	8,20	-7,0	7,33	-7,34	4,17
	*Lm*FH2		*Lm*LAP		*Lm*NH	
RIPA	-7,19	5,39	-6,36	21,71	-6,04	37,26
RIPB	-6,77	10,90	-7,01	7,31	-6,49	17,49
RIPC	-6,99	7,40	-6,57	15,39	-6,71	12,02
RIPD	-6,45	18,86	-7,25	4,88	-7,20	5,25
RIPE	-6,77	10,81	-6,71	12,0	-7,04	6,96
RIPF	-7,53	3,03	-7,12	6,02	-6,71	12,01
PENTA	-5,54	86,69	-6,15	31,07	-6,03	38,07
	*Lm*TPX		*Lm*CICLO		*Lm*PPX	
RIPA	-7,67	2,40	-6,19	28,82	-5,53	88,42
RIPB	-7,14	5,79	-6,69	12,46	-4,79	305,88
RIPC	-6,62	13,94	-5,87	49,94	-7,23	5,03
RIPD	-6,62	14,14	-6,29	24,66	-7,04	6,90
RIPE	-5,92	45,97	-5,94	44,56	-7,12	6,02
RIPF	-6,01	39,10	-6,79	10,57	-5,10	182,94
PENTA	-6,05	36,79	-5,49	94,19	-4,19	842,51
	*Lm*DUTP		*Lm*FBP		*Lm*rRNA	
RIPA	-6,72	11,90	-5,01	212,10	-4,73	339,57
RIPB	-5,99	40,64	-5,43	104,23	-5,01	181,88
RIPC	-6,24	26,64	-5,52	89,36	-4,83	286,56
RIPD	-6,29	24,71	-5,47	97,59	-4,92	247,98
RIPE	-6,14	31,67	-5,20	154,13	-5,00	216,34
RIPF	-5,01	214,32	-6,05	36,54	-5,08	187,95
PENTA	-5,11	180,92	-5,00	216,23	-4,76	323,49

ΔGlig: menor energia de ligação da interação ligante-macromolécula; Ki: constante de inibição obtida no Autodock.

As RipD e F apresentam as maiores E_{HOMO} e, portanto, a maior capacidade de doar elétrons. A RipC possui um baixo Gap_{H-L} e, dessa forma, boa reatividade molecular (Tabela 5). Dessa forma, os resultados de reatividade molecular destes descritores podem indicar uma possibilidade de maior interação ligante-macromolécula (PRABHU et al., 2017). A presença do grupo OH nas riparinas C, D, E e F parece ter forte influência na atividade antileishmania e atividade intrínseca destas moléculas (COSTA et al., 2016), havendo um aumento da potência *in vitro* e da sua reatividade molecular (Tabelas 1, 2 e 5).

Para a *Lm*NMT e *Lm*LEI, a RipD apresentou as menores constantes de inibição (0,197 e 0,220 μM, respectivamente). As moléculas foram capazes de formar ligações de H com importantes resíduos do sítio ativo de tais enzimas, formando estas ligações com os aminoácidos Met420, Val378, Leu421, Tyr92, Tyr217, Tyr326, Ile166, Tyr80, Asn167, Thr203 para a *Lm*NMT. A pentamidina formou ligações por ponte de hidrogênio com 4 resíduos e obteve o segundo melhor escore (0,250). Para a *Lm*LEI, houve formação destas ligações com Pro347, Gly352, His264, His268, Glu265, Ala225, Glu225 e Ala349, conforme Tabela 8.

Para as moléculas avaliadas por docagem molecular em *Lm*NMT, os valores de Ki são bem menores ou próximo a 1 μM e com resultados promissores e semelhantes aos observados por outras moléculas neste alvo (RIBEIRO et al., 2015; SINGH et al., 2016; GONCALVES et al., 2017). Nas Figuras 1 e 2 (MS1 a MS7), podem ser observadas as interações por ligações de H e interações hidrofóbicas das conformações de menor energia de todas as riparinas e pentamidina com *Lm*NMT. Com exceção de RipE, houve formação de 1 a 3 ligações de H entre os grupos C=O, N-H, C-O, O-H das riparinas com o aminoácido Met420. Tal resíduo faz parte de uma região adjacente ao sítio ativo do receptor e está envolvido em interações semelhantes a outros inibidores, envolvendo resíduos em comum, como Asn375, Phe90, Tyr217 e Tyr345 (GONCALVES et al., 2017). Podem ser observadas ainda interações do tipo hidrofóbicas com vários resíduos de Tyr que compoem o sítio ativo deste alvo (Tabela 8).

Para o alvo *Lm*LEI, é possível observar também valores de Ki bem próximos ou menores do que 1 μM, com exceção de RipA (Tabela 6). Foram formadas ligações de H com importantes resíduos do sítio ativo de tal macromolécula, principalmente His264 e His268, e numa região de grande importância na sua ação proteolítica (SCHLAGENHAUF; ETGES; METCALF, 1998). Resultados semelhantes foram encontrados para paromomicina e outros

inibidores em termos de energia de ligação neste receptor e com baixos valores de CI_{50} sobre formas promastigotas de *L. major* (KHAN et al., 2017).

Observando a Tabela 7, foi possível observar uma forte correlação positiva *in silico*/ *in vitro* apenas para *Lm*PPX, com R=0,8174. Outros alvos demonstram uma correlação moderada, *Lm*METR e *Lm*NH, porém com p>0,05. Tal tipo de correlação foi observada por outros autores em estudos *in vitro* de atividade antitumoral em receptores de fatores de crescimento (SAEED et al., 2015) e de atividade antileishmania em uma enzima do metabolismo de ácidos nucléicos (ANSARI et al., 2016). *Lm*PPX faz parte de uma via presente nos parasitas que possui uma crítica função para manutenção do metabolismo redox e sobrevivência intracelular (CHREIFI; DEJAM; POULOS, 2017). Dessa forma, esta forte correlação encontrada aliada a uma baixa variação de energia de ligação *Lm*PPX pode indicar mais um possível alvo para as riparinas.

Tabela 7. Correlação *in silico/ in vitro* entre Ki (µM) em alvos de *Leishmania major* e CI_{50} de atividade antileishmania.

Alvo	**r**	**Alvo**	**r**	**Alvo**	**r**
***Lm*NMT**	0,2244	*Lm*LEI	-0,1278	*Lm*PDE1	-0,03554
***Lm*DOD**	-0,4562	*Lm*METR	0,6678	*Lm*TryS	-0,7496
***Lm*PTR1**	0,03888	*Lm*FGM	0,04291	*Lm*OPB	0,05687
***Lm*FH2**	0,05959	*Lm*LAP	-0,1709	*Lm*NH	0,4425
***Lm*TPX**	-0,6910	*Lm*CICLO	-0,7372	*Lm*PPX	0,8174*
***Lm*DUTP**	-0,03557	*Lm*FBP	0,003721	*Lm*rRNA	-0,1588

r: coeficiente de correlação de Pearson. *p<0,05.

Figura 1. Interações moleculares das riparinas A-F e PENTA em LmNMT. A, B, C, D, E, F e G representam RipA, RipB, RipC, RipD, RipE, RipF e PENTA no sítio ativo de *Lm*NMT, respectivamente. Nota-se a estrutura global do complexo onde proteínas estão representadas na forma de superfície e ligante na forma de vareta. Observa-se ainda a ampliação da região de interação do ligante na proteína, onde as proteínas estão representadas na forma de fitas e ligante na forma de vareta.

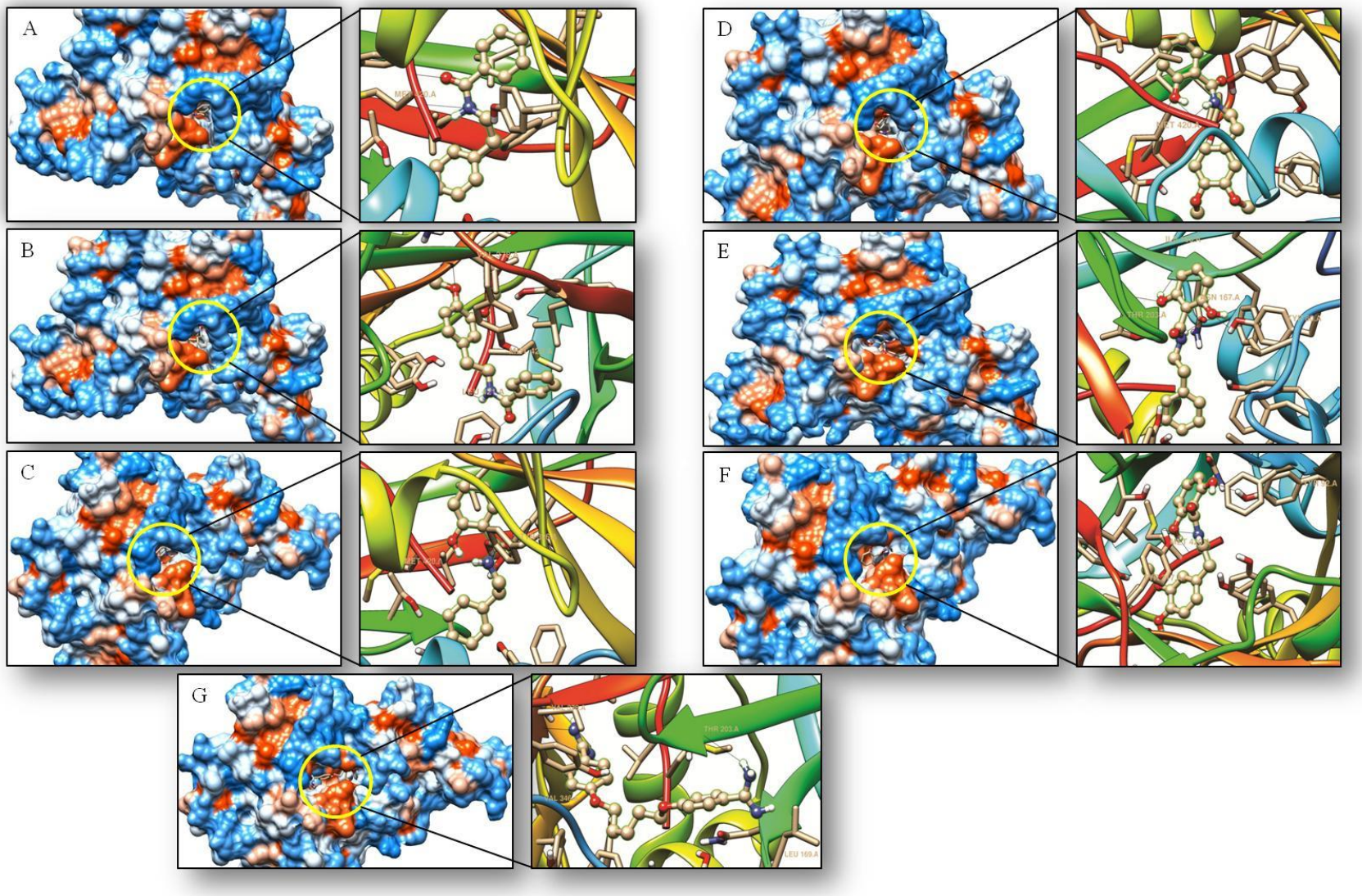


Tabela 8. Interações das riparinas obtidas pelo software Ligprot+ para as conformações escolhidas por docagem molecular em alvos de *Leishmania major*.

Ligante	Lig. de H	Interações hidrofóbicas	Lig. de H	Interações hidrofóbicas	Lig. de H	Interações hidrofóbicas
	*Lm*NMT		*Lm*LEI		*Lm*PDE1	
RIPA	Met420	Met377, Ile380, Tyr217, Asn383, Val378, Val346, Leu399, Tyr345, Tyr326, Asn376, Thr92, Leu421, Phe90	Pro347, Ala349	Gly222, Ala225, Leu224, Ala348, His264, Leu344, Val261, Glu343, Ala346, Ala350, Gly352	Gln887, Thr854	Val853, Gly886, Phe890, Met874, Leu883, Glu882, Asn881, Tyr858, Phe857
RIPB	Met420, Val378, Leu421, Tyr92	Met377, Ile380, Tyr217, Asn383, Val346, Leu399, Tyr345, Phe90, Gly205, Ala204, Tyr401, Val419	Pro347, Ala349, Gly352	Leu224, Ala225, Val261, Ala346, Ala348, Asp342, Arg260, His264, Leu257, Glu343, Gln341, Leu344, Ala350, Ala351	Gln887	Phe857, Gly886, Tyr858, Thr854, Met874, Val853, Val836, Ala850, Asn838, Phe890
RIPC	Met420, Tyr326	Met377, Ile380, Val378, Val346, Leu399, Tyr345, Thr92, Leu421, Phe90, Val419, Asn167, Tyr80	His264, His268, Glu265	Val261, Ala346, Ala348, Arg260, Glu343, Leu344, Ala350, His334, Gly329, Pro347, Ala349, Gly352	Leu883, Gly886, Gln887, Thr854	Asn881, Met874, Tyr858, Glu882, Val853, Ala850, Asn838, Phe890
RIPD	Met420	Met377, Ile380, Tyr217, Val378, Val346, Leu399, Tyr345, Tyr326, Thr203, Tyr92, Leu421, Phe90, Ala204, Val419, Tyr80, Val181	His264, His268, Gly352	Val261, Ala348, Arg260, Gln341, Ala350, Ala351, His334, Gly329, Pro347, Ala349, Glu265, Ser330, Ala346, Leu257, Leu344, Gln343	Leu883, Gly886, Gln887	Glu882, Thr854, Met874, Phe857, Phe890, Val836, Tyr680, Asp835, Ala850, Val839, Val853, Asn838
RIPE	Thr203, Ile166, Tyr80, Asn167	Tyr217, Tyr345, Tyr326, Leu421, Phe90, Ala204, Phe168, Leu169, Met420, Ileu328, Tyr92	His264, His268, Glu265, Pro347	Val261, Gly329, Ala346, His334, Ala349, Ala348, Ala350, Glu343, Arg260, Gly352	Gly886, Thr854, Gln887	Asn881, Tyr858, Me874, Leu883, Glu882, Val853, Phe890, Asn838, ala850, Phe857
RIPF	Tyr217, Met420	Tyr80, Leu421, Asn167, Thr203, Phe90, Leu399, Tyr345, Val378, Val346, Asn383, Tyr326, Tyr401, Ile380, Met377, Val419	Ala225, Glu265, Gly352	Val261, Arg260, Gly222, Leu224, Leu257, Ala349, His264, Ala346, Ala350, Leu344, Glu343, Gln341	Gln887, Gly886, Leu883, Glu882	Tyr858, Asn881, Thr854, Met874, Phe857, Val853, Phe890, Asn838, Val839
PENTA	Val346, Val378, Leu169, Thr203	Ileu380, Val419, Met420, Tyr345, Ileu328, Tyr92, Tyr217, Met377, Leu421, Tyr326, Tyr80, Phe90, Asn167	Ala350, Leu344, Ala225	Gly352, His264, Ala348, Arg260, Ala346, Ala349, Val261, Val223, Pro347, Gly222, Trp226, Leu224, Glu265	-	Asn838, Tyr680, Val853, Glu887, Phe857, Phe890, Thr854, Tyr858, Met874, Gly886, Glu882, Arg885, Asn881
	*Lm*DOD		*Lm*METR		*Lm*TryS	
RIPA	Asn68	Val22, Gln276, Tyr59, Val252, Thr273, Ser66, Val271, Gly223, Gly222, Gly272, Gly250, Cys249, Gln270, Gly251	Ser231, Gly484	Pro216, Ile487, Asp486, Tyr218, His228, Val483, His513, Trp515, Lys522, Gly227, Trp516, Ile523	Lys90, Tyr595, Trp497, Asp495	Asp496, Glu498, Gln5, Glu587, Arg450, Phe586, Leu585
RIPB	Tyr59, Thr273, Gly223, Gly251	Asn68, Gly21, Tyr253, Ala274, Ala19, Val22, Gln276, Val252, Ser66, Val271, Gly222, Gly272, Gly250, Cys249, Gln270	His228, Trp516	Tyr219, Ile217, Tyr218, Ile487, Gly484, Asp486, Lys522, Trp515, Ile523, Gly514, Gly227, Ser231, Tyr230, His513	Lys90, Tyr595, Trp497, His442, Arg450	Asp496, Glu498, Gln5, Glu587, Phe586, Leu585, Asp495, His543
RIPC	Gln270, Gly250, Gly223	Gly251, Val226, Ser196, Val271, Val252, Gly272, Ala274, Thr273, Cys249, Tyr253, Asn68, Ser66, Gly222, Ile194	Ser526, Lys525, His225	Ser335, Lys261, Ser524, Lys522, Ile523, Trp516, His513, Trp515, His228, Gly227	Glu498	Arg6, Tyr595, Tyr320, Gln5, His316, Phe586, Trp497, Arg450, Asp496
RIPD	Gln270, Gly250, Gly223, Ser66	Gly251, Val226, Ser196, Val271, Ala274, Thr273, Cys249, Asn68, Ile194, Gly222, Gly272, Val22, Gly222,	Trp516	Ile217, Tyr214, Pro216, Ile487, His228, Tyr218, Asp486, Gly514, Trp515, His513, Tyr230, Lys522,	Arg450	His316, Tyr595, Glu498, Gln5, Asp496, Leu585, Phe586, Glu587, His442

		Gln276, Tyr59, Leu221, Gly220		Gly227, His225, Ile523, Ile226		
RIPE	Ser196, Thr273	Gly250, Val226, Gly222, Gly223, Ser66, Ile194, Gly223, Asn195, Gly251, Gly272, Val22, Met70, Tyr59, Asn68, Gly21, Gln276	Lys525, His228, Asp486	Ile217, Tyr219, Tyr218, His225, Trp515, Ile487, Gly514, Lys522, Gly227, Ile523, Trp516	Gln5	Tyr595, His316, Arg450, Glu498, Asp496, Leu585, Phe586, Arg6
RIPF	Gly223, Asn195, Lys165, Gly250, Gly251, Gly223	Asn68, Ala20, Ser196, Val22, Ala19, Gly222, Thr273, Gln270, Gly272, Cys249, Tyr253, Val271, Val252	Tyr219, Lys525, Asp486	Ile217, Tyr218, Ile487, His228, Gly227, Trp515, Lys522, Trp515, Ile523, Gly514, His225, His513, Tyr230	Arg450, Lys590, Tyr595	Glu498, Gln5, Asp496, Leu585, Phe586, Glu587, His442, Asp495, Trp497
PENTA	Gly21, Val252	Asn68, Val22, Met60, Tyr59, Gly223, Gln276, Ser66, Gly222, Thr273, Gly272, Cys249, Gly250, Ala274, Val271, Gly251, Ala274	Trp516, Ile523, Ser231, Ser335, Ser526	His225, gly227, Trp515, His513, Lys522, Pro216, Asp486, His228, Tyr218, Gly484, Lys525, Tyr219, Lys261, Ser524	Gln5, Arg6, Glu498, Asp496, Asp495	Trp497, Phe586, Lys590, Tyr595, Tyr320
	*Lm*PTR1		*Lm*FGM		*Lm*OPB	
RIPA	Gly225	Pro224, Val180, Asp181, Met183, Thr184, Lys198, Tyr194, Ser111, Phe113, Leu188, Thr195, Gln186	Asp253, Gly122	Leu251, Gly58, Pro252, Arg59, Vai225, Ala117, Tyr61, Asp57, His223, Asn120, Tyr60, Pro259, Gly224, Gly224, Gly300, Gly123, Asp127	Ser577	Pro616, Glu621, Val665, Phe603, Ala578, Leu617, Arg664, Tyr499, His697, Tyr496
RIPB	Lys198, Ser227, Gly225, Tyr194	Phe113, Met179, Val180, Asn109, Pro224, Leu18, Leu226, Arg17, Asp181, Ser111	Asn120	Leu251, Arg59, Ala117, Tyr61, Asp57, Tyr60, Pro259, Gly300, Gly123, Asp127, Gly224, Ser118, Gly122, Phe128, Gly129	His697, Ser577, Asp662	Glu621, Val665, Phe603, Ala578, Leu617, Tyr499, Tyr496, Arg664, Arg576, Leu501
RIPC	Asp181, Ser227, Gly225	Pro224, Val180, Met183, Thr184, Tyr194, Leu188, Thr195, Gln186, Leu226, Pro187	Tyr60, Arg59, Gly122	Val225, Asn120, Gly300, Gly224, Ser118,Tyr61, Gly58, Asp57, Leu251, Asp253, His223	Ser577, Ala578, Tyr496	Val665, Tyr496, Arg664, Phe603, Pro616, Ile615, Leu617, Glu621, Thr609, Thr618, Met610
RIPD	Tyr194, Ser227, Lys198< Gly225	Val180, Pro224, Asn109, Phe113, Leu229, Val230, Asp181, Leu226, Ser111	Leu130, Lys131	Thr145, Phe34, Tyr132, Thr116, His119, Asp303, Ala140, Ala117, Asp301, Ser118	Arg664	Val665, Tyr496, Pro616, Ile615, Leu617, Glu621, Thr609, Met610, Phe603, Thr618, Ser577, Tyr499
RIPE	Gly225, Tyr194, Asp181	Pro224, Met183, Thr184, Pro187, Phe113, Leu188, Thr195, Val180, Gln186	Asn120, Arg59, Gly122, Tyr60	Ala117, Asp57, Gly224, Gly300, Ser118, Tyr61, Pro121, Leu251, Asp253, Gly58, His223, Val225	Glu621, His697, Ser577, Tyr499, Asp662	Tyr496, Phe603, Leu617, Val665, Glu669, Pro616, Thr609, Thr618, Arg664
RIPF	Ser227, Lys198	Arg17, Asn109, Leu226, Gly225, Pro224, Leu229, Leu18, Asp181, Phe113, Tyr194, Ser111, Val184	Tyr60, Gly122, Asp127	Gly123, Asp57, Arg59, Tyr61, Ser118, Asn120, Pro259, Gly129, Ala117, Phe128	Ser508, Tyr494, Gln713	Gln510, Glu574, Arg576, Leu598, Gly575, Gly600, Ala599, Gln657, Met655
PENTA	Met179, Val180, Lys198, Ala64, Asp65	Pro224, Leu18, Ser111, Asn109, Ala110, Leu66, Gly13, His38, His36	Tyr60, Ser118, His258, Asp253	Tyr61, Gly123, Ala117, Asp127, Asp57, Asn120, Arg59, Gly300, Gly224, His223, Pro259, Pro121, Gly122, Cys257	Thr618, Arg664, Tyr499, Ser577	Ile615, Pro616, Leu617, Glu621, Thr609, Phe603, Val665, His697, Tyr496, Arg576, Ala578, Phe698
	*Lm*FH2		*Lm*LAP		*Lm*NH	
RIPA	Pro452, Tyr174	Met538, Gly537, Lys454, Asn187, Trp542, Thr455, Ala453, Arg173	Lys311	Ala390, Leu420, Asp389, Lys299, Glu391, Asp304, Gly392, Thr421, Asp322, Ala515, Thr515, Thr321, Met319, Thr419	Asp14	Pro11, Asp10, Gln40, Gly12, Ile13, Asp15, His240, Met152, Asn168, Asp241, Asn241, Asn160, Phe167, Glu166
RIPB	Thr455, Pro452, Tyr174	Met538, Gly537, Lys454, Asn187, Trp542, Ala453, Arg173	Gly392	Thr321, Ala515, Met319, Thr419, Thr421, Asp322, Asp304, Lys311, Ala390, Glu391, Leu420, Lys298, Asp389, Arg393	Asn168, Asp15, Asn39, Gln40	Phe167, Glu166, Thr126, His240, Asp10, Asp241, Asp14, Val45, Gly12, Gly38, Pro11

RIPC	Pro466	Thr467, Lys491, Gly216, Gln134, Asp135, Cys346, Cys133, Gly515, Ser132, Asn121, Ala348, Leu118, Ser347, Trp98, Phe90	Asp389, Glu391, Lys299, Lys311, Leu420	Arg393, Ala390, Thr419, Thr321, Asp322, Ala515, Met319	Asp15, Asn39, Asp10	Phe167, Glu166, Thr126, His240, Asp241, , Val45, Gly12, Gly38, Pro11, Gln40, Asn168, Asn160, Met152
RIPD	Thr455	Lys454, Leu172, Tyr174, Arg173, Met538, Pro452, Gly537, Asn187	Asp322, Arg393	Met319, Thr321, Ala515, Tyr516, Lys299, Thr419, Asp304, Lys311, Leu420, Gly392, Asp389, Glu391, Ala390	Asn39, Asp10	Asp15, Gly38, Ile171, Pe170, Arg76, Phe167
RIPE	Gly216, Asp135, Lys491, Pro466	Arg421, Gln134, Thr467, Ala336, His334, Gly215, Ser217, Cys346, Cys133, Ser347, Cys252, Ala348, Gly515	Asp389, Glu391, Gly422, Leu420, Lys311	Ala390, Arg393, Thr421, Lys311, Asp322, Thr419, Ala515, Thr321, Met319	Asp15, Asn39, Asp10	Phe167, Glu166, Thr126, His240, Asp241, , Val45, Gly12, Gly38, Pro11, Gln40, Asn168, Asn160, Met152
RIPF	Tyr174, Met538, Pro452, Thr455	Gly537, Arg173, Lys454, Ala453	Arg393, Gly392, Glu391, Asp389	Leu420, Ala390, Thr421, Asp304, Asp322, Ala515, Lys299, Met319, Thr321, Thr419, Gly422, Tyr516	Asp241, Thr126, Asn168	Phe167, Glu166, His240, Asp10, Asp14, Gly12, Gln40, Asn160, Met152, Asp15, Ile13, Tyr225
PENTA	Leu118, Cys133, Thr468, Thr467	Ala122, Phe90, Trp98, Asn121, Ser132, Gly515, Ser347, Ala348, Gln134, Cys252, Lys491, Asp135, Cys346, Gly216	Lys311, Arg393, ALa314, Thr317	Tyr516, His315, Leu420, Met314, Ala515, Asp389, Gly422, Lys299, Glu391, Asp304, Ala390, Gly392	Asn168, Asn39, Gln40, Pro11	Glu166, Phe167, Asn160, His240, Gly12, Asp15, Asp241, Asp14, Val45, Asp10
	*Lm*TPX		*Lm*CICLO		*Lm*PPX	
RIPA	Cys52, Val51, Thr49, Phe50	Val172, Pro186, Arg128, Pro148, Met147, Gln123, Leu46, Val125	Phe74	Lys51, Pro52, His54, Lys56, Ser57, Val59, Asp73, Ser58, Gly77	Arg227	Arg226, Thr229, Asn148, Tyr228, Leu147, Tyr146
RIPB	Val51, Phe50, Cys52, Thr49	Pro45, Val172, Pro186, Met147, Arg128, Pro148, Gln123, Val125	Phe74	Lys51, Pro52, His54, Lys56, Ser57, Val59, Ser58, Gly77	Tyr228	Arg226, Thr229, Leu147, Tyr146, Asn231, Arg233, Ser207, Arg227
RIPC	Phe50, Thr49, Cys52	Pro45, Val172, Met147, Arg128, Gln123, Val125, Val51	Phe74, Ser 57	Pro52, His54, Lys56, Val59, Ser58, Asp73, Gly77	Ser207, Tyr228, Thr229, Arg227	Arg233, Asn231, Arg226, Asn148, Tyr146
RIPD	Phe50, Cys52, Thr49	Val172, Arg128, Val51, Leu46, Pro45, Tyr127, Val125, Gln123, Met147, Glu120, Asn9, Asp146	Arg165	Lys56, Ser57, Val59, Ser58, Gly77, His54, Phe74, Asp73	Arg227, Thr229, Ser207, Tyr228	Asn231, Arg233, Arg226, Leu147, Tyr146
RIPE	Thr49, Cys52	Val172, Phe50, Arg128, Val51, Pro45, Met147, Met147, Gln123, Leu46, Val125	Phe74, Ser57, Arg165	Lys51, Pro52, His54, Lys56, Val59, Asp73, Ser58, Gly77	Ser207, Tyr228, Thr229, Arg227	Arg233, Asn231, Arg226, Asn148, Tyr146
RIPF	Arg128, Met147, Phe50, Thr49, Cys52, Val55	Pro45, Pro186, Val172, Pro148, Val125, Gln123, Leu46	Phe74, His54, Lys56, Arg165	Pro52, Lys51, Ser57, Ser58, Asp73, Val59, Gly77	Arg227	Tyr146, Leu147, Tyr228, Thr229, Arg226
PENTA	Asp146, Arg140, Thr49, Arg128	Pro148, Pro186, Val172, Met147, Pro45, Leu46, Val125, Cys52, Phe50, Val51	Phe74, Pro52, Gly45, Gly42	Leu53, Lys46, His54, Lys51, Lys56, Ser57	Asn231, Ser207, Thr224,	Leu147, Tyr228, Asn148, Thr229, Arg233, Arg233, Arg226
	*Lm*DUTP		*Lm*FBP		*Lm*rRNA	
RIPA	Lys62, Lys59	Asn63, Trp58, Tyr56, Pro57, Asp54, Thr67, Ser55, Ala66, Asp69	-	Ile249, Tyr248, Arg247, Ala246, Ser216, Glu219, Tyr215, Val217	G8	A38, A39, A40, A41, G42
RIPB	Lys59, Asn63	Trp58, Lys62, Asp54, Asp69, Thr67, Pro57, Ser55, Tyr56, Ala66	Arg243, Leu236,	Tyr214, Tyr215, Ala246, Ser245, Lys237	G8, G42	A39, A40, A41, C7, U6, U43, G5
RIPC	Asp54	Asp69, Ser55, Ala66, Thr67, Tyr56, Lys62, Trp58, Asn63, Pro57, Lys59	Tyr248, Glu219	Asn218, Tyr215, Ala246, Arg247, Val217, Ser216	G8, G42, A41	A39, A40, U43
RIPD	Asp69, Asp54	Asn72, Ser55, Glu76, Glu51, Asn63, Ala66, Lys62, Pro57, Tyr56, Lys59, Trp58	Tyr244, Tyr215, Glu219	Ser245, Lys237, Leu236, Ala246, Asn218, Val217, Tyr248	G5, G8, G42	A39, A40, A41, C4, C7, U6, U43

RIPE	Trp58, Asp54, Asn63	Lys62, Asn72, ser55, Glu51, Pro57, Lys59, Tyr56	Tyr248	Ile249, Arg247, Tyr215, Ser215, Glu219, Ala246, Val217	G8, G42, A41	A39, A40, U43, C44
RIPF	Glu51, Asp54, Asn63	Asn72, Glu76, Ser55, Asp69, Ala66, Trp58, Tyr56, Pro57, Lys59	Leu236, Arg243, Tyr244, Ala246, Arg247	Lys237, Tyr215, Ser245	G5, G8, G42	C4, C7, A39, A41, U6, U43
PENTA	Lys179, Glu48, Arg186, Glu51, Asp54	Phe83, Asp79, Glu76, Glu76, Lys198, Glu204, Asn206, Asn72, Ser55	Glu219, Val217, Leu236, Tyr244	Asn218, Tyr248, Arg247, Ala246, Tyr215, Arg243, Lys237	G5, U6, A39, A40	G8, G42, U43, A41

Como citado anteriormente, outras atividades farmacológicas foram encontradas na literatura para as riparinas, incluindo atividade antiparasitária (MAFUD et al., 2018), antitumoral, antioxidante (NUNES et al., 2014) e antiinflamatória (SILVA et al., 2015), destacando, assim, o potencial que tais moléculas apresentam de interagir com importantes alvos moleculares em parasitas e no ser humano.

A partir do resultados da docagem molecular, pode-se destacar a potente ligação das riparinas a importantes alvos moleculares de *L. major* como *Lm*LEI e a *Lm*NMT, proteínas que funcionam como um importante fator de virulência para as leishmanias (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004) e para o metabolismo de proteínas (GONCALVES et al., 2017), respectivamente. Estas podem ser, portanto, potenciais alvos para a terapêutica antileishmania e futuros estudos incluindo simulação de dinâmica molecular, inibição protéica *in vitro*, elucidação estrutural do complexo ligante-receptor por cristalografia de raios X, assim como o desenvolvimento de uma formulação contendo as riparinas para o tratamento da leishmaniose podem ser realizados. Considerando o seu melhor rendimento no processo de síntese química, a riparina C (RipC) foi escolhida para a incorporação em um sistema microemulsionado e para tratamento tópico em modelo experimental de leishmaniose cutânea em camundongos Balb/c.

4. CONCLUSÃO

As riparinas A-F apresentaram uma potente ação citotóxica *in vitro* em formas promastigotas de *Leishmania major*, principalmente para RipC e RipE. As moléculas com maior atividade citotóxica contra o parasita, RipC e E, apresentaram IS de 7,22 e 12,90, respectivamente. As RipD e F apresentaram bons resultados de atividade antileishmania, porém com menor IS.

Quanto ao perfil ADME-Tox, as riparinas A-F apresentaram pequenas diferenças quanto a suas propriedades físico-químicas, principalmente para polaridade e solubilidade aquosa. Todas elas mostraram perfil adequado para *drug-likeness.* Além disso, os resultados indicaram ainda uma boa absorção oral, uma média a alta permeabilidade em células Caco-2 e algumas diferenças entre elas para os parâmetros de metabolismo, distribuição e toxicidade. O LogP foi um importante parâmetro para as diferenças encontradas de atividade antileishmania entre as moléculas, apresentando uma forte correlação estatística com tal atividade.

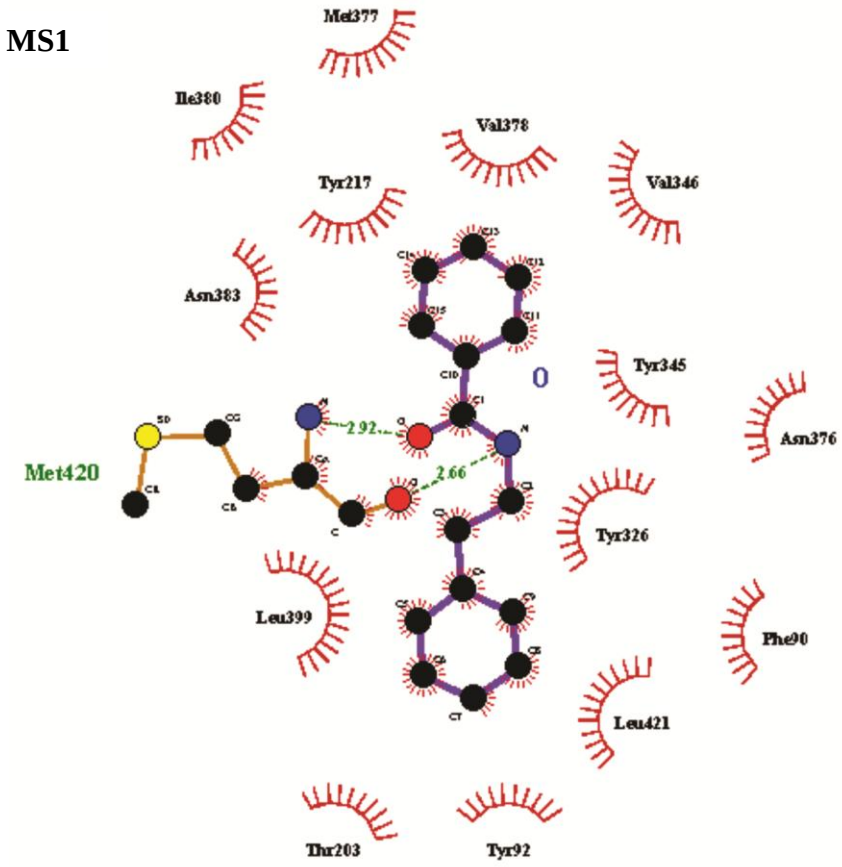
Nos estudos por docagem molecular das riparinas A-F em 18 alvos de *L. major*, tais ligantes apresentaram constantes de Ki <1 μM para *Lm*NMT e *Lm*LEI. Foram encontradas interações moleculares importantes em resíduos do sítio ativo e de regiões adjacentes de tais

enzimas, formando ligações de H com os aminoácidos Met420, Val378, Leu421, Tyr92, Tyr217, Tyr326, Ile166, Tyr80, Asn167, Thr203 para a *Lm*NMT e com Pro347, Gly352, His264, His268, Glu265, Ala225, Glu225, Ala349 para a *Lm*LEI.

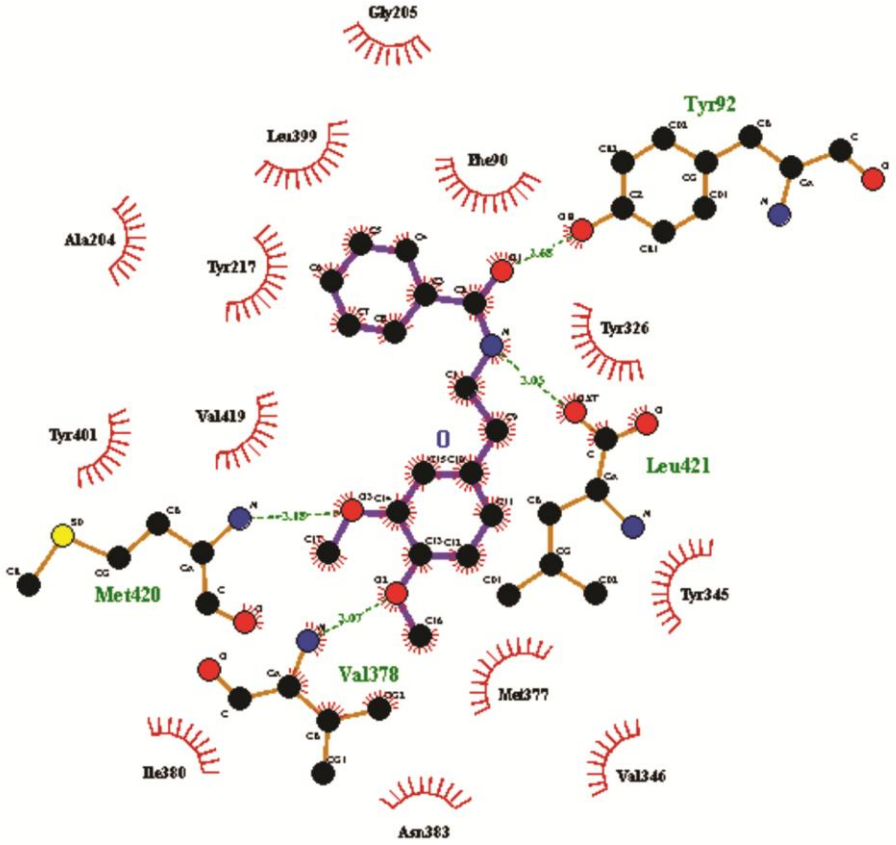
De posse de tais resultados, as riparinas apresentam um excelente potencial para aplicação na terapêutica antileishmania, principalmente para as riparinas C e E que apresentaram os melhores perfils de resultados *in silico* e *in vitro.* No entanto, para reforçar o papel destas riparinas como possíveis candidatas para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose, serão realizados outros estudos para corroborar tais achados. Considerando o seu melhor rendimento no processo de síntese química, a riparina C (RipC) foi escolhida para a incorporação em um sistema microemulsionado e para tratamento tópico em modelo experimental de leishmaniose cutânea em camundongos Balb/c.

MATERIAL SUPLEMENTAR

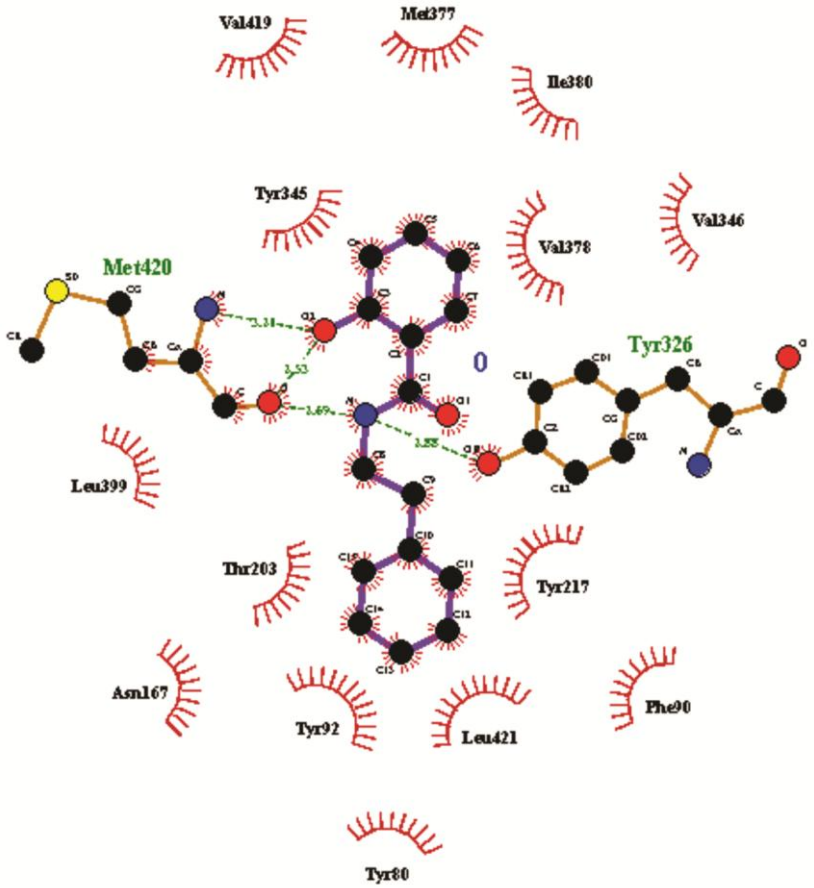
Figura 2. Diagramas Ligplot 2D que mostram as interações receptor-ligante por ligações de H e interações hidrofóbicas. MS1-MS6 e MS7 representam as riparinas A-F e Penta em *Lm*NMT, respectivamente.



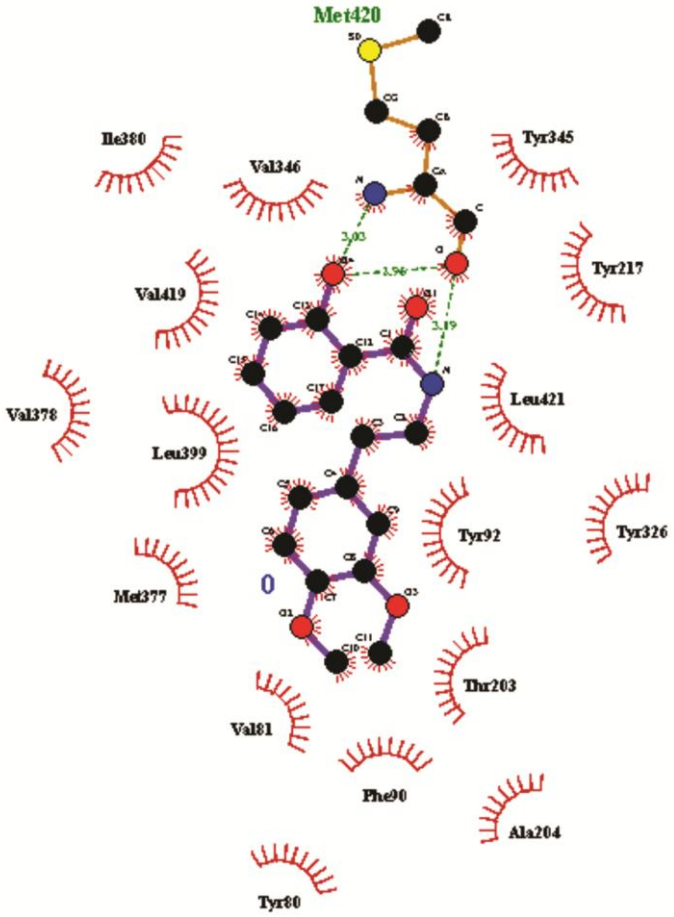
MS2


Gly205
Tyr92
Leu399
Phe90
Ala204
Tyr217
Tyr326
Val419
Tyr401
Leu421
Met420
Tyr345
Val378
Met377
Ile380
Val346
Asn383

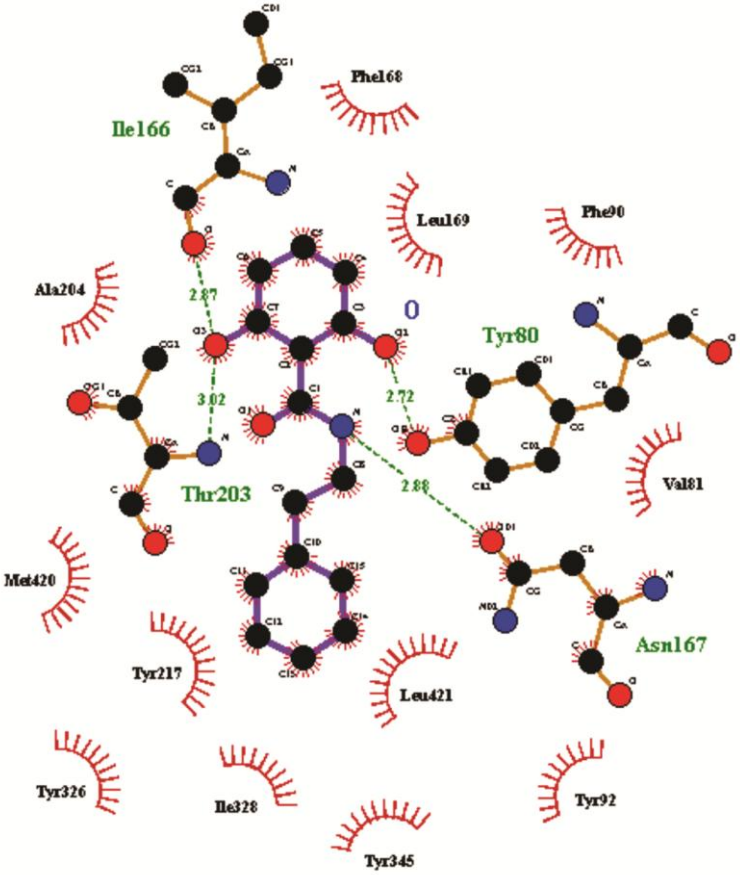
MS3


Val419
Met377
Ile380
Tyr345
Val346
Met420
Val378
Tyr326
Leu399
Thr203
Tyr217
Asn167
Tyr92
Leu421
Phe90
Tyr80

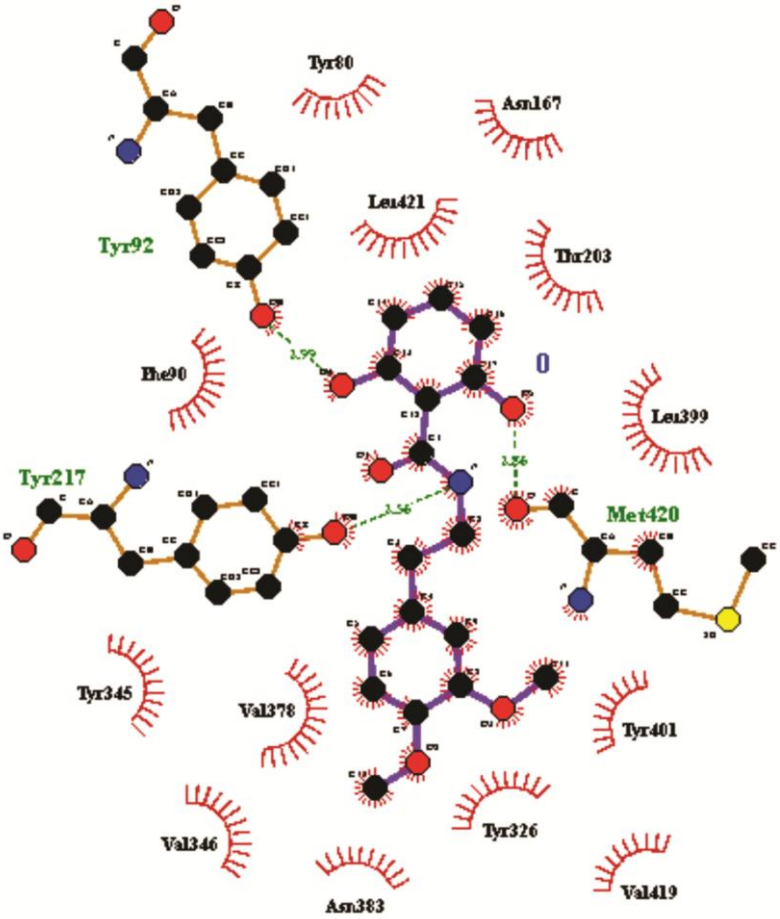
MS4


Met420
Ile380
Val346
Tyr345
Tyr217
Val419
Val378
Leu399
Leu421
Tyr92
Tyr326
Met377
Thr203
Val81
Phe90
Ala204
Tyr80

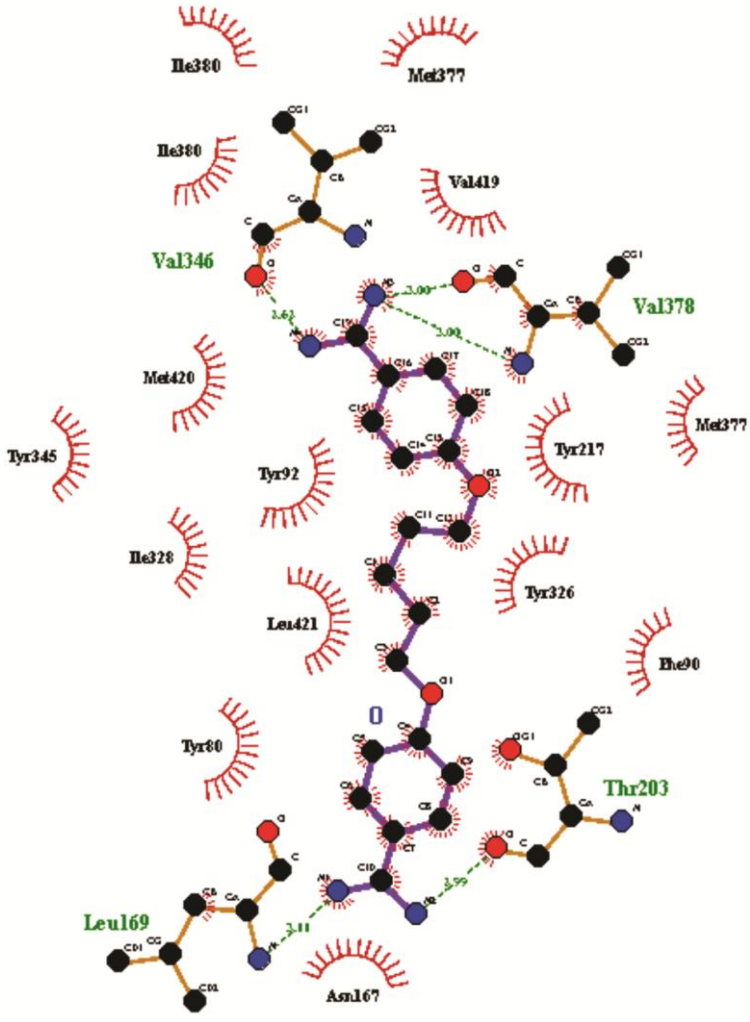
MS5


Phe168
Ile166
Leu169
Phe90
Ala204
Tyr80
Thr203
Val81
Met420
Asn167
Tyr217
Leu421
Tyr326
Ile328
Tyr92
Tyr345

MS6


Tyr80
Asn167
Leu421
Tyr92
Thr203
Phe90
O
Leu399
Tyr217
Met420
Tyr345
Val378
Tyr401
Val346
Tyr326
Asn383
Val419

MS7


Ile380
Met377
Val419
Val346
Val378
Met420
Tyr345
Tyr92
Tyr217
Met377
Ile328
Tyr326
Leu421
Phe90
O
Tyr80
Thr203
Leu169
Asn167

REFERENCIAS

ALHAZMI, M. I. Molecular docking of selected phytocompounds with H1N1 proteins. **Bioinformatics**. v. 11, p.196-202, 2015.

ANSARI, M. Y.; DIKHIT, M. R.; MANSURI, R.; RANA, S.; ALI, V.; SAHOO, G. C.; DAS, P. Establishment of correlation between in-silico and in-vitro test analysis against Leishmania HGPRT to inhibitors. **Int. J. Biol. Macromol**. v. 83, p.78, 2016.

ARAÚJO, F.L.; MELO, C.T.; ROCHA, N.F.; MOURA, B.A.; LEITE, C.P.; AMARAL, J.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.; VASCONCELOS, S.M.; VIANA, G.S.; DE SOUSA, F.C. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** v. 380, n. 4, p.337-344, 2009.

ARAUJO, É.J.F.; LIMA, L.K.F.; SILVA, O.A.; JÚNIOR, L.M.R.; GUTIERREZ, S.J.C.; CARVALHO, F.A.A.; LIMA, F.C.A.; PESSOA, C.; FREITAS, R.M.; FERREIRA, P.M.P. *In vitro* antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A, an analog of the Amazon alkamides from *Aniba riparia* (Lauraceae). **Acta Amaz**. v. 46, n. 3, p. 309-314, 2016.

ARAÚJO, E. J. F.; REZENDE-JÚNIOR, L. M.; LIMA, L. K. F.; SILVA-JÚNIOR, M. P. D.; SILVA, O. A.; SOUSA NETO, B. P., ALMEIDA, A. A. C.; GUTIERREZ, S. J. C.; TOMÉ, A. D. R.; LOPES, L. D. S.; FERREIRA, P. M. P.; LIMA, F. D. C. A. Pathophysiological investigations, anxiolytic effects and interaction of a semisynthetic riparin with benzodiazepine receptors. **Biomed. Pharmacother.** v.103, p.973-981, 2018.

ASHFORD, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **J. Parasitol.** v.30, n. 12-13, p.1269-1281, 2000.

BAKUNOVA, S. M.; BAKUNOV, S. A.; PATRICK, D. A; KUMAR, E. V. K. S.; OHEMENG, K. A.; BRIDGES, A. S.; WENZLER, T.; BARSZCZ, T.; JONES, S. K.; WERBOVETZ, K. A.; BRUN, R.; TIDWEL, R. R. Structure-activity study of pentamidine analogues as antiprotozoal agents. **J. Med. Chem**. v.52, p. 2016, 2009.

BALAKRISHNAN, N.; RAJ, J. S.; KANDAKATLA, N. *In silico* studies on new indazole derivatives as gsk-3β inhibitors. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.** v.7, n.3, p.295-299, 2015.

BELL, C. A.; HALL, J. E.; KYLE, D. E.; GROGL, M.; OHEMENG, K. A.; ALLEN, M. A.; TIDWELL, R. R. Structure-activity relationships of analogs of pentamidine against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania mexicana amazonensis*. **Antimicrob. Agents. Chemother.** v.34, p.1381, 1990.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res**. v.28, p.235-242, 2000.

BICKERTON, G. R.; PAOLINI, G. V.; BESNARD, J.; MURESAN, S.; HOPKINS. A. L. Quantifying the chemical beauty of drugs. **Nat. Chem**. v.4, p.90-98, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Farmacopéia Brasileira.** 5. ed. Anvisa: Brasília, 2010.

BUCKNER, F.S.; SCHWARTZ, E. Leishmaniasis. In **The Travel and Tropical Medicine Manual**; SANFORD, C.A., POTTINGER, P.S., JONG, E.C. Elsevier: USA, 2017; p. 501-512

CARNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F.A.; SANTANA, L.C.; SOUSA, A.P.; NETO; J.M.; CHAVES, M.H. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of A*adirachta indica* (A juss.). **Biol. Res.** v.45, n.2, p.111-116, 2012.

CARVALHO, A. M..; VASCONCELOS, L.F.; RIOS, E.R.; DIAS, M.L.; SILVA, M.I.; DE FRANÇA FONTELES, M.M.; FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.; DE SOUSA, F.C. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methil-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chem. Biol. Interact**. v.205, p.165-172, 2013.

CATÃO, R. M. R. BARBOSA-FILHO, J.M.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; SILVA, M.A.R.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.N.P. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus.* **Rev. Bras. Anál. Clín**. v. 42, n. 9-14, 2010.

CHREIFI, G.; DEJAM, D.; POULOS, T. L. Crystal structure and functional analysis of *Leishmania major* pseudoperoxidase. **J. Biol. Inorg. Chem**. v. 22, p.919-927, 2017.

COSTA, L. M,; DE MACEDO, E. V.; OLIVEIRA, F. A.; FERREIRA, J. H.; GUTIERREZ, S. J.; PELÁEZ, W. J.; LIMA, F. C.; DE SIQUEIRA, JÚNIOR J. P.; COUTINHO, H. D.; KAATZ, G. W.; DE FREITAS, R. M.; BARRETO, H. M.. Inhibition of the nora efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. **J. Appl. Microbiol.** v.121, p. 1312-1322, 2016.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci. Rep.** v.7, p.42717, 2017.

DENNINGTON, R. D.; KEITH, T. A.; MILLAN, J. M. GaussView, v. 5.0.8, Semicchem, Inc.: Shawnee KS, 2008.

DI GIORGIO, C.; DELMAS, F.; FILLOUX, N.; ROBIN, M.; SEFERIAN, L.; AZAS, N.; GASQUET, M.; COSTA, M.; TIMON-DAVID, P.; GALY, J. P. *In vitro* activities of 7-substituted 9-chloro and 9-amino-2-methoxyacridines and their bis- and tetra-acridine complexes against *Leishmania infantum.* **Antimicrob. Agents Chemother.** v.47, p.174-180, 2003.

DI GIORGIO, C.; DELMAS, F.; OLLIVIER, E.; ELIAS, R.; BALANSARD, G.; TIMON-DAVID, P. *In vitro* activity of the beta-carboline alkaloids harmane, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. **Exp. Parasitol.** v.106, p.67-74, 2004.

DUARTE, M. C.; TAVARES, G.S.; VALADARES, D.G.; LAGE, D.P.; RIBEIRO, T.G.; LAGE, L.M.; RODRIGUES, M.R.; FARACO, A.A.; SOTO, M.; DA SILVA, E.S.; CHÁVEZ FUMAGALLI, M.A.; TAVARES, C.A.; LEITE, J.P.; OLIVEIRA, J.S.; CASTILHO, R.O.; COELHO, E.A. Antileishmanial activity and mechanism of action from a purified fraction of *Zingiber officinalis* roscoe against *Leishmania amazonensis*. **Exp. Parasitol.** v.166, p.21-28, 2016.

ESTEVEZ, Y.; QUILIANO, M.; BURGUETE, A.; CABANILLAS, B.; ZIMIC, M.; MÁLAGA, E.; VERÁSTEGUI, M.; PÉREZ-SILANES, S.; ALDANA, I.; MONGE, A.; CASTILLO, D.; DEHARO, E. Trypanocidal properties, structure-activity relationship and computational studies of quinoxaline 1,4-di-n-oxide derivatives. **Exp. Parasitol.** v.127, p.745-751, 2011.

FILIMONOV D.A., LAGUNIN A.A., GLORIOZOVA T.A., RUDIK A.V., DRUZHILOVSKII D.S., POGODIN P.V., POROIKOV V.V. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource. **Chem. Heterocycl. Compd**. v.50, p.3, p.444-457, 2014.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R. Gaussian09, Revision C.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2010.

GARCIA, D. C.; PEREIRA, A. C.; GUTIERREZ, S. J.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LEMOS, V. S.; CÔRTES, S. F. Structure-related blockage of calcium channels by vasodilator alkamides in mice mesenteric artery. **Vasc. Pharmacol.** v.82, p.60-65, 2016.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Interative partial equalization of orbital electronegativity da rapid access to atomic charges. **Tetrahedron.** v.36, p.3219-3228, 1980.

GLEESON, M. P. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. **J. Med. Chem.** v.51, p.817-834, 2008.

GLEESON, M. P., HERSEY, A., MONTANARI, D.; OVERINGTON, J. Probing the links between in vitro potency, admet and physicochemical parameters. **Nat. Rev. Drug Discov.** v.10, p.197-208, 2011.

GONCALVES, V.; BRANNIGAN, J. A.; LAPORTE, A.; BELL, A. S.; ROBERTS, S. M.; WILKINSON, A. J.; LEATHERBARROW, R. J.; TATE, E. W. structure-guided optimization of quinoline inhibitors of *Plasmodium* N-myristoyltransferase. **Medchemcomm**. v.8, p.191-197, 2017.

GRIMALDI, J. R.; G.; TESH, R. B. Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.** v.6, p.3, p.230-250, 1993.

GURUNGA, A. B.; BHATTACHARJEEA, A.; ALI, M. A. Exploring the physicochemical profile and the binding patterns of selected novel anticancer himalayan plant derived active compounds with macromolecular targets. **Inform. Med. Unlocked.** v.5, p.1-14, 2016.

GUTIERREZ, S. J. C. Synthesis of Bowdenol, a dihydrobenzofuranoid isolated from *Bowdichia virgilioides* and preparation of derivatives of Riparina isolated from *Aniba riparia* with potential biological activity. 134f. (Tese) Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. UFPB/CCS. João Pessoa-PB, 2007.

HADDA, T. B.; ALI, M. A.; VASAND, M.; GHARBY, S.; FERGOUG, T.; WARAD, I. Tautomeric origin of dual effects of *N*1-nicotinoyl-3-(4′-hydroxy-3′-methyl phenyl)-5-[(sub)phenyl]-2-pyrazolines on bacterial and viral strains: POM analyses as new efficient bioinformatics' platform to predict and optimize bioactivity of drugs. **Med. Chem. Res.** v.22, p.1438-1449, 2013.

IRVINE, J. D.; TAKAHASHI, L.; LOCKHART, K.; CHEONG, J.; TOLAN, J.W.; SELICK, H.E.; GROVE, R. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. **J. Pharm. Sci.** v.88, p.28-33, 1999.

JARRAHPOUR, A.; MOTAMEDIFAR, M.; ZAREI, M.; YOUSSOUFI, M.H; MIMOUNI, M.; CHOHAN, Z.H.; BEN HADDA, T. Petra, Osiris, and Molinspiration together as a guide in drug design: predictions and correlation structure/antibacterial activity relationships of new n-sulfonyl monocyclic β-lactams. **Phosphorus, Sulfur. Silicon. Relat. Elem.** v.185, p.1563-5325, 2010.

JIN, X.; LUONG, T.L; REESE, N.; GAONA, H., COLLAZO-VELEZ, V.; VUONG, C.; POTTER, B.; SOUSA, J.C.; OLMEDA, R.; LI, Q.; XIE, L.; ZHANG, J.; ZHANG, P.; REICHARD, G.; MELENDEZ, V.; MARCSISIN, S.R; PYBUS, B.S. Comparison of MDCK-MDR1 and Caco-2 cell based permeability assays for anti-malarial drug screening and drug investigations. **J. Pharmacol. Toxicol. Meths.** v.70, p.188-194, 2014.

KADAN, R.U.; ROY, N. Recent trends in drug likeness prediction: a comprehensive review of in silico methods. **Indian J. Pharm. Sci**. v.69, p.609-615, 2007.

KEDZIERSKI, L.; SAKTHIANANDESWAREN, A.; CURTIS, J.M.; ANDREWS, P.C.; JUNK, P.C.; KEDZIERSKA, K. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. **Curr. Med. Chem**. v.16, p.599-614, 2009.

KHAN, H.; NADHMAN, A.; AZAM, S. S.; ANEES, M.; KHAN, I.; ULLAH, I.; SOHAIL, M.F.; SHAHNAZ, G.; YASINZAI, M. *In-vitro* antileishmanial potential of peptide drug hirudin. **Chem. Biol. Drug Des**. v.89, p.67-73, 2017.

KHAN, T.; AHMAD, R.; AZAD, I.; RAZA, S.; JOSHI, S.; KHAN, A.R. Computer-aided drug design and virtual screening of targeted combinatorial libraries of mixed-ligand transition metal complexes of 2-butanone thiosemicarbazone. **Comput. Biol. Chem**. v.75, p.178-195, 2018.

KOVAČEVIĆ, S. Z.; JEVRIĆ, L. R.; KUZMANOVIĆ, S. O. P.; LONČAR, E. S. Prediction of *In-silico* ADME properties of 1,2-O-isopropylidene aldohexose derivatives. **Iran J. Pharm. Res.** v.13, p.899-907, 2014.

LAGORCE, D.; SPERANDIO, O.; GALONS, H.; MITEVA, M.A.; VILLOUTREIX, B.O. FAF-Drugs4: free ADME-tox filtering computations for chemical biology and early stages drug discovery. **Bioinformatics**. v.33, p.3658-3660a, 2017a

LAGORCE, D.; DOUGUET, D.; MITEVA, M. A.; VILLOUTREIX, B. O. Computational analysis of calculated physicochemical and ADMET properties of protein-protein interaction inhibitors**. Sci. Rep**. v.7, p.46277, 2017b.

LAGUNIN, A.; ZAKHAROV, A.; FILIMONOV, D.; POROIKOV, V. QSAR modelling of rat acute toxicity on the basis of PASS prediction. **Mol. Informat**. v.30, p.241-250, 2011.

LAHIRY, S.; DAS, A.K.; DAS, S.N.; MANNA, M. Ethanolic leaf extract of Coccinia grandis is effective against both drug resistant and drug sensitive clinical isolates of Indian Kala-azar**. J. Parasit. Dis.** v.2, p.433-441, 2018.

LEE, S.K.; CHANG, G.S.; LEE, I.H.; CHUNG, J.E.; SUNG, K.Y.; NO, K.T. The PreADME: PC-based program for batch prediction of adme properties. **EuroQSAR**. v. 9, p.5-10, 2004.

LIPINSKI, C. A. Rule of fve in 2015 and beyond: Target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project decisions. **Adv. Drug Deliv. Rev**. v.101, p.34-41, 2016.

LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev**. v.46, p.3-26, 1997.

LOVERING, F., BIKKER, J.; HUMBLET, C. Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. **J. Med. Chem**. v.52, p.6752-6756, 2009.

LUO, J.; LAI, T.; GUO, T.; CHEN, F.; ZHANG, L.; DING, W.; ZHANG, Y. Synthesis and acaricidal activities of scopoletin phenolic ether derivatives: QSAR, molecular docking study and in silico ADME Predictions. **Molecules**. v.23, n. 5, E995, 2018.

MA, X.; CHEN, C.; YANG, J. Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds. **Acta Pharmacol. Sinica**. v.26, p.500-512, 2005.

MAFUD, A.C.; SILVA, M.P.N.; NUNES, G.B.L.; OLIVEIRA, M.A.R.; BATISTA, L.F.; RUBIO, T.I.; MENGARDA, A.C.; LAGO, E.M.; XAVIER, R.P.; GUTIERREZ, S.J.C.; PINTO, P.L.S.; SILVA FILHO, A.A.; MASCARENHAS, Y.P; DE MORAES, J. Antiparasitic, structural, pharmacokinetic, and toxicological properties of riparin derivatives. **Toxicol. in vitro.** v.50, p.1-10, 2018.

MAMIDALA, R. Identification of Leishmania donovani topoisomerase 1 inhibitors via intuitive scaffold hopping and bioisosteric modification of known Top 1 inhibitors. **Sci. Rep**. v.20, p.28120, 2016.

MAQUIAVELI, C.C.; LUCON-JUNIOR, J.F.; BROGI, S.; CAMPIANI, G.; GEMMA, S.; VIEIRA, P.C., SILVA, E.R. Verbascoside inhibits promastigote growth and arginase activity of *Leishmania amazonensis.* **J. Nat. Prod.** v.79, p.1459-1463, 2016.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunol. Rev.** v.201, p.206-224, 2004.

MILADIYAH, I.; JUMINA, J.; HARYANA, S. M.; MUSTOFA, M. Biological activity, quantitative structure–activity relationship analysis, and molecular docking of xanthone derivatives as anticancer drugs. **Drug Design Develop. Ther.** v.12, p.149-158, 2018.

MISHRA, H.; SINGH, N.; LAHIRI, T.; MISRA, K. A comparative study on the molecular descriptors for predicting drug-likeness of small molecules. **Bioinformation**. v.3, n.9, p.384-388, 2009.

MOORE, J.D.; POTTER, A. Pin1 inhibitors: Pitfalls, progress and cellular pharmacology. **Bioorg. Med. Chem. Lett**. v.23, n.15, p.4283-4291, 2013.

MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **J. Computat. Chem.** v. 19, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexiblity. **J. Comput. Chem.** v.16, p.2785-2791, 2009.

NUNES, G.B.L. COSTA, L.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; NUNES, L.C.C.; FREITAS, R. M. Prospecção científica e tecnológica da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). **Cad. Prospec.** v.6, p.447-458, 2013.

NUNES, G.B.L. Preclinical evaluation and bioprospecting of products derived from riparines.2014. 143f. (Tese) Doutorado Rede Nordeste de Biotecnologia - Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI.

NUNES, G.B.L.; POLICARPO, P.R.; COSTA, L.M.; DA SILVA, T.G.; MILITÃO, G.C.; CÂMARA, C.A.; BARBOSA FILHO J.M.; GUTIERREZ, S.J.; ISLAM, M.T.; DE FREITAS, R.M. *In vitro* antioxidant and cytotoxic activity of some synthetic riparin-derived compounds. **Molecules.** v.19, p.4595-4607, 2014.

OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity. EUA: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2001.

PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C.; FERRIN, T.E. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem**. v.25, p.1605-1612, 2004.

PIHAN, E.; COLLIANDRE, L.; GUICHOU, J.F.; DOUGUET, D. e-Drug3D: 3D structure collections dedicated to drug repurposing and fragment-based drug design. **Bioinformatics**. v.1, p.1540-1541, 2012.

PRABHU, S.V.; TIWARI, K.; SURYANARAYANAN, V.; DUBEY, V.K.; SINGH, S.K. Exploration of new and potent lead molecules against CAAX prenyl protease I of *Leishmania donovani* Through Pharmacophore Based Virtual Screening Approach. **Comb. Chem. High Throughput Screen.** v.20, p.255-271, 2017.

PROUDFOOT, J. R. Drugs, leads, and drug-likeness: an analysis of some recently launched drugs. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.12, p.1647-1650, 2002.

PRZYBYLAK, K. R.; ALZAHRANI, A. R.; CRONIN, M. T. How does the quality of phospholipidosis data influence the predictivity of structural alerts? **J. Chem. Inf. Model.** v.54, p.2224-2232, 2014.

RAMOS, R. M.; PEREZ, J. M.; BAPTISTA, L. A.; DE AMORIM, H. L. Interaction of wild type, G68R and L125M isoforms of the arylamine-N-acetyltransferase from *Mycobaerium tuberculosis* with isoniazid: a computational study on a new possible mechanism of resistance. **J. Mol. Mod.** v.18, p.4013-4024, 2012.

ROCHA, J.A.; REGO, N.C.S.; CARVALHO, B.T.S.; SILVA, F.I.; SOUSA, J.A.; RAMOS, R.M.; PASSOS, I.N.G.; DE MORAES, J.; LEITE, J.R.S.A.; LIMA, F.C.A. Computational

quantum chemistry, molecular docking, and ADMET predictions of imidazole alkaloids of Pilocarpus microphyllus with schistosomicidal properties. **PLoS One.** v.13, e0198476, 2018.

SAEED, M.E.; KADIOGLU, O.; SEO, E.J.; GRETEN, H.J.; BRENK, R.; EFFERTH, T. Quantitative structure-activity relationship and molecular docking of artemisinin derivatives to vascular endothelial growth factor receptor 1. **Anticancer Res.** v.35, p.1929-1934, 2015.

SANNER, M. F. Python: a programming language for software integration and development. **J. Mol. Graph. Model**. v.17, p.57-61, 1999.

SANTIAGO, R.F. Riparin B, a synthetic compound analogue of riparin, inhibits the systemic inflammatory response and oxidative stress in mice. **Inflammation**. v. 38, p.2203-2215, 2015.

SANTOS, C. B. R. S.; LOBATO, C. C.; SOUSA, M. A. C.; MACÊDO, W. J. C; CARVALHO, J. C. T. Molecular modeling: origin, fundamental concepts and applications using Struture-Activity Relationship and Quantitative Struture-Activity Relationship. **Rev. Theor. Sci.** v. 2, p.91-115, 2014.

SCHLAGENHAUF , E.; ETGES, R.; METCALF, P. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). **Structure**. v.6, p.1035-1046, 1998.

SCOTTI, L.; ISHIKI, H.; MENDONÇA JÚNIOR, F. J.; DA SILVA, M. S.; SCOTTI, M. T. *In-silico* analyses of natural products on leishmania enzyme targets. **Mini Rev. Med. Chem.** v.15, p.253, 2015.

SILVA, R.O.; DAMASCENO, S.R..; SILVA, I.S.; SILVA, V.G.; BRITO, C.F.; TEIXEIRA, A.E.; NUNES, G.B.; CAMARA, C.A.; FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H.; BARBOSA, A.L.; FREITAS, R.M.; MEDEIROS, J.V. Riparin A, a compound from Aniba riparia, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chem. Biol. Interact.** v.5, p.55-63, 2015.

SILVA, V.B.; KAWANO, D.F.; GOMES ADA, S.; CARVALHO, I.; TAFT, C.A.; DA SILVA, C.H. Molecular dynamics, density functional, ADMET predictions, virtual screening, and molecular interaction field studies for identification and evaluation of novel potential CDK2 inhibitors in cancer therapy. **J. Phys. Chem. A**. v.112, p.8902-8910, 2008.

SINGH, N.; SHAH, P.; DWIVEDI, H.; MISHRA, S.; TRIPATHI, R.; SAHASRABUDDHE, A.A.; SIDDIQI, M. I. Integrated machine learning, molecular docking and 3D-QSAR based approach for identification of potential inhibitors of trypanosomal N-myristoyltransferase. **Mol. Biosyst.** v.12, p.3711-3723, 2016.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; MCKEE, V.; ULLAH, H. Synthesis, spectroscopic characterization and in vitro antimicrobial, anticancer and antileishmanial activities as well interaction with Salmon sperm DNA of newly synthesizedcarboxylic acid derivative, 4-(4-methoxy-2-nitrophenylamino)-4-oxobutanoic acid. **Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.** v.138, p.569-578, 2018.

SODERO, A. C.; DOS SANTOS, A. C.; MELLO, J. F.; DE JESUS, J. B.; DE SOUZA, A. M.; RODRIGUES, M. I.; DE SIMONE, S. G.; RODRIGUES, C. R.; DE MATOS GUEDES, H. L. Oligopeptidase B and B2: comparative modelling and virtual screening as searching tools for new antileishmanial compounds. **Parasitology.** v.144, p.536, 2017.

SOLIS, F. J.; WETS, R. J. B. Minimization by random search techniques. **Math. Operat. Res**. v. 6, p.19-30, 1981.

THOMAS, G.; BRANCO, U. J.; BARBOSA FILHO, J.M.; BACHELET, M.; VARGAFTIG, B.B. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl-)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl)tyramine, a constituent of Aniba riparia (Nees) Mez. (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea-pig alveolar leucocytes. **J. Pharm. Pharmacol.** v.46, p.103-107, 1994.

UDDIN, N.; SIRAJUDDIN, M.; UDDIN, N.; TARIQ, M.; ULLAH, H.; ALI, S.; TIRMIZI, S.A.; KHAN, A. R. Synthesis, spectroscopic characterization, biological screenings, DNA binding study and POM analyses of transition metal carboxylates. **Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.** v.5, p.563-574, 2015.

VASCONCELOS, A.S.; OLIVEIRA, I.C.; VIDAL, L.T.; RODRIGUES, G.C.; GUTIERREZ, S.J.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, S.M.; DE FRANÇA FONTELES, M.M.; GASPAR, D.M.; DE SOUSA, F.C. Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. **Fundam. Clin. Pharmacol.** v.29, p.394-403, 2015.

VICKERS, T. L.; BEVERLEY, S. M. Folate metabolic pathways in *Leishmania.* **Essays Biochem.** v.51, p.63-80.

WALLACE, A.C.; LASKOWSKI, R.A.; THORNTON, LIGPLOT, J.M. A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Eng.** v. 8, p.127-134, 1996.

WARING, M. J. Lipophilicity in drugs discovery. **Exp. Opinion Drug Discov.** v.5, n.3, p.235-248, 2010.

WOODRING, J.L.; BACHOVCHIN, K.A.; BRADY, K.G.; GALLERSTEIN, M. F.; J.; TANGHE, S.; LEED, S.E.; RODRIGUEZ, A.; MENSA-WILMOT, K.; SCIOTTI R.J.; POLLASTRI, M.P. Optimization of physicochemical properties for 4-anilinoquinazoline inhibitors of trypanosome proliferation. **Eur. J. Med. Chem**. v.1, p.446-459, 2017.

WHO. World Health Organization. Control of the Leishmaniases. WHO Technical Report Series, Geneva, Switzerland, 2010.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Wkly. Epidemiol. Rec**. v.91, p.285-296, 2016.

YAMASHITA, S.; FURUBAYASHI, T.; KATAOKA, M.; SAKANE, T.; SEZAKI, H.; TOKUDA, H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. **Eur. J. Pharm. Sci**. v.10, p.195-204, 2000.

YEE, S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. **Pharm. Res.** v.14, p.763-766, 1997.

6. CAPÍTULO III

MICROEMULSÃO CONTENDO RIPARINA C PARA TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA: OBTENÇÃO, CONTROLE DE QUALIDADE E ATIVIDADE ANTILEISHMANIA *IN VIVO*

(Artigo a ser submetido ao periódico **Drug development and industrial pharmacy** - Qualis B1, Fator de Impacto JCR 2016 = 2,295)

Microemulsão contendo riparina C para tratamento da leishmaniose cutânea: obtenção, controle de qualidade e atividade antileishmania *in vivo*

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi realizar a obtenção de uma microemulsão (ME) contendo riparina C (RipC) para o tratamento da leishmaniose cutânea através da administração tópica. Para a obtenção das formulações, diagramas de fase pseudoternários foram obtidos através de uma mistura a frio e sob agitação moderada de Polissorbato 80, Transcutol®, miristato de isopropila e água purificada. Foi realizada a caracterização físico-química e avaliada a estabilidade preliminar das formulações. Validou-se uma metodologia analítica por espectrofotometria em UV λ=300 nm. Foi avaliada a cinética de liberação *in vitro* (em modelo de Franz) das formulações. ME1-RipC e ME2-RipC apresentaram tamanho de gotícula e potencia zeta (mV) de 68,63±3,42 e 18,73±0,35 nm, -7,55±2,10 e -28,33±2,54 mV, respectivamente. As formulações se mantiveram estáveis nos ensaios de estabilidade preliminar. A metodologia analítica demonstrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto, além disso as formulações apresentaram bons perfis de cinética de liberação *in vitro* em células de difusão tipo Franz. Tais formulações foram capazes de permear a pele da região dorsal de camundongos Balb/c, com destaque para ME2-RipC. No estudo de atividade antileishmania *in vivo*, as formulações foram capazes de retardar o desenvolvidos das lesões leishmanióticas e a frequência de ulceração em relação aos grupos controles, com $p<0,05$ apenas para ME2-RipC e AMB3%. ME1-RipC, ME2-RipC e AMB3% foram capazes de reduzir de forma estatisticamente significativa a carga parasitária nas lesões. Foi observado a ausência de toxicidade do tratamento proposto para o parâmetros avaliados de peso, hematócrito, função renal e hepática e ausência de sinais clínicos de toxicidade aguda. Desta forma, as ME contendo RipC obtidas tem potencial para aplicação tópica, podendo compor um sistema de liberação de fármacos para o tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: Leishmanioses; *Aniba riparia*; Sistemas microemulsionados; Nanotecnologia.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) destaca as leishmanioses como uma das seis principais doenças infecciosas com alta incidência e capacidade de produzir deformidades e com prevalência global de 12 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2016). É uma doença endêmica em mais de 90 países em todo o mundo e afeta principalmente a população pobre na África, Ásia e América Latina. Está associada com desnutrição, migração populacional, moradias precárias e sistema imunológico comprometido (ISLAMUDDIN et al., 2014). Estima-se de 0,9 a 1,3 milhões de novos casos e que cerca de 20.000 a 30.000 mortes ocorram anualmente devido as leishmanioses (ISLAMUDDIN et al., 2015).

A infecção por parasitas do gênero *Leishmania* causa um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo as formas subclínica (inaparente), localizada (lesões na pele) e infecções disseminadas (cutânea, mucosa, ou visceral), sendo a visceral a forma mais grave (ASHFORD, 2000). Causada por vários espécies de *Leishmania*, principalmente *L. tropica, L. major, L. amazonesis* e *L. mexicana*, a leishmaniose cutânea (LC) é uma forma clínica de

importância para a saúde pública (BEKHIT et al., 2018). É a uma das mais disseminadas, podendo ser assintomática ou causar diversos problemas aos pacientes. No entanto, não existe ainda um tratamento para LC com boa efetividade, segurança e que seja confortável para paciente (OLLIARO et al., 2018).

Desde 1940, o Estibogluconato de sódio, Antimoniato de Meglumine e a Anfotericina são a principal linha quimioterapêutica para o tratamento das leishmanioses, os quais requerem administração parenteral, têm efeitos adversos graves e altas taxas de falha terapêutica (LAHIRY et al., 2018). Dessa forma, o alto custo e as diversas desvantagens dos tratamentos tradicionais vêm sendo um estímulo na busca de alternativas terapêuticas, como os produtos oriundos do metabolismo secundários das plantas e seus análogos estruturais (NUNES et al., 2014; PONTE-SUCRE et al., 2017; VARIKUTI et al., 2017).

Alcalóides do tipo alcamida foram isolados do fruto verde da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), também conhecida como "louro". As riparinas I, II e III possuem atividades farmacológicas comprovadas em estudos pré clínicos, como atividade vasodilatadora (GARCIA et al., 2016), ansiolítica e antidepressiva (VASCONCELOS et al., 2015), antiinflamatória (CARVALHO et al., 2013a) e antimicrobiana (CATÃO et al., 2010).

Análogos estruturais de tais riparinas foram sintetizados por GUTIERREZ (2007). As riparinas A-F apresentaram atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* com avaliação do estresse oxidativo, testes de citotoxicidade em células tumorais, antimicrobiana e atividade antihelmíntica (NUNES et al., 2014). Além disso, apresentaram atividade antiinflamatória (SANTIAGO et al., 2015), antioxidante e citotóxica sobre célular tumorais (NUNES et al., 2014) e antinociceptivo (BRITO et al., 2017). Já a molécula riparina A apresentou significativa atividade leishmanicida *in vitro* sobre *L. amazonensis* (ARAÚJO et al., 2016).

A RipC é uma substância que se apresenta como um pó branco, cristalino e de baixa solubilidade aquosa, fórmula molecular $C_{15}H_{15}O_2N$, com 241,29 g/mol. Apresenta um radical OH adicionado a riparina A (Figura 1) capaz de formar ligações de H com importantes alvos moleculares de *Leishmania major* (dados não publicados), apresenta potente atividade antibacteriana *in vitro* (COSTA et al., 2016) e apresentou efetividade máxima contra esquistossomas em baixas concentrações (NUNES et al., 2013).

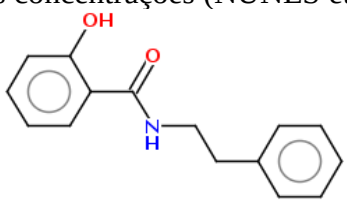


Figura 1. Estrutura química da RipC.

Recentemente, sistemas de liberação de fármacos para aplicação via cutânea utilizando microemulsões (ME) como agentes carreadores de fármacos com baixa solubilidade aquosa, como é o caso da RipC, vem sendo desenvolvidos (FIGUEIREDO et al., 2015; LIMA et al., 2018; BENIGNI et al., 2018; CARVALHO et al., 2018). As ME são conhecidas por aumentarem a disponibilização de certos fármacos para as camadas mais profundas da pele e são geralmente caracterizadas como gotículas esféricas e com diâmetro da ordem de 10 a 100 nm, ou até mesmo 300 nm (CALLENDER et al., 2017). São sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes, de dois líquidos imiscíveis (usualmente água e óleo) estabilizados por um filme de compostos tensoativos (com ou sem cotensoativos), localizados na interface óleo/água (ÜSTÜNDAĞ OKUR et. al, 2011).

Fármacos incorporados em sistemas microemulsionados tem potencial aplicação na terapêutica antileishmania (MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2016; KHALIL et al., 2018; MORAIS et al., 2018). Dessa forma, considerando a crescente literatura sobre as propriedades biológicas da riparina C, assim como sua potente atividade citotóxica *in vitro* sobre *Leishmania major* e sua baixa toxicidade sobre macrófagos humanos (dados não publicados), é de grande importância a investigação *in vivo* da atividade antileishmania em uma formulação para uso tópico. O objetivo deste trabalho foi realizar a obtenção de uma ME contendo RipC para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Foi utilizado RipC matéria-prima como padrão de trabalho, com pureza de 97,39% adquirido no Laboratório de Farmacognosia, Curso de Farmácia, UFPI. O polissorbato 80 foi adquirido na Neon (Brasil). O etanol 99,8 % foi adquirido da Dinâmica (Brasil) e da Vetec (Brasil). O miristato de isopropila e o Transcutol P® (dietilenoglicol monoetiléter) foram adquiridos na Fagron (Brasil) e Gattefossé (França), respectivamente. A anfotericina B, propilenoglicol e poloxamer foram adquiridos na Fagron (Brasil), Dinâmica (Brasil) e Chemspecs (Brasil), respectivamente. Obteve-se água purificada através de sistema osmose reversa (Milipore, Alemanha).

2.2 Obtenção das formulações

2.2.1 Solubilidade em componentes de microemulsão

De modo a avaliar a capacidade máxima de solubilização de RipC em diversos tensoativos, cotensoativos e óleos, procedeu-se a um ensaio de solubilidade (ÜSTÜNDAĞ OKUR et al., 2011). Adicionou-se um excesso de RipC em tubo de ensaio contendo 1 mL dos

reagentes (n=3), procedendo-se as seguintes condições: agitação de 100 rpm, 72 h, 37±2 °C. Posteriormente, centrifugou-se por 30 min a 3000 rpm. Filtrou-se a amostra, transferindo-se, em seguida, alíquotas do filtrado para balão volumétrico, completando-se com uma mistura de EtOH:H_2O (60:40). As leituras foram realizadas em UV λ=300 nm.

2.2.2 Construção dos diagramas de fase pseudoternários e incorporação de RipC

Os diagramas de fase pseudoternários foram obtidos através de uma mistura a frio, sob agitação moderada, de Polissorbato 80, Transcutol®, miristato de isopropila e água purificada. As proporções de surfactantes e fase oleosa foram fixadas, seguido por uma adição gota-a-gota de água purificada até que a mistura se tornasse límpida (região de microemulsão). Após seleção de alguns pontos de microemulão RipC foi incorporada a frio e sob agitação magnética na concentração de 1% (10 mg/g), obtendo-se as formulações ME1-RipC e ME2-RipC (FIGUEIREDO et al., 2016). Foram obtidas as formulações ME1, ME2, ME3, ME4, ME5 e ME6 sem RipC para o estudo de caracterização físico-química.

2.3 Caracterização físico-química

2.3.1 pH, condutividade, índice de refração e transmitância

O pH das formulações foi avaliado utilizando-se um potenciômetro digital (Bel Engineering, Itália) com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. O eletrodo de vidro foi introduzido diretamente no interior da formulação. A condutividade foi determinada em aparelho condutivímetro (Marte, Brasil). O índice de refração foi determinado utilizando-se um aparelho refratômetro (Quimis, Brasil), aferido com água purificada. As leituras foram realizadas à temperatura de 25±2ºC.

O ensaio de transmitância foi realizado através da leitura da % transmitância da amostra em 650 nm em espectrofotômetro Shimadzu (Japão), utilizando água destilada como branco (PATEL et al., 2010).

2.3.2 Análise reológica

A reologia das formulações foi avaliada usando um reômetro rotativo RM-200 (Lamy Rheology). Todas as medidas reológicas foram realizadas a 25 ± 0,2 °C. Testes de fluxo foram realizados com taxas de cisalhamento na faixa de 0-200 s^{-1}, utilizando sistema MS-Din 11, tempo de *pre-shear* 30s e *step time* 30s (CARVALHO et al., 2018).

2.3.3 Tamanho de gotícula (nm) e potencial zeta (mV)

A análise do tamanho das gotículas é determinada através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), também denominada espectroscopia de correlação de fótons, cuja técnica fornece o raio hidrodinâmico das gotículas (DONG et al., 2016). Foi utilizado o equipamento Nano Particle Analyzer SZ-100 (Horiba). Foi realizado o teste de tamanho, análise de índice de polidispersividade (IPD) e determinação do potencial zeta.

2.3.4 Microscopia de luz polarizada e espalhamento de raios-X a baixo ângulo

Para avaliar a isotropia, as formulações foram observadas sob um microscópio de luz polarizada (Nikon, Shinjuku, Japan). As amostras foram depositadas em uma lâmina de vidro e, em seguida, cobertas com uma lâmina de cobertura a fim de evitar a evaporação da água (PADULA et al, 2018).

Para a análise de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), as medidas foram realizadas na linha de luz D1B-SAXS1 do Laboratório de Luz Síncrotron Brasileira (LNLS, Campinas, Brasil). O feixe de raios X (comprimento de onda λ = 1.499 Å) foi monocromatizado utilizando um espelho multicamada toroidal de silício-W/B4C, colimado e detectado num detector Pilatus 300k. A distância amostra-detector foi de 1500 mm, cobrindo um vetor de dispersão q ($q=(4\pi/\lambda)\text{sen }\theta$) variando de 0,14 a 5 nm^{-1}, onde 2θ=ângulo de dispersão. O pó de behenato de prata foi utilizado como padrão para calibrar a distância da amostra para o detector. A transmissão, a corrente escura e a folha de mica foram corrigidas e a dispersão parasitária foi subtraída da intensidade de dispersão total. As medições foram realizadas à temperatura ambiente (25±0,2 °C) (CARVALHO et al., 2016).

2.4 Validação de metodologia analítica para determinação de RipC em ME

2.4.1 Preparo das amostras e condições de análise

Para a construção da curva de calibração de RipC (8 – 52 µg/mL), utilizou-se como solvente EtOH:H_2O (60:40, v/v). Na construção da curva de calibração, foram pesados 10 mg de RipC e transferidos para um balão de 50 ml contendo etanol e a amostra foi submetida a ultrassonicação durante 15 min. Alíquotas da solução 0,2 mg/mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL. No preparo de amostras da formulação para análise, pesou-se uma quantidade de formulação contendo 0,32 mg de RipC em balão volumétrico de 10 mL (Bioprecisa, Brasil). A amostra foi diluída no sistema solvente, agitando-se manualmente por 30s. Todas as leituras foram realizadas em espectrofotometria na região do UV em 300 nm, utilizando-se o sistema solvente como branco (espectrofotômetro Shimadzu, Japão).

2.4.2 Parâmetros de validação

Para a especificidade e seletividade, foram preparadas as seguintes soluções: solução padrão de RipC; solução de ME; solução de ME contendo RipC; solvente EtOH:H_2O (60:40, v/v). Realizou-se uma varredura na faixa de 200–400 nm e os espectros de absorção apresentados pelas curvas foram comparados.

Para a avaliação da linearidade e intervalo do método, realizou-se uma série de 7 diluições em triplicata na faixa de concentração de 8 – 56 µg/mL. O coeficiente de determinação r^2 foi obtido por meio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Foram calculados os limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), conforme RDC n° 166/2017 (BRASIL, 2017).

Quanto a precisão, a repetibilidade (precisão intracorrida) foi avaliada através da média de seis determinações da amostra na concentração de 32 µg/mL. A precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) foi realizada no mesmo dia e nas mesmas condições de análise em um laboratório B (espectrofotômetros Bioscience, Inglaterra). A exatidão foi avaliada através da adição de RipC em solução de ME e seu percentual de recuperação em três níveis de concentração distintos (n=3), com 80, 100 e 120% da concentração utilizada: 25,6, 32 e 38,4 µg/mL.

A robustez foi avaliada através da mudança nas condições de preparo da amostra com diferentes fabricantes do solvente etanol. De forma a avaliar a estabilidade do analito, amostras de ME foram preparadas conforme procedimento anterior e foram submetidas a presença e ausência de luz nos tempos de 0 a 2 h.

2.5 Estabilidade preliminar

Amostras de cada formulação foram submetidas à centrifugação durante 30 min a 3000 rpm (centrífuga HT, Brasil). Na sequência, foi observada a ocorrência ou não de separação de fases ou de qualquer indício de instabilidade.

O estudo de estabilidade preliminar foi realizado por meio da análise dos seguintes parâmetros: características organolépticas, índice de refração, pH, condutividade elétrica, transmitância e teor. Os parâmetros foram analisados antes e após os testes de estresse térmico, ciclo gelo-degelo e aos 30 e 180 dias em temperatura ambiente (25 ± 2ºC). Na análise organoléptica das formulações, foram observados o seu aspecto, cor, homogeneidade e processos de instabilidade como cremeação e separação de fase.

As amostras para o estresse térmico foram submetidas às temperaturas de 40-80°C, com progressão de elevação de 10ºC/30minutos em banho-maria termostatizado (Edutec,

Brasil). As formulações foram avaliadas ao término de 80°C, após as preparações retornarem à temperatura ambiente (25±2 ºC) (BABY et al., 2008). As preparações para o ciclo gelo-degelo foram submetidas a –5°C±2ºC em refrigerador (Electrolux, Brasil), por 24h, e 50°C ± 2ºC, por 24h, em estufa (Icamo, Brasil), completando um ciclo. Ao final de 12 dias (6 ciclos), as formulações foram analisadas após retornarem à temperatura ambiente (25ºC) (BRASIL, 2004). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

2.6 Cinética de liberação in vitro de RipC em ME

Para a cinética de liberação *in vitro*, o estudo foi conduzido utilizando-se membranas de nitrato de celulose em células de difusão tipo Franz com área difusional de 1,66 cm^2 e volume de ±15 mL. O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato pH 7,4 associado a 20% de EtOH num sistema composto por 6 células individuais (32±0,5ºC, 100 rpm). Aplicou-se 200 mg de ME1RipC ou ME2RipC no compartimento receptor diretamente sobre a membrana. Utilizou-se de forma comparativa solução 1% de RipC em transcutol (controle). As amostras da solução receptora foram coletadas nos tempos 0,5, 1, 1,5, 2, 4 e 6h. As leituras das alíquotas coletadas foram realizadas em UV λ=300 nm. O volume total da fase receptora foi substituído a cada amostragem para reposição do meio e manutenção das condições *sink* (CARVALHO et al., 2018). Foram avaliados o fluxo no *steady state* (Jss), constante de liberação (Kl), coeficiente de determinação (r^2) e análise de resíduos entre diferentes modelos cinéticos para as formulações testadas.

2.7 Permeação cutânea em pele de camundongos Balb/c

Para a permeação cutânea *in vitro*, utilizou-se amostras de pele da região dorsal de camundongos Balb/c previamente tricotomizadas e com o tecido subcutâneo removido cirurgicamente (VAN BOCXLAER et al., 2016). O estudo foi conduzido utilizando-se células de difusão tipo Franz nas mesmas condições da cinética de liberação *in vitro*, com coletas de nos tempos 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h. Em segue, as amostras foram filtradas em filtro para seringa 5 µm e as leituras das alíquotas coletadas foram realizadas em UV λ=300 nm.

2.8 Atividade antileishmania in vivo

2.8.1 Animais

No protocolo experimental desta pesquisa foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com idade entre 2 a 3 meses, pesando entre 25 a 35 gramas, provenientes do biotério da Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina (Protocolo de aprovação CEEA Nº 265/16).

Os animais foram mantidos sob condições de controle de temperatura a 25 ± 1°C e ciclo claro-escuro de 12 horas, com água filtrada e ração *ad libitum*. Os animais foram divididos em grupos e mantidos em compartimento do Biotério de Experimentação destinado a animais infectados, em gaiolas acrílicas com isolamento e ventilação.

A eutanásia foi realizada segundo Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, a qual dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, em consoante ao guia brasileiro de boas práticas para a eutanásia de animais. Utilizou-se o método químico: tiopental na dose de 150 mg/kg e lidocaína na dose de 10 mg/kg, via intraperitoneal.

2.8.2 Infecção por *Leishmania major*

Foi utilizada a cepa MHOM/IL/80/Friendlin de *Leishmania major*, obtida no Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais – NPPM-UFPI, mantidas por sucessivas passagens em camundongos BALB/c e replicadas em frascos de cultivo celular com meio de cultura de Schneider's (Sigma Chemical Co, St Louis, USA) inativado e solução de penicilina/estreptomicina (10.000 UI/mL e 50 μg/mL de estreptomicina Sigma Chemical Co, St Louis, USA) e mantidas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a 26 ±1°C. Os animais foram tricotomizados na região da base da cauda e inoculados pela via subcutânea com 1 x 10^6 promastigotas, ajustados a um volume de 50 μL de inóculo.

2.8.3 Tratamento

Após desenvolvimento das lesões leishmanióticas nodulares ou ulcerativas no sítio de inóculo, os camundongos foram divididos em 5 grupos (n=8). Os animais foram tratados de acordo com os seguintes grupos: os grupo controle ME1 e ME2 sem RipC, ME1-RipC, ME2-RipC e controle positivo AmB 3% (gel de poloxamer 25% contendo 3% de anfotericina B), conforme PINHEIRO et al. (2016). Iniciou-se o tratamento após 35 dias da infecção. Os animais foram tratados duas vezes ao dia, durante 21 dias consecutivos, com 100 μL da formulação utilizando-se um micropipetador automático. Foi realizada tricotomia semanal da região da infecção.

2.8.4 Avaliação da Eficácia do Tratamento

Os animais foram acompanhados antes, durante e após o tratamento através da observação diária das lesões quanto a presença do nódulo, de úlcera, infecção secundária, surgimento de metástases e cicatrização. O peso relativo dos animais foi mensurado no início e no final do tratamento.

A avaliação quantitativa do efeito terapêutico das formulações utilizadas foi realizada através da mensuração semanal do diâmetro da lesão ulcerativa/nódulo com um paquímetro Messen®. Como parâmetro, foi mensurado o diâmetro entre as bordas externas da úlcera no sentido perpendicular a linha dorsal e o diâmetro entre as bordas externas do eixo vertical coincidente a linha dorsal da lesão no animal. Após a realização das duas medidas, foi obtida a média do diâmetro. Após o término do tratamento, os animais foram observados por um período de mais 15 dias, tendo suas lesões mensuradas semanalmente.

2.8.5 Carga Parasitária

Para a realização da carga de parasitas de *L. major* na lesão foi realizada a metodologia de diluição limitante (PINHEIRO et al, 2016). O fragmento da lesão em análise foi pesado, triturado e homogeneizado em meio de cultura Schneider's suplementado. As suspensões foram diluídas em série em placas de 96 poços que foram posteriormente incubados a 25 °C, e observadas durante oito dias, em microscópio de luz invertida, com aumento de 200x, observando-se a presença ou ausência de promastigotas. A maior diluição em que pelo menos um parasita foi encontrado em cada poço foi definida como título. Os resultados foram expressos em log10.

2.8.6 Avaliação laboratorial da toxicidade *in vivo*

Foram colhidas amostras de sangue por punção intracardíaca no momento da eutanásia em tubos isento de anticoagulantes. Para os valores de hematócrito, as amostras foram processadas através da centrifugação em tubos de microcapilares, logo após a colheita. Em seguida, fez-se a separação do soro para os testes bioquímicos. Os ensaios bioquímicos foram realizados em analisador semi-automático onde foram avaliadas a função hepática, através do teste de transaminase glutamico-pirúvica (TGP) e transaminase glutamico-oxalacética (TGO) e a nefrotoxicidade foi avaliada pelos testes de ureia (URE) e creatinina (CRE).

2.9 Análise estatística

Os resultados obtidos na validação da metodologia analítica e estudo de estabilidade foram submetidos ao teste *t* de Student para avaliar possíveis diferenças estatísticas, com significância estatística de $p<0,05$. A linearidade do método foi submetida à análise de variância (ANOVA). No estudo de atividade antileishmania *in vivo,* foi utilizado Anova one way, seguido por Teste de Bonferri. Na frequência de ulceração foram realizado o Teste exato de Fisher. Para a análise dos dados, foram utilizados os softwares Microsoft Office Excel®, OriginLab® e Graphpad Prism® v.5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção das formulações e caracterização físico-química

Na investigação da solubilidade máxima da RipC em diferentes componentes de sistemas microemulsionados foi possível encontrar solubilidades variando de 0,24 a 21,71 mg/mL, conforme a Tabela 1. Com relação a sua solubilidade aquosa, a RipC foi considerada muito pouco solúvel em água (BRASIL, 2010). Com exceção de Transcutol P®, co-tensoativo e agente solubilizante bastante utilizado em formulações para uso dermatológico (BENIGNI et al., 2018), todos os outros tensoativos e óleos foram capazes de solubilizar uma quantidade inferior a 1% de RipC.

Tabela 1. Solubilidade da RipC em tensoativos, co-tensoativos, óleos e água.

Componente	EHL	Solubilidade (mg/mL)
Polissorbato 80	15,0	9,22±1,54
Transcutol P®	4,0	21,71±3,15
Plurol® oleique	6,0	7,15±0,36
Miristato de isopropila	11,5	9,60±0,98
Óleo de castanha de cajú	7,0	9,30±0,61
Óleo de semente de uva	7,0	7,81±0,19
Óleo de semente de abóbora	8,0	6,78±0,78
Propilenoglicol	11,6	8,44±0,17
Água	-	0,24±0,04

Os dados estão expressos como Média±Desvio padrão. EHL: equilíbrio hidrófilo-lipófilo.

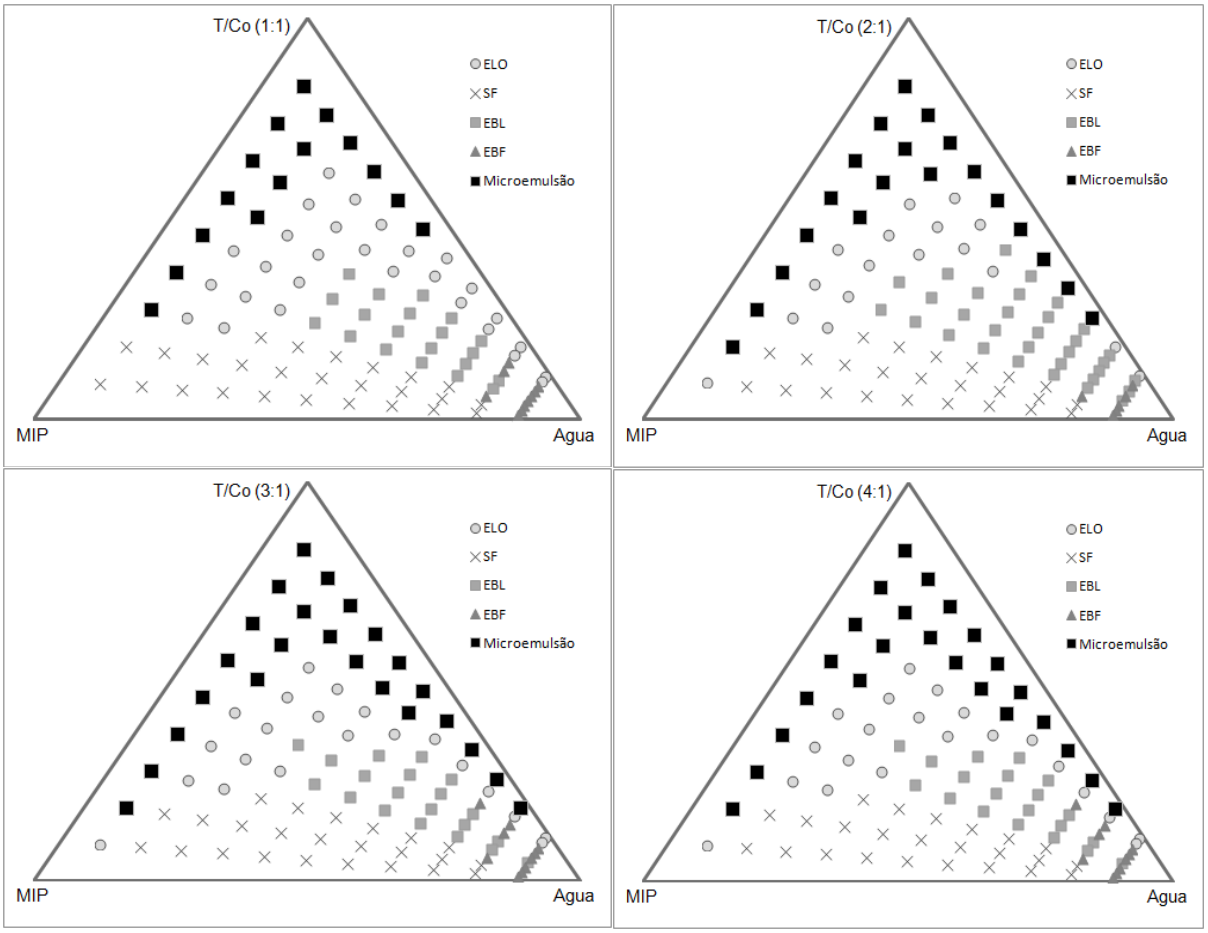
Uma ampla variedade de estruturas e fases podem ser formadas pela mistura de óleo, água e tensoativos em diferentes proporções, tais como: microemulsões, emulsões convencionais, estruturas cristalinas e lamelares. A escolha do surfactante é crucial para obter a formulação desejada, pois este desempenha um papel importante nas suas propriedades físico-químicas (CALLENDER et al., 2017). A formulação ideal de uma microemulsão corresponde aquela necessária para que o sistema resultante tenha as propriedades físico-químicas desejadas, tais como viscosidade, estabilidade, pH e área específica da fase dispersa, com aplicação eficiente do ponto de vista tecnológico e, evidentemente, que demande custos mínimos (SOARES et al., 2015).

Um dos pontos de grande importância é o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL). O EHL do tensoativo e cotensoativo deve combinar com EHL do óleo selecionado e fornecer uma menor tensão interfacial entre as fases oleosa e aquosa. Isto reflete na estabilidade do sistema e pode ser obtido quando o EHL do surfactante (ou EHL da mistura de tensoativos e cotensoativos) e do óleo são semelhantes (MAHDI et al., 2011). A estabilidade de sistemas emulsionados é melhorada com uma combinação de tensoativos e um EHL ideal, pois a

solubilização alcança o máximo e gotículas com menores tamanhos são formadas (SYED; PEH, 2014). Isto foi possível com o uso do tensoativo polissorbato 80 e o cotensoativo, Transcutol P. A mistura entre eles foi capaz de proporcionar um EHL capaz de formar regiões de microemulsão com o miristato de isopropila (MIP) e obter as formulações selecionadas para este trabalho.

Após a seleção dos componentes, regiões de microemulsões foram obtidas através da construção de diagramas de fase pseudoternários. Esta é a melhor maneira de estudar todos os tipos de formulações que podem se originar da mistura de tensoativos, água e óleo. Diferentes proporções dos componentes podem formar sistemas do tipo emulsão líquida opaca, emulsão branca leitosa, microemulsões, bem como pode ocorrer separação de fases (FIGUEREDO et al., 2016). Podemos observar que uma maior proporção de polissorbato 80 (diagramas 3:1 e 4:1) proporcionou a obtenção de um maior número de pontos de microemulsão (Figura 2).

Figura 2. Diagramas de fase pseudoternários.



ELO: emulsão líquida opaca; SF; separação de fases (turvação); EBL: emulsão branca leitosa; EBF: emulsão branca fluida. T/Co: tensoativo/cotensoativo. MIP: miristato de isopropila.

A Tabela 2 apresenta alguns pontos selecionados da região de microemulsão dos diagramas de fase obtidos. As formulações com teor de água acima de 50% apresentaram separação de fases (turvação) após 48h de preparo (ME3 e ME5) provavelmente devido a baixa estabilidade do sistema formado. Em alguns pontos do diagrama de fases 3:1 e 4:1, não foi possível a incorporação de RipC. Os pontos com quantidade de água acima de 32% e com Transcutol P® <20% não incorporaram RipC. As microemulsões têm sido alvo de numerosos estudos durante as últimas décadas, principalmente devido ao seu elevado poder de solubilização (SILVA et al., 2015). Dessa forma, foram obtidas as formulações ME1-RipC e ME2-RipC com 1% de RipC.

Tabela 2. Descrição das formulações obtidas no estudo e sua caracterização físico-química.

Composição (%) (T/Co)	**ME1 (1:1)**	**ME1-RipC (1:1)**	**ME2 (2:1)**	**ME2-RipC (2:1)**	**ME3 (2:1)**	**ME4 (3:1)**	**ME5 (3:1)**	**ME6 (3:1)**
Polissorbato 80	31,05	30,74	41,40	40,99	26,91	46,55	24,73	46,15
Transcutol P®	31,05	30,74	20,70	20,49	13,45	15,52	8,24	15,38
MIP	6,90	6,83	6,90	6,83	4,48	6,90	3,66	15,38
Água	31,00	30,69	31,00	30,69	55,16	31,03	63,37	23,08
Riparina C	-	1,0	-	1,0	-	-	-	-
Aspecto	Cor lev. amarela, transpar., homog., lev. viscoso	Cor lev. amarela, transpar, homog., lev. viscoso	Cor lev. amarela, transpar., homog., viscoso	Cor lev. amarela, transpar., homog., viscoso	Cor lev. amarela, transpar, homog., lev. viscoso	Cor lev. amarela, transpar, homog., viscoso	Cor lev. amarela, transpar homog., lev. viscoso	Cor lev. amarela, transpar homog., viscoso
pH	6,59± 0,02	6,60± 0,02	6,74± 0,04	6,68± 0,02	5,93± 0,06	6,72± 0,01	5,60± 0,04	6,72± 0,01
Índice de refração	1,4170± 0,0006	1,4180± 0,0005	1,4230± 0,0006	1,4238± 0,0007	1,3895± 0,0001	1,4255± 0,0012	1,3798± 0,0006	1,4411± 0,0011
Condutividade (µS/cm)	36,54± 0,09	35,36± 0,06***	39,86± 0,23	39,35± 0,03*	99,64± 0,84	40,30± 1,34	124,67± 1,56	30,06± 0,16
Transmitância (%)	99,04± 0,02	98,26± 0,05***	99,01± 0,02	98,79± 0,05**	98,36± 0,01	98,38± 0,01	98,50± 0,01	97,77± 0,01

Os dados estão expressos como Média±Desvio padrão. ME1 e ME2– microemulsão sem RipC; ME1-RipC e ME2-RipC – microemulsão com 1% de RipC. ME3 - ME6: outras formulações obtidas. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 em relação à formulação placebo. Teste *t* Student.

O polissorbato 80, um dos tensoativos mais aceitáveis e utilizados na composição de formulações farmacêuticas e microemulsões (CALLENDER et al., 2017), tende a formar ME do tipo O/A devido a seu valor de EHL (KAUR; MEHTA, 2017). Ao observarmos ainda a Tabela 2, a incoporação da RipC apresentou poucas alterações nas propriedades físico-químicas avaliadas. Mudanças na condutividade podem retratar alterações estruturais contínuas de A/O para O/A ocorrendo no sistema microemulsionado, tanto na ausência e presença de fármacos incorporados. No entanto, esta pequena alteração não evidencia inversão de fases e as formulações ainda apresentam transmitância próximo a 100%, indicando translucidez. O índice de refração de microemulsões pode ser usado também para indicar translucidez e indícios de separação de fases. Os valores obtidos foram semelhantes a outros estudos (DAAR et al., 2017) e próximo ao valor do polissorbato 80, que é 1,473 (Tabela 2).

As formulações selecionadas, ME1-RipC e ME2-RipC, apresentaram pH compatível com a pele e sem alterações significativas após adição do fármaco (Tabela 2). É recomendado para tais produtos um pH próximo à faixa de pH cutâneo, que varia de 4,6 a 5,8 (CAMPOS; FRASSON, 2011). Formulações contendo polissorbato 80 são descritas como não tóxicas e não irritantes (KAUR; MEHTA, 2017).

Nas formulações selecionadas, o tamanho nanométrico das gotículas foi afetado com a incorporação de RipC, com uma expressiva e significante redução em ME2-Rip2 (Tabela 3). Segundo DAMASCENO et al. (2011), microemulsões podem apresentar tamanho de gotículas da ordem de 10 a 300 nm. Um valor de índice de polidisperssividade (IPD) menor que 0,5 e indica homogeneidade das gotículas, porém com certa polidisperssão (ÜSTÜNDAĞ OKUR et al., 2011), o que ocorreu com todas as formulações avaliadas, indicando uma boa distribuição do seu tamanho. Além disso, houve redução do potencial zeta com a incorporação do fármaco (Tabela 3).

A formulação ME2-RipC apresentou o menor valor de potencial zeta e de tamanho de gotícula, sendo $p<0,001$ em relação a ME1 para este último parâmetro. Uma maior concentração do tensoativo em relação a ME1-RipC pode associado a incorporação de um fármaco lipossolúvel pode resultar em uma maior adsorção do tensoativo na interface O/A e uma redução ainda maior da tensão superficial e energia livre de superfície das micelas formadas, resultando em possíveis alterações estruturais no sistema e redução no diâmetro das gotículas formadas (PATEL et al., 2013). Desta forma, os valores encontrados podem implicar em uma boa estabilidade física contra separação de fases (PATEL et al., 2011; NAZAR et al., 2018), principalmente para ME2-RipC.

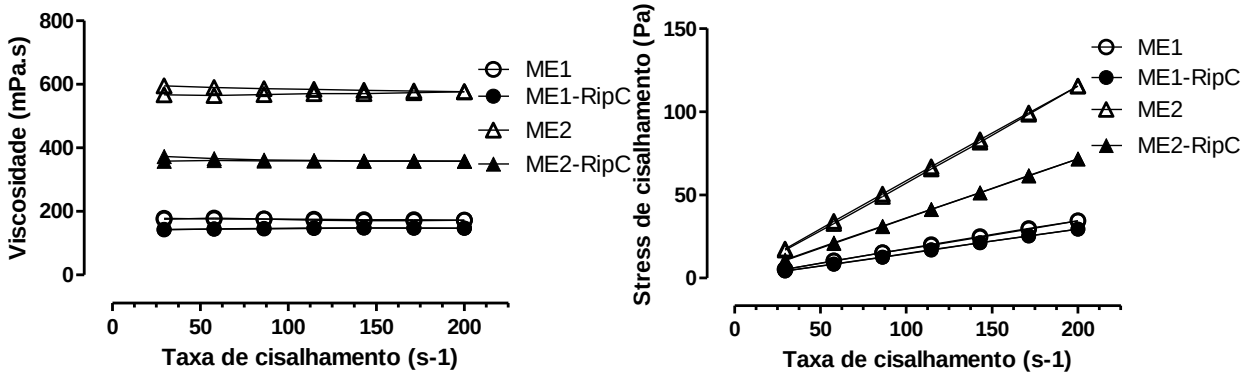
Tabela 3. Descrição dos parâmetros tamanho de gotícula (nm), IPD e potencial zeta (mV) das formulações obtidas.

Formulação	Tamanho gotícula (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)
ME1	75,36±3,45	0,248±0,074	-5,15±0,49
ME1-RipC	68,63±3,42	0,329±0,028	-7,55±2,10
ME2	84,00±5,23	0,453±0,032	-24,45±0,21
ME2-RipC	18,73±0,35***	0,435±0,036	-28,33±2,54

Os dados estão expressos como Média±Desvio padrão. ME1 e ME2– microemulsão sem RipC; ME1-RipC e ME2-RipC – microemulsão com 1% de RipC. IPD: índice de polidispersividade. ***p<0,001 em relação a ME2. Test t de Student.

Na avaliação da reologia das formulações, a viscosidade permaneceu constante e o *stress* de cisalhamento foi proporcional ao aumento da taxa de cisalhamento até 200 s^{-1} (Figura 3), indicando um comportamento de fluxo do tipo newtoniano e característico das microemulsões (MORI CORTÉS; LORENZO; CALIFANO, 2018). Evidenciou-se uma maior viscosidade aparente de ME2 e ME2-RipC em relação as outras formulações provavelmente devido a maior proporção de Polissorbato 80. A incorporação de RipC reduziu a viscosidade aparente de ME2-RipC em relação a ME2. Dependendo do tipo de tensoativo, da proporção da fase dispersa, assim como do tamanho da gotícula (ELFIYANI; AMALIA; PRATAMA, 2017), a viscosidade poderá sofrer alterações e tem sido uma técnica amplamente útil para observar a mudanças na microestrutura de microemulsões (NAZAR et al., 2018).

Figura 3. Comportamento reológico das formulações.

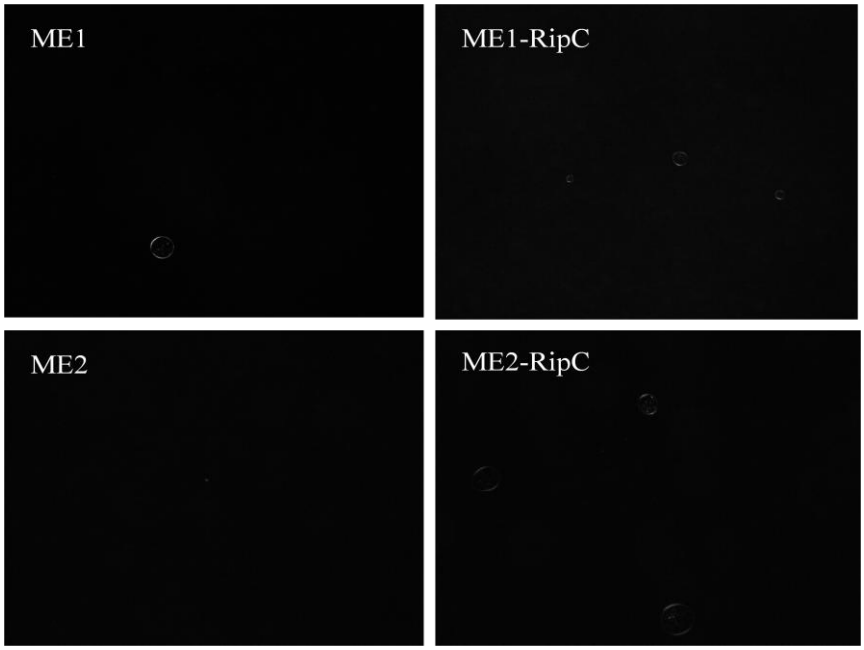


ME1 e ME2– microemulsão sem RipC; ME1-RipC e ME2-RipC – microemulsão com 1% de RipC.

De forma a confirmar a formação de microemulsões, foram realizadas análises por microscopia de luz polarizada e SAXS. Na análise microscópica, evidenciou-se a ausência de estruturas anisotrópicas como a "cruz de malta" característica dos cristais líquidos (Figura 4), sugerindo ser um sistema microemulsionado (CARVALHO et al., 2018). No SAXS, a intensidade de espalhamento (I) foi plotada como uma função do vetor de espalhamento (q). Todas as curvas das formulações apresentaram perfis de SAXS com um único pico,

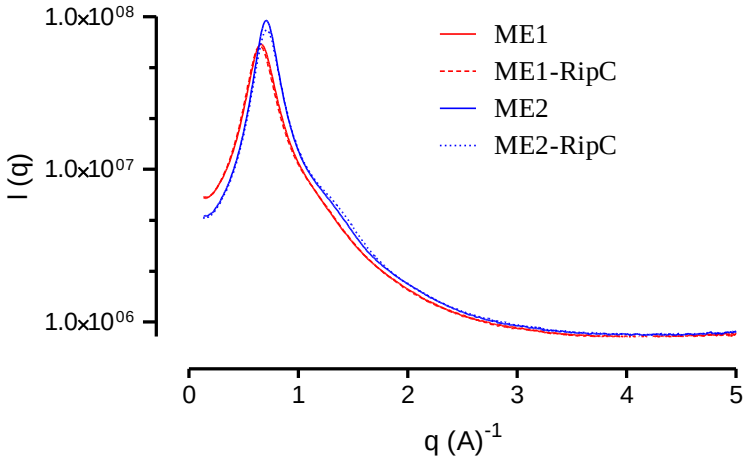
confirmando a estrutura de gotículas das microemulsões (Figura 5). Não foi observado outro pico que indicaria a formação de mesofases (CARVALHO et al., 2016).

Figura 4. Fotografia das amostras avaliadas através de microscopia de luz polarizada.



ME1 e ME2– microemulsão sem RipC; ME1-RipC e ME2-RipC – microemulsão com 1% de RipC.

Figura 5. Gráfico de SAXS das amostras avaliadas.



ME1 e ME2– microemulsão sem RipC; ME1-RipC e ME2-RipC – microemulsão com 1% de RipC.

3.2 Validação de metodologia analítica para determinação de RipC em microemulsão

Com o objetivo de verificar a especificidade e seletividade do método, foram realizadas varreduras espectrofotométricas na região de UV 200 – 400 nm. O método foi capaz de realizar a determinação do fármaco sem interferência significativa dos constituintes

da microemulsão na região de UV λ = 300 nm (dados não mostrados). Na Tabela 4, observam-se os resultados do estudo da linearidade, precisão, exatidão e robustez do método analítico desenvolvido. Os dados da linearidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a qual demonstrou que a regressão linear foi estatisticamente significativa e sem falta de ajustes ($p<0,05$), F_{cal} =1,45857 e $F_{crítico}$=2,9582. Os valores de LD e LQ estão representados na Tabela 4, demonstrando a boa sensibilidade do método.

Tabela 4. Parâmetros obtidos na validação do método analítico de determinação de ripC em microemulsão.

Parâmetros	**Resultados experimentais**	**CV (%)**	**Valor de p***
Linearidade	8 – 52 µg/mL	-	
Equação da reta	y=0,0191x – 0,0366	-	
Coeficiente de determinação	r^2 = 0,9995	-	
LD	0,7760 µg/mL	-	
LQ	1,1758 µg/mL	-	
Precisão			
Repetibilidade	33,95±1,20 µg/mL	3,56	0,1022
Reprodutibilidade	35,24±1,26 µg/mL	3,59	
Exatidão(%Recuperação)			
25,6 µg/mL	103,86±2,97 µg/mL	2,86	
32,0 µg/mL	104,01±0,80 µg/mL	0,77	
38,4 µg/mL	104,18±0,81 µg/mL	0,77	
Robustez			
Estabilidade amostra (%)			0,7810[a]
0h	Claro:105,22±2,89	2,75	
	Escuro: 104,82±2,58	2,46	
1h	Claro:105,92±2,12	2,00	
	Escuro: 106,80±1,61	1,51	
2h	Claro:106,82±2,85	2,67	
	Escuro: 106,97±0,99	0,93	
Fabricante do solvente	Marca A: 102,86±2,00	1,94	0,7409
(%)	Marca B: 104,33±2,75	2,63	

Os dados estão expressos como Média±Desvio padrão. LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação; CV – coeficiente de variação. *Significância estatística quando $p<0,05$, teste *t* de Student. [a]ANOVA one-way entre os grupos.

A Tabela 4 demonstra o resultado de seis determinações a 100% da concentração do teste da precisão intracorrida (repetibilidade) e interlaboratorial (reprodutibilidade), não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as médias dessas determinações. Além disso, os coeficientes de variação (CV) foram menores do que 5%, conforme exigido pelas normas de validação (BRASIL, 2017). Já na avaliação da exatidão, nas três

concentrações avaliadas (baixa, média e alta), o método desenvolvido demonstrou uma porcentagem (%) de recuperação bem próxima a 100 e com CV menor do que 5%, conforme o esperado.

Foi avaliada ainda a robutez, ou seja, a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. O método desenvolvido foi considerado robusto frente ao uso de etanol de diferente fabricantes e demonstrou-se a estabilidade da amostra preparada até 2,0 h, não havendo diferenças entre todos as medidas realizadas (Tabela 4). Com os resultados obtidos, o referido método analítico de controle de qualidade foi validado conforme exige a legislação e demonstrou-se ser de fácil execução, de baixo custo, utiliza solventes poucos tóxicos e aplicável a laboratórios que não dispõem de métodos cromatográficos.

3.3 Estabilidade preliminar

Na avaliação da estabilidade preliminar foram obtidos os resultados de acordo com as Tabela 5. Emulsões e microemulsões estão sujeitas a sofrerem sinais de perda de estabilidade durante o seu armazenamento como cremeação, floculação, coalescência, separação de fases e perda do teor dos princípios ativos da formulação (FIGUEIREDO et al., 2016).

Através do teste de resistência à centrifugação, realizou-se uma análise preliminar da presença de uma possível separação de fases, o qual não ocorreu para as formulações avaliadas, sendo um indicativo de estabilidade das amostras (BRASIL, 2004).

Quanto ao armazenamento em temperatura ambiente por 30 e 180 dias, nos testes de estresse térmico e ciclo gelo-degelo, as formulações apresentaram discretas alterações nos parâmetros avaliados quanto a condutividade, pH, índice de refração e transmitância. No entanto, estas alterações não significaram inversão de fases ou perda da translucidez. Tais discretas alterações são aceitáveis, considerando as condições extremas de temperatura utilizadas, com -5 até 80°C nestes testes (BABY et al., 2007) e com estabilidade bastante superior a emulsões convencionais (FIGUEIREDO et al., 2016). Em relação ao teor de RipC nas formulações, este não apresentou diferença em relação aos valores de T0 para todos os testes, o que demonstram e confirma a excelente estabilidade físico-química das microemulsões (ÜSTÜNDAĞ OKUR et al., 2011).

Tabela 5. Estabilidade preliminar das formulações testados após 30 e 180 dias à temperatura ambiente, estresse térmico e ciclo gelo-degelo.

Formulação	T0	T30	T180	ESTRESSE TÉRMICO	CICLO GELO-DEGELO
Carac. organolépticas					
ME1-RipC	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
ME2-RipC	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
pH					
ME1-RipC	6,59±0,01	6,57±0,02	6,09±0,01***	6,63±0,02*	6,60±0,02*
ME2-RipC	6,63±0,01	6,59±0,03	6,21±0,01***	6,60±0,02	6,59±0,01*
Condutividade					
ME1-RipC	36,68±0,42	35,31±0,60*	39,95±0,07***	35,92±0,09*	37,65±0,69
ME2-RipC	40,90±0,05	37,82±0,11***	42,15±0,05***	39,52±0,09***	40,65±0,10*
Índice de refração					
ME1-RipC	1,4192±0,0003	1,4186±0,0003	1,4172±0,0004**	1,4190±0,0003	1,4190±0,0002
ME2-RipC	1,4232±0,0006	1,4227±0,0003	1,4220±0,0003*	1,4223±0,0005	1,4225±0,0006
Teor (%)					
ME1-RipC	100,97±0,65	102,39±0,85	102,74±2,41	100,41±1,74	102,77±1,03
ME2-RipC	101,14±0,30	104,06±2,82	104,56±2,06	101,11±0,90	101,84±2,37
Transmitância (%)					
ME1-RipC	98,50±0,11	98,35±0,14	99,09±0,11	98,90±0,26	98,27±0,08*
ME2-RipC	98,64±0,08	98,11±0,01	98,96±0,02	98,60±0,32	97,08±0,01***

Os dados estão expressos como Média±Desvio padrão. T0 - tempo 0; T180 - tempo de 180 dias; ME1 e ME2– microemulsão sem RipC; ME1-RipC e ME2-RipC – microemulsão com 1% de RipC. *p<0,05, ***p<0,001 em relação à T0. Teste *t* de Student.

3.4 Cinética de liberação in vitro de RipC em ME

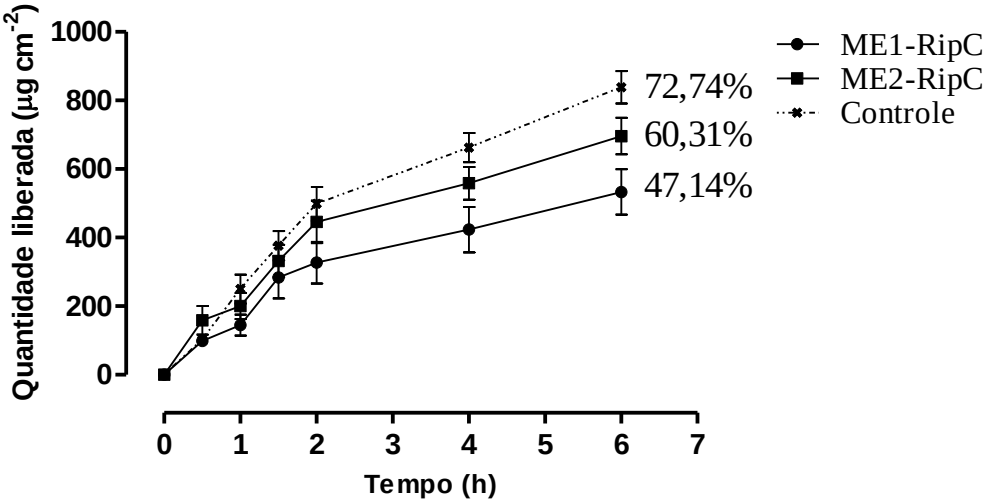
Na avaliação da cinética de liberação *in vitro* de RipC das formulações obtidas, ME2-RipC liberou em 6 h uma quantidade cerca de 1,3 vezes superior a ME1-RipC (Figura 6 e Tabela 6). Microemulsões apresentam grande capacidade de aumentar a liberação de fármacos do sistema (HASHEM et al., 2011) e o tamanho da gotícula tem forte influência sobre esta propriedade (NAZAR et al., 2018). O controle utilizado, RipC em Transcutol P®, apresentou uma liberação de 72,74±7,77%, o que é esperado para fármacos em solução.

Além do reduzido tamanho das gotículas, o Transcutol P® apresenta propriedades de promotor de permeação (CALLENDER et al., 2017) e utilizado nesta formulação como cotensoativo contribuiu para o bom perfil de cinética de liberação apresentado pelas formulações. A presença do cotensoativo é capaz de reduzir ainda mais a tensão superficial do tensoativo e facilita o fluxo de fármacos através da interface entre as fases interna e externa e, dessa forma, facilita a sua liberação e difusão através de membranas (YI-HUNG et al., 2011).

Quanto ao modelo cinético de liberação *in vitro* (Tabela 6), foi calculado o modelo de melhor ajuste para cada formulação. Os valores foram obtidos no *steady state* (estado estacionário), nos quais os valores mais próximos de 1 demonstram melhor adequação ao modelo. Q representa a quantidade de fármaco liberado em função de tempo t, Q0 a quantidade inicial de fármaco, k a constante de velocidade característica do modelo e n é o expoente de liberação (COELHO, 2018).

ME1-RipC e controle comportaram-se como um modelo de primeira ordem (Q=Q0.ekt), com os maiores valores de r^2 de 0,9679 e 0,9891, respectivamente. Este comportamento cinético indica que o fluxo é proporcional a concentração. Já ME2-RipC apresentou um comportamento cinético de Higuchi (Q=kt0,5), com r^2=0,9677. A análise dos resíduos corroborou os resultados dos modelos cinéticos avaliados através de r^2 (Tabela 6). Estudos mostram que sistemas mais viscosos e com menor tamanho de gotícula podem apresentar um comportamento cinético de liberação sustentada e tempo-dependente (NAZAR et al., 2018) e diversas microemulsões são descritas na literatura com esse comportamento de difusão e que apresentam boa taxa de permeação e biodisponibilidade dos seus fármacos (PATEL et al., 2016; SHAH et al., 2018; OLEJNIK; GLOWKA; NOWAK, 2018).

Figura 6. Cinética de liberação *in vitro* de ME1-RipC, ME2-RipC e solução controle contendo RipC em células de difusão de Franz.



ME1-RipC e ME2-RipC – microemulsão com 1% de RipC; Controle - RipC em solução com Transcutol P®.

As microemulsões desempenham um importante papel na penetração cutânea de fármacos. Elas são capazes de aumentar a solubilidade e biodisponibilidade destes, bem como aumentar o potencial de absorção devido a mudanças na permeabilidade em diferentes membranas biológicas, como a intestinal e a pele (KLEIN, 2007; TSAI et al., 2011). O estudo

de cinética de liberação *in vitro* apresentou resultados promissores para a ME, o que pode subsidiar, no futuro, uma formulação com alta capacidade de penetração cutânea para o tratamento da leishmaniose tegumentar americana.

Tabela 6. Avaliação do parâmetros da cinética de liberação *in vitro* em células de Franz.

Formulação	**ME1-RipC**	**ME2-RipC**	**Controle**
Q (ug/cm^2/h)	533,08±59,82	695,98±106,41	838,43±90,70
Q (%)	47,14±11,75	60,31±8,91	72,74±7,77
Modelo cinético			
Ordem zero			
Jss (ug/cm^2/h)	51,44±14,82	62,50±19,92	85,03±8,66
Kl x10^{-2}(cm/h)	2,57±0,7	3,06±0,98	4,17±0,43
r^2	0,9032	0,9220	0,9247
Resíduos	11813,30	10945,81	10592,02
Primeira ordem			
Jss (ug/cm^2/h)	419,18±126,98	507,87±165,89	694,82±72,88
Kl (x10^{-2} cm/h)	20,99±6,34	24,88±8,13	34,08±3,57
r^2	**0,9679**	0,9589	**0,9891**
Resíduos	**10225,37**	9487,48	**6323,77**
Higuchi			
Jss (ug/cm^2/h)	197,05±58,23	239,07±77,15	326,15±33,71
Kl x10^{-2}(cm/h)	9,85±2,91	11,71±3,78	16,00±1,65
r^2	0,9596	**0,9677**	0,9808
Resíduos	10428,32	**9136,21**	6878,22

Os dados estão expressos como Média±Desvio padrão. ME1-RipC e ME2-RipC – microemulsão com 1% de RipC; Controle - RipC em solução com Transcutol P®; Jss: fluxo em ug/cm^2/h; Kl: constante de liberação; r^2: coeficiente de determinação. Nota-se em destaque o modelo cinético em que mais se aproximou cada formulação.

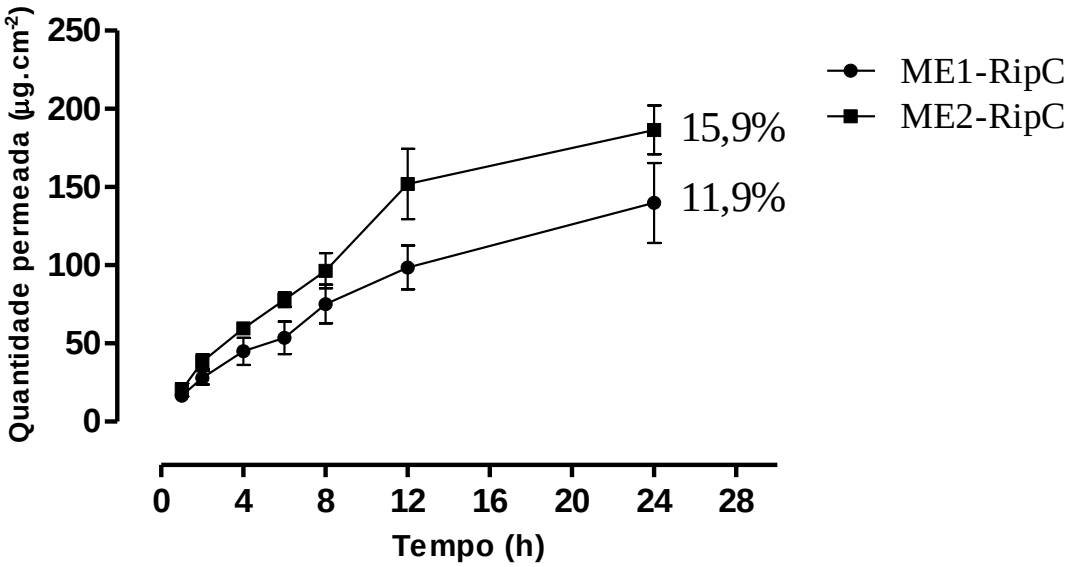
3.5 Permeação *in vitro* em pele de camundongos Balb/c

O tratamento tópico da LC é uma alternativa bastante atraente, pois permite o direcionamento do fármaco para o local de infecção, além de oferecer potencial de minimização de efeitos adversos, não é invasivo e é de fácil aplicação, aumentado a adesão terapêutica pode parte dos pacientes. No entando, a eficácia deste tratamento tópico depende da atividade antileishmania intrínseca da formulação e da quantidade do fármaco capaz de transpor as barreiras da camada da pele e chegar em seu sítio de ação (VAN BOCXLAER et al., 2018). As microemulsões tem se mostrado como excelentes promotores de penetração cutânea para alguns fármacos (FIGUEIREDO et al., 2015; CARVALHO et al., 2016).

Na avaliação da permeação *in vitro* em pele da região do dorsal de camundongos Balb/c (Figura 7), ME1-RipC e ME2-RipC foram capazes de permear 11,9% e 15,9% da quantidade de RipC aplicada no compartimento receptor, respectivamente. ME2-RipC foi

capaz de permear a pele da região dorsal de forma 1,3x superior a ME1-RipC, demonstrando mais uma vez a influência da redução do tamanho de gotícula. Tais formulações apresentaram uma quantidade permeada superior a formulações com 6% de miltefosina (VAN BOCXLAER et al., 2016) e lipossomas de estibogluconato de sódio (DAR; DIN; KHAN, 2018).

Figura 7. Permeação *in vitro* de ME1-RipC e ME2-RipC em pele de camundongos Balb/c.



ME1-RipC e ME2-RipC – microemulsão com 1% de RipC.

3.6 Atividade antileishmania in vivo

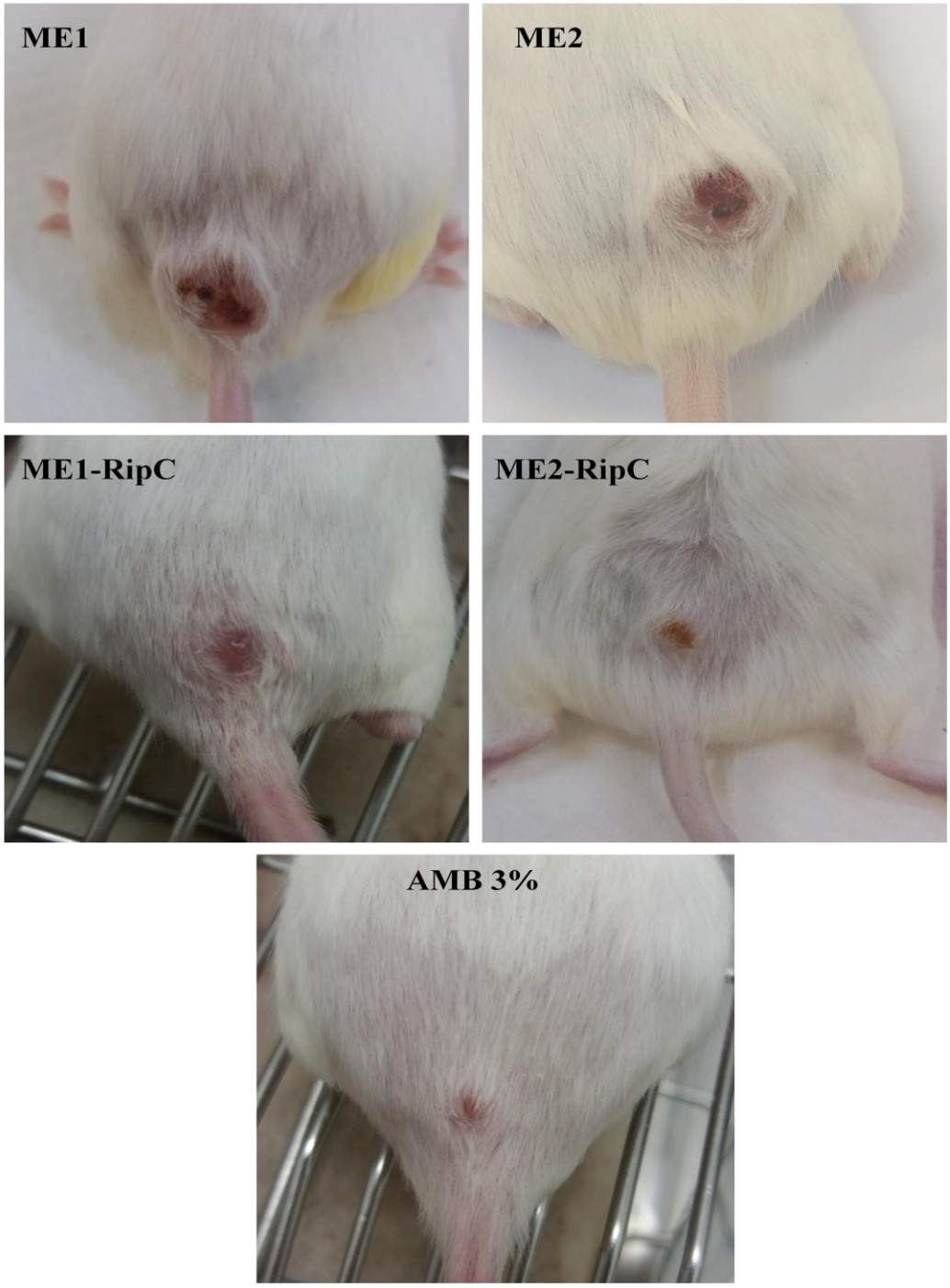
O tratamento convencional da leishmaniose cutânea é de difícil resultado, devido a dificuldade de se eliminar completamente o parasita intracelular. Desta forma, o tratamento tópico proposto é benéfico tendo em vista a facilidade de aplicação, ser menos doloroso, menos tóxico, além da possibilidade de associação com os tratamentos convencionais com menores doses, menor tempo de tratamento ou até mesmo sua substituição, podendo acelerar a recuperação e alcançar taxas de cura mais elevadas (COELHO et al., 2018).

A avaliação da atividade antileishmania *in vivo* requer o uso de camundongos BALB/c que são muito suscetíveis à infecção por *L. major* e que desenvolvem uma infecção clínica de forma semelhante aos humanos (PINHEIRO et al., 2016). Com o início do tratamento, este pode influenciar significativamente no curso da doença e as lesões cutâneas podem reduzir sua carga parasitária, influenciando o processo de cura (CARVALHO et al., 2013b).

Na infecção experimental por *L. major* de camundongos BALB/c, há o desenvolvimento de um nódulo normalmente de 3 a 4 semanas após a inoculação do parasita e que progride para a formação de úlceras com bordas bem delimitadas (GHOTLOO, 2015).

Na Figura 8, observamos o aspecto visual dos nódulos ao final do experimento. Nota-se claramente um grande nódulo e processo ulcerativo nos grupos controles ME1 e ME2. Nos grupos tratados, observa-se uma pequena úlcera visualmente em processo de cicatrização e que será avaliado no estudo histopatológico.

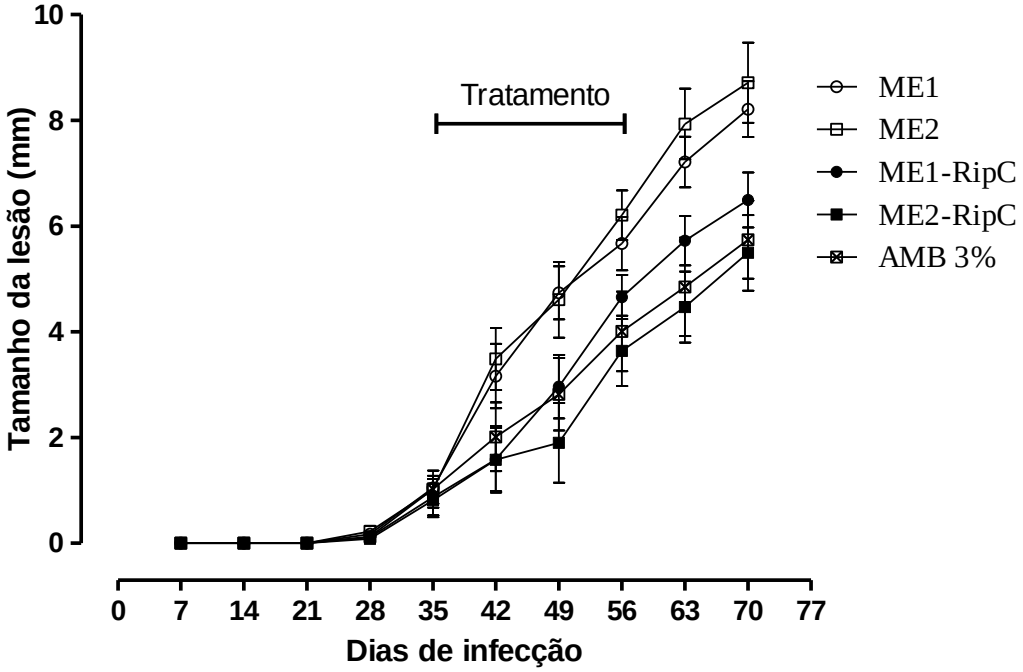
Figura 8. Aspecto das lesões leishmanióticas ao final do experimento.



ME1 e ME2– microemulsão sem RipC; ME1-RipC e ME2-RipC – microemulsão com 1% de RipC; AMB3% - gel de poloxamer com 3% de anfotericina B.

No estudo de atividade antileishmania *in vivo*, ME1-RipC, ME2-RipC e o controle positivo AMB3% foram capazes de retardar o desenvolvimento das lesões leishmanióticas (Figura 9 e Tabela 8), com uma redução de 20,9% e 25,4% para ME1-RipC, 33,1% e 36,9% para ME2-RipC e 30,1% e 34,1% para AMB3% quando comparados as médias de tamanhos das lesões dos controles ME1 e ME2, respectivamente. O tamanho da lesão próximo a 9 mm em animais não tratados foi semelhante a estudo de PINHEIRO et al. (2016) e a redução do tamanho das lesões foi semelhante ao observado por este autor e TAVARES et al. (2019). Em relação a presença de úlceração do nódulo, esta aconteceu em 87,5% a 100% dos controles e de 25% a 62,5% nos animais tratados.

Figura 9. Avaliação do tamanho das lesões até 70 dias após infecção.



ME1 e ME2– microemulsão sem RipC; ME1-RipC e ME2-RipC – microemulsão com 1% de RipC; AMB3% - gel de polaxamer com 3% de anfotericina B.

Como discutido anteriormente, o reduzido tamanho de gotícula de uma microemulsão pode ter forte influência na liberação e penetração cutânea do fármaco. ME1-RipC, que apresenta um maior tamanho de gotícula em relação a ME2-RipC (Tabela 3), demonstrou um menor retardo na progressão das lesões e na frequência de ulceração e não apresentou significância estatística em relação aos controles. Já ME2-RipC e AMB% apresentaram significância estatística para tamanho das lesões e frequência de ulceração e com resultados semelhantes a outros nanocarreadores (RUIZ et al, 2014).

Além das características especiais demonstradas pelas MEs neste trabalho, como boa capacidade de solubilização e incoporação da RipC, excelente estabilidade físico-química e bom perfil de liberação, estudos tem demonstrado a superioridade de tais nanocarreadores em promover a penetração cutânea de fármacos de forma superior as formulações convencionais (FIGUEIREDO et al., 2016; SHUKLA et al., 2018). Desta forma, mesmo estando em uma concentração 3x inferior a formulação do controle positivo padronizada por PINHEIRO et al. (2016), ME2-RipC apresentou uma média de tamanho de lesão e presença de ulceração semelhante a AMB3% ($p>0,05$).

Tabela 7. Avaliação do tamanho da lesão, frequência de ulceração e avaliação da toxicidade *in vivo* do tratamento ao final do experimento.

Grupo	**ME1**	**ME2**	**ME1-RipC**	**ME2-RipC**	**AMB 3%**
Tamanho da lesão (mm)	8,21±0,53	8,71±0,75	6,49±0,52	5,49±0,71[a]	5,74±0,74[a]
Ulceração					
Sim	8 (100%)	7 (87,5%)	5 (62,5%)	2 (25%)[b,c]	3 (37,5%)[d,e]
Não	0 (0%)	1 (12,5%)	3 (37,5%)	6 (75%)	5 (62,5%)
Toxicidade in vivo					
Peso início (g)	33,55±0,99	33,59±1,12	33,43±1,23	33,33±1,35	34,49±1,78
Peso final (g)	33,13±1,32	34,08±0,73	34,68±1,62	34,33±1,53	33,46±1,68
Hematócrito (%)	46,43±1,56	46,00±0,95	45,14±1,26	44,14±2,18	45,00±1,68
Uréia (mg/dL)	53,19±6,87	51,95±6,33	52,79±5,88	55,61±5,83	51,02±5,45
Creatinina (mg/dL)	0,47±0,06	0,45±0,05	0,41±0,03	0,46±0,08	0,51±0,07
TGO (U/L)	65,50±6,66	63,00±8,74	74,75±4,99	80,30±7,53	80,60±6,47
TGP (U/L)	35,02±2,67	33,17±6,15	32,83±6,35	39,00±3,69	35,77±3,62

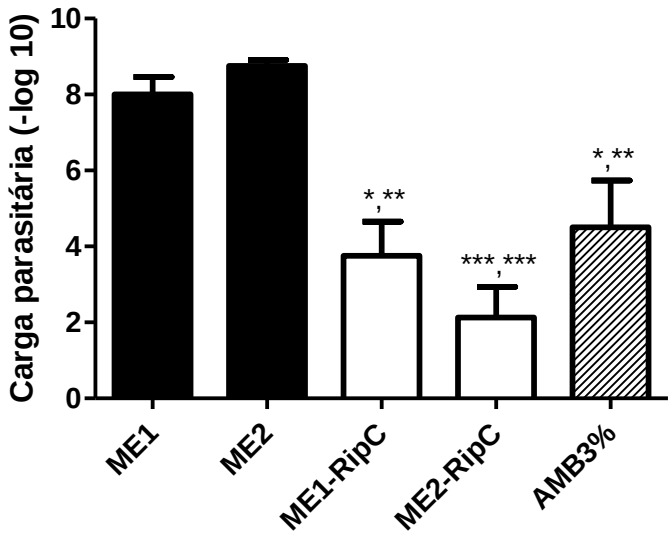
ME1 e ME2– microemulsão sem RipC; ME1-RipC e ME2-RipC – microemulsão com 1% de RipC; AMB3% - AMB3% - gel de polaxamer contendo 3% de anfotericina B. TGP - transaminase glutâmico-pirúvica. Os dados estão expressos como Média±erro padrão da média. a: $p<0,05$ em relação ao grupo ME2. Anova one way seguido por Teste de Bonferroni. b: $p<0,01$ em relação ao grupo ME1. c: $p<0,05$ em relação ao grupo ME2. d: $p<0,05$ em relação ao grupo ME1. e: $p<0,05$ em relação ao grupo ME2. Teste exato de Fisher.

Na avaliação da toxicidade *in vivo* das formulações, não foram observadas alterações significativas no peso dos animais no ínicio e no final do tratamento, com $p>0,05$ (Tabela 7). Além disso, ao serem observados diariamente não houve presença de sinais de toxicidade aguda nos animais tratados. Quanto aos parâmetros laboratoriais de hematócrito, função renal e função hepática, os resultados foram semelhantes aos apresentados por animais normais conforme BARBOSA et al. (2017). Não foram observadas diferenças significativas entre os controles ME1 e ME2 e grupos que receberam ME1-RipC, ME2-RipC e AMB3%, com $p>0,05$. Os valores de referência para tais dados laboratoriais podem ser descritos na

literatura: hematócrito (37,4-51,7%) (SANTOS et al., 2016); uréia (41,97-60,02 mg/dL) (ALMEIDA et al., 2008); creatinina (0,2 – 0,7 mg/dL), TGO (66-410 U/L) e TGP (0-340 U/L) (MOHAMEDALI et 2017). Dessa forma, pode-se observar a ausência de toxicidade do tratamento proposto para os parâmetros avaliados.

Com o objetivo de corroborar os dados de redução de tamanho de lesões, foi realizada a quantificação da carga parasitária das lesões. Na Figura 10, observa-se claramente a redução do número de parasitas recuperados nas lesões dos animais tratados em relação ao grupos controles, com uma redução de 53,1 a 57,1% para ME1-RipC, 73,4 a 75,7% para ME2-RipC, 43,75 a 48,57 para AMB3%, em relação as médias de ME1 e ME2, respectivamente. Apesar de apenas ME2-RipC e AMB3% reduzirem de forma estatisticamente significativa o tamanho das lesões e a % ulceração, houve redução da carga parasitária nos 3 grupos, com destaque para ME2-RipC.

Figura 10. Avaliação da carga parasitárias das lesões.



ME1 e ME2– microemulsão sem RipC; ME1-RipC e ME2-RipC – microemulsão com 1% de RipC; AMB3% - gel de polaxamer contendo 3% de anfotericina B. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação aos grupos ME1 e ME2. Anova one way seguido por Teste de Bonferroni.

De acordo com os resultados até aqui apresentados para o estudo *in vivo*, tais achados apresentam mais uma evidência da eficácia terapêutica das formulações testadas RipC e com resultados semelhates aos apresentados por PINHEIRO et al. (2016) e PARIHAR et al. (2016). Isto demonstra um forte indicativo da eficácia do tratamento com as formulações testadas. Aliado a este resultado, a alta taxa de liberação *in vitro*, o reduzido tamanho de gotícula e a capacidade de ME1-RipC e ME2-RipC em penetrar a pele dos animais no estudo

de permeação *in vitro*, proporcionam uma habilidade a tais formulações de cruzar a epideme e agir sobre os parasitas localizados na derme, diminuindo, assim, a progressão da doença (RUIZ et al., 2014).

ME1-RipC e ME2-RipC apresentam excelente potencial para aplicação tópica, podendo compor um sistema de liberação de fármacos para o tratamento da leishmaniose cutânea. O experimento em questão encontra-se em andamento quanto a análise histopatológica das lesões e isto poderá trazer evidências adicionais da eficácia terapêutica da RipC em microemulsão no modelo experimental avaliado.

4. CONCLUSÃO

As ME são importantes sistemas de liberação de fármacos que promovem a penetração cutânea de fármacos. Foi possível a incorporação de RipC em dois sistemas microemulsionados, apesar da sua baixa solubilidade aquosa. Não houve significativas alterações em suas características físico-químicas com a incorporação de RipC, além de demonstrar boa estabilidade físico-quimica. As formulações apresentaram bom tamanho de gotícula e potencial zeta, com destaque para ME2-RipC.

A metodologia analítica desenvolvida pode ser utilizada como método de controle de qualidade e demonstrou ser de fácil execução, de baixo custo, utiliza solventes poucos tóxicos e aplicável a pequenos laboratórios que não dispõem de métodos cromatográficos. Além disso, as formulações apresentaram bons perfis de cinética de liberação *in vitro* e com diferentes modelos cinéticos e foram capazes de permear a pele da região dorsal de camundongos Balb/c, novamente com destaque para ME2-RipC.

No estudo de atividade antileishmania *in vivo*, as formulações avaliadas foram capazes de retardar o desenvolvimento das lesões leishmanióticas e frequência de ulceração em relação aos grupos controles, com $p<0,05$ apenas para ME2-RipC e AMB3%. ME1-RipC, ME2-RipC e AMB3% foram capazes de reduzir de forma estatisticamente significativa a carga parasitária nas lesões em relação a ME1 e ME2. Foi observado a ausência de toxicidade do tratamento proposto para o parâmetros avaliados de peso, hematócrito, função renal e hepática e ausência de sinais clínicos de toxicidade aguda.

Desta forma, as MEs obtidas tem potencial para aplicação tópica, podendo compor um sistema de liberação de fármacos para o tratamento da leishmaniose cutânea.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.S.; FALEIROS, A.C.G.; TEIXEIRA, D.N.S.; COTA, U. A.; CHICA, J.E.L. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **J. Bras. Patol. Med. Lab**., v. 44, n. 6, p. 429-432, 2008.

ARAÚJO, E. J. F.; REZENDE-JÚNIOR, L. M.; LIMA, L. K. F.; SILVA-JÚNIOR, M. P. D.; SILVA, O. A.; SOUSA NETO, B. P., ALMEIDA, A. A. C.; GUTIERREZ, S. J. C.; TOMÉ, A. D. R.; LOPES, L. D. S.; FERREIRA, P. M. P.; LIMA, F. D. C. A. Pathophysiological investigations, anxiolytic effects and interaction of a semisynthetic riparin with benzodiazepine receptors. **Biomed. Pharmacother.** v.103, p.973-981, 2018.

ASH, M.; ASH, I. **Handbook of Green Chemicals**. 2. ed. USA: Synapse Information Resource Inc., 2004.

BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A.; SARRUF, F. D.; TAVANTE-JÚNIOR, C. R.; PINTO, C. A. S. O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E. P. G.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Rev. Bras. Ciên. Farm.** v. 44, n. 2, p. 233-248, 2008.

BABY, A. R.; LACERDA, A. C. L.; KAWANO, Y.; VELASCO, M. V. R.; KANEKO, T. M. PAS-FTIR and FT-Raman qualitative characterization of sodium dodecyl sulfate interaction with an alternative stratum corneum model membrane. **Pharmazie**, v. 62, n.10, p.727-731, 2007.

BARBOSA, B.S.; PRAXEDES, E.A.; LIMA, M.A.; PIMENTEL, M.M.L.; SANTOS, F.A.; PARMENEDES, D.B.; LELIS, I.C.N.G.; MACEDO, M.F.; BEZERRA, M.B. Perfil hematológico e bioquímico de camundongos da linhagem Balb-c. **Acta Sci. Vet.** v. 45, p. 1477, 2017.

BEKHIT, A.A.; EL-AGROUDY, E.; HELMY, A.; IBRAHIM, T.M.; SHAVANDI, A.; BEKHIT, A.E.A. Leishmania treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. **Eur. J. Med. Chem.** v. 160, p.229-244, 2018.

BENIGNI, M.; PESCINA, S.; GRIMAUDO, M.A.; PADULA, C.; SANTI, P.; NICOLI, S. Development of microemulsions of suitable viscosity for cyclosporine skin delivery. **Int. J. Pharm.** v. 545, n.1-2, p.197-205, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de estabilidade de produtos cosméticos.** Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. 2.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilânica Sanitária. Resolução - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 – Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília: Anvisa, 2017.

BRITO, M.R.M., PELÁEZ, W.J., FAILLACE, M.S., MILITÃO, G.C.G., ALMEIDA, J.R.G.S., ARGÜELLO, G.A., SZAKONYI, Z., FÜLÖP, F., SALVADORI, M.C.,

TEIXEIRA, F.S., FREITAS, R.M., PINTO, P.L.S., MENGARDA, A.C., SILVA, M.P.N., DA SILVA FILHO, A.A., DE MORAES, J. Cyclohexene-fused 1,3-oxazines with selective antibacterial and antiparasitic action and low cytotoxic effects. **Tox. *in vitro***. v. 44, p.273–279, 2017.

CALLENDER, S.P.; MATHEWS, J.A.; KOBERNYK, K.; WETTIG, S.D. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **Int. J. Pharm**. v. 526, n. 1-2, p. 425-442, 2017.

CAMPOS, J. S.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de Lafoensia pacari A. ST-HIL. em emulsão não-iônica. **Rev. Bras. Ciên. Farm.**, v. 32, n. 3, p. 363-368, 2011.

CARVALHO, A. L. M.; SILVA, J.A.; LIRA, A.A.; CONCEIÇÃO, T.M.; NUNES, R.D.E.S.; DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R.L.; SARMENTO, V.H.; LEAL, L.B.; DE SANTANA, D.P. Evaluation of microemulsion and lamellar liquid crystalline systems for transdermal zidovudine delivery. **J. Pharm. Sci.**, v. 105, n. 7, p. 2188-2193, 2016.

CARVALHO, A.L.M.; SILVA, J.A.; LIRA, A.A.M.; ALMEIDA, E.D.P.; NUNES, R.S.; SARMENTO, V.H.V.; VERAS, L.M.C.; DE ALMEIDA LEITE, J.R.; LEAL, L.B.; DE SANTANA, D.P. Third-Generation Transdermal Delivery Systems Containing Zidovudine: Effect of the Combination of Different Chemical Enhancers and a Microemulsion System. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, p.7, p. 1-9, 2018.

CARVALHO, A.M. VASCONCELOS, L.F.; RIOS, E.R.; DIAS, M.L.; SILVA, M.I.; DE FRANÇA FONTELES, M.M.; FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.; DE SOUSA, F.C. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methil-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chem. Biol. Interact**., v.205, n.3, p.165-172, 2013a.

CARVALHO, R. F.; RIBEIRO, I. F.; MIRANDA-VILELA, A. L.; SOUZA FILHO, J.; MARTINS, O.P.; CINTRA E SILVA, DDE. O.; TEDESCO, A. C.; LACAVA, Z.G.; BÁO, S. N.; SAMPAIO, R. N. Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA–DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. **Exp. Parasitol**. v. 135, p. 217-222, 2013b.

CATÃO, R. M. R. BARBOSA-FILHO, J.M.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; SILVA, M.A.R.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.N.P. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus.* **Rev. Bras. Anál. Clín**., v.42, n.1, p.9-14, 2010.

COÊLHO, E.S.; LOPES, G.L.N.; PINHEIRO, I.M.; HOLANDA, J.N.P. ALVES, M.M.M.; CARVALHO NOGUEIRA, N.; CARVALHO, F.A.A.; CARVALHO, A.L.M. Emulgel based on amphotericin B and bacuri butter (Platonia insignis Mart.) for the treatment of cutaneous leishmaniasis: characterization and in vitro assays. **Drug Dev. Ind. Pharm**. v. 44, n.10, p.1713-1723, 2018.

COSTA, L.M.; DE MACEDO, E.V.; OLIVEIRA, F.A.; FERREIRA, J.H.; GUTIERREZ, S.J.; PELÁEZ, W.J.; LIMA, F.C.; DE SIQUEIRA JÚNIOR, J.P.; COUTINHO, H.D.; KAATZ, G.W.; DE FREITAS, R.M.; BARRETO, H.M. Inhibition of the NorA efflux pump of Staphylococcus aureus by synthetic riparins. **J. Appl. Microbiol**. v. 121, n.5, p.1312-1322, 2016.

DAAR, J.; KHAN, A.; KHAN, J.; KHAN, A.; KHAN, G.M. Studies on self-nanoemulsifying drug delivery system of flurbiprofen employing long, medium and short chain triglycerides. **Pak. J. Pharm. Sci**. v. 30, n.2, p.601-606, 2017.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**. v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

DAR, M.J.; DIN, F.U.; KHAN, G.M. Sodium stibogluconate loaded nano-deformable liposomes for topical treatment of leishmaniasis: macrophage as a target cell. **Drug Deliv.** v.25, n.1, p.1595-1606, 2018.

DONG, X.; ZHU, Q.; DAI, Y.; HE, J.; PAN, H.; CHEN, J.; ZHENG, Z.P. Encapsulation artocarpanone and ascorbic acid in O/W microemulsions: Preparation, characterization, and antibrowning effects in apple juice. **Food Chem.** v. 192, p. 1033–1040, 2016.

ELFIYANI, R.; AMALIA, A.; PRATAMA, S.Y. Effect of Using the Combination of Tween 80 and Ethanol on the Forming and Physical Stability of Microemulsion of Eucalyptus Oil as Antibacterial. **J. Young Pharm**. v. 9, n.1, s1-s4, 2017.

FIGUEIREDO, K.A.; MEDEIROS, S.C.; NEVES, J.K.; DA SILVA, J.A.; DA ROCHA TOMÉ, A.; CARVALHO, A.L.; DE FREITAS, R.M. *In vivo* evaluation of anticonvulsant and antioxidant effects of phenobarbital microemulsion for transdermal administration in pilocarpine seizure rat model. **Pharm. Bioch. Behav.** v. 131, p. 6-12, 2015.

FIGUEREDO, K. A. ; NEVES, J. K. O. ; SILVA, J. A. ; MENDES, R ; CARVALHO, A. L. M. Phenobarbital loaded microemulsion: development, kinetic release and quality control. **Braz. J. Pharm. Sci.** v. 52, p. 251-264, 2016.

GARCIA, D.C., PEREIRA, A.C., GUTIERREZ, S.J., BARBOSA-FILHO, J.M., LEMOS, V.S., CÔRTES, S.F., Structure-related blockage of calcium channels by vasodilator alkamides in mice mesenteric artery. **Vasc. Pharmacol.** v. 82, p. 60–65, 2016.

GHOTLOO, S.; HOSEINI, M. H.; ALIMOHAMMADIAN, M. H.; KHAZE, V.; MEMARNEJADIAN, A.; ROSTAMI, A. Immunomodulatory effects of chitin microparticles on *Leishmania major*-infected BALB/c mice. **Parasitol. Int.** v. 64, p. 219-221, 2015.

GUTIERREZ, S. J. C. Synthesis of Bowdenol, a dihydrobenzofuranoid isolated from *Bowdichia virgilioides* and preparation of derivatives of Riparina isolated from *Aniba riparia* with potential biological activity. 2007. 134f. (Tese) Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. UFPB/CCS. João Pessoa-PB.

HASHEM, F. M.; SHAKER, D. S.; GHORAB, M. K. G.; NASR, M.; ISMAIL, A.. Formulation, Characterization, and Clinical Evaluation of Microemulsion Containing Clotrimazole for Topical Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 3, p. 879 – 886, 2011.

ISLAMUDDIN, M.; CHOUHAN, G.; FAROOQUE, A.; DWARAKANATH, B.S.; SAHAL, D.; AFRIN, F. Th1-biased immunomodulation and therapeutic potential of Artemisia annua in murine visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected. Trop. Dis**. v. 9, n. 1, e3321, 2015.

ISLAMUDDIN, M.; CHOUHAN, G.; TYAGI, M.; ABDIN, M.Z.; SAHAL, D.; AFRIN, F. Leishmanicidal activities of Artemisia annua leaf essential oil against Visceral Leishmaniasis. **Front. Microbiol**. v.5, p.626, 2014.

KAUR, G.; MEHTA, S.K. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. **Int. J. Pharm**. v. 529, n.1-2; v.134-160, 2017

KHALIL, E.A.; ALKAWAREEK, M.Y.; OTHMAN, G.; TBAKHI, B.; AL-BAKRI, A.G. Evaluation of paromomycin sulphate permeation using *ex vivo* human skin model. **Pharm. Dev. Technol**. p.1-4, 2018.

KLEIN, T. Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetilico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra esporotricose. 114. f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP, 2007.

LAHIRY, S.; DAS, A.K.; DAS, S.N.; MANNA, M. Ethanolic leaf extract of Coccinia grandis is effective against both drug resistant and drug sensitive clinical isolates of Indian Kala-azar. **J. Parasit. Dis**. v. 42, n. 3, p.433-441, 2018.

LIMA, M.P.D.; LOPES, E.M.; GOMES, L.D.S.; FRANÇA, A.R.S.; ACHA, B.T.; CARVALHO, A.L.M.; ALMEIDA, F.R.C. Technological development of microemulsions with perspectives for pain treatment: a patent review. **Expert. Opin. Ther. Pat**. v. 28, n. 9, p.691-702, 2018.

MAHDI, E.S.; SAKEENA, M.H.; ABDULKARIM, M.F.; ABDULLAH, G.Z.; SATTAR, M.A.; NOOR, A.M. Effect of surfactant and surfactant blends on pseudoternary phase diagram behavior of newly synthesized palm kernel oil esters. **Drug. Des. Devel. Ther.** v. 5, p. 311-323, 2011.

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; TORRES, E.C.; BARUD HDA, S.; ZOCCAL, K.F.; FACCIOLI, L.H.; HORI, J.I.; BERRETTA, A.A. Physicochemical characterization by AFM, FT-IR and DSC and biological assays of a promising antileishmania delivery system loaded with a natural Brazilian product**. J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 123, p.195-204, 2016.

MEHTA, S. K.; KAUR, G. Microemulsions: Thermodynamic and Dynamic Properties. In: TADASHI, M. (Ed.). **Thermodynamics**. Croatia: In Tech., 2011.

MOHAMEDALI, K.A.; NIU, G.; LUSTER, T.A.; THORPE, P.E.; GAO, H.; CHEN, X.; ROSENBLUM, M.G. Pharmacodynamics, Tissue Distribution, Toxicity Studies and Antitumor Efficacy of the Vascular Targeting Fusion Toxin VEGF121/rGel. **Biochem. Pharmacol.** v. 84, n.11, p.1534-1540, 2012.

MORAIS, A.R.V.; SILVA, A.L.; COJEAN, S.; BALARAMAN, K.; BORIES, C.; POMEL, S.; BARRATT, G.; DO EGITO, E.S.T.; LOISEAU, P.M. In-vitro and in-vivo antileishmanial activity of inexpensive Amphotericin B formulations: Heated Amphotericin B and Amphotericin B-loaded microemulsion. **Exp. Parasitol**. v.192, p.85-92, 2018.

MORI CORTÉS, N.; LORENZO, G.; CALIFANO, A.N. Food grade microemulsion systems: Sunflower oil/castor oil derivative-ethanol/water. Rheological and physicochemical analysis. **Food. Res. Int**. v. 107, p. 41-47, 2018.

NAZAR, M.F.; YASIR SIDDIQUE, M.; SALEEM, M.A.; ZAFAR, M.; NAWAZ, F.;, ASHFAQ, M.; KHAN, A.M.; ABD UR RAHMAN, H.M.; TAHIR, M.B.; MAT LAZIM, A. Fourth-Generation Antibiotic Gatifloxacin Encapsulated by Microemulsions: Structural and Probing Dynamics. **Langmuir.** v. 36, n. 36, p.10603-10612, 2018.

NUNES, G.B.L. COSTA, L.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; NUNES, L.C.C.; FREITAS, R. M. Prospecção científica e tecnológica da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). **Cad. Prospec.**, v.6, n.4, p.447-458, 2013.

NUNES, G.B.L.; POLICARPO, P.R.; COSTA, L.M.; DA SILVA, T.G.; MILITÃO, G.C.; CÂMARA, C.A.; BARBOSA FILHO J.M.; GUTIERREZ, S.J.; ISLAM, M.T.; DE FREITAS, R.M. *In vitro* antioxidant and cytotoxic activity of some synthetic riparin-derived compounds. **Molecules.** v. 19, p. 4595-4607, 2014.

OLEJNIK, A.; GLOWKA, A.; NOWAK, I. Release studies of undecylenoyl phenylalanine from topical formulations. **Saudi. Pharm. J.** v. 26, n.5, p.709-718, 2018.

OLLIARO, P. et al. Harmonized clinical trial methodologies for localized cutaneous leishmaniasis and potential for extensive network with capacities for clinical evaluation. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 12, n.1, p. e0006141, 2018.

PADULA, C.; TELÒ, I.; DI IANNI, A.; PESCINA, S.; NICOLI, S.; SANTI, P. Microemulsion containing triamcinolone acetonide for buccal administration. European **J. Pharm. Sci.** v. 115, p. 233-239, 2018.

PARIHAR, S.P.; HARTLEY, M.A.; HURDAYAL, R.; GULER, R.; BROMBACHER, F. Topical Simvastatin as Host-Directed Therapy against Severity of Cutaneous Leishmaniasis in Mice. **Sci. Rep**. v. 6, p.33458, 2016.

PATEL, M.R.; PATEL, R.B.; PARIKH, J.R.; PATEL, B.G. Novel microemulsion-based gel formulation of tazarotene for therapy of acne. **Pharm. Dev. Technol.** 2016 v. 21, p.921-932, 2016.

PATEL, V.; KUKADIYA, H.; MASHRU, R.; SURTI, N.; MANDAL, S. Development of Microemulsion for Solubility Enhancement of Clopidogrel. **Iran J. Pharm. Res**. v. 9, n. 4, p.327–334, 2010.

PATEL, M.R.; PATEL, R.B.; PARIKH, J.R.; PATEL, B.G. Microemulsion based novel carrier for topical delivery of an antiacne drug. **AAPS J.** v. 13, p. T2162, 2011.

PATEL, R.B.; PATEL, M.R.; BHATT, K.K; PATEL, B.G. Formulation consideration and characterization of microemulsion drug delivery system for transnasal administration of carbamazepine. **Bull. Facul. Pharm.** v. 51, n. 2, p. 243-253, 2013.

PINHEIRO, I.M.; CARVALHO, I.P.; DE CARVALHO, C.E.; BRITO, L.M.; DA SILVA, A.B.; CONDE JÚNIOR, A.M.; DE CARVALHO, F.A.; CARVALHO, A.L. Evaluation of the *in vivo* leishmanicidal activity of amphotericin B emulgel: An alternative for the treatment of skin leishmaniasis. **Exp. Parasitol.** v. 164, p.49-55, 2016.

PONTE-SUCRE, A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, J. C.; BARRETT, M. P.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; POUNTAIN, A. W.; MWENECHANYA, R.; PAPADOPOULOU, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 11, n. 12, p. e0006052, 2017.

RUIZ, H. K.; SERRANO, D. R.; DEA-AYUELA, M. A.; BILBAO-RAMOS, P. E.; BOLÁS-FERNÁNDEZ, F.; TORRADO, J. J.; MOLERO, G. New amphotericina B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and *Leishmania spp*. **Int. J. Pharm**. v. 473, p. 148-157, 2014.

SANTIAGO, R.F. et al. Riparin B, a Synthetic Compound Analogue of Riparin, Inhibits the Systemic Inflammatory Response and Oxidative Stress in Mice. **Inflammation**., v.38, n.6, p.2203-2215, 2015.

SANTOS, E.W.; OLIVEIRA, D.C.; BELTRAN, J.S.O.; SILVA, G.B.; TSUJITA, M.; CARMO, L.S.; CRISMA, A.R.; FOCK, R.A.; BORELLI, P. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**., v. 53, n. 2, p. 138-145, 2016.

SHAH, N.; SETH, A.; BALARAMAN, R.; SAILOR, G.; JAVIA, A.; GOHIL, D. Oral bioavailability enhancement of raloxifene by developing microemulsion using D-optimal mixture design: optimization and in-vivo pharmacokinetic study. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 44, p.687-696, 2018.

SHUKLA, T.; UPMANYU, N.; AGRAWAL, M.; SARAF S.; SARAF, S.; ALEXANDER, A. Biomedical applications of microemulsion through dermal and transdermal route. **Biomed Pharmacother.** v. 108, p.1477-1494, 2018.

SILVA, R.O.; DAMASCENO, S.R..; SILVA, I.S.; SILVA, V.G.; BRITO, C.F.; TEIXEIRA, A.E.; NUNES, G.B.; CAMARA, C.A.; FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H.; BARBOSA, A.L.; FREITAS, R.M.; MEDEIROS, J.V. Riparin A, a compound from Aniba riparia, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chem. Biol. Interact.** v. 5, p. 55-63, 2015.

SOARES, M.; VITORIANO, C.; SOUSA, J.; PAIS, J. Permeação cutânea: desafios e oportunidades. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**., v. 36, n. 3, p.337-348, 2015.

SYED, H.K.; PEH, K. K. Identification of phases of various oil, surfactant/ co-surfactants and water system by ternary phase diagram. **Acta. Pol. Pharm**. v.71, n.2, p.301-9, 2014.

TAVARES, G.S.V.; MENDONÇA, D.V.C.; MIYAZAKI, C.K.; LAGE, D.P.; SOYER, T.G.; CARVALHO, L.M.; OTTONI, F.M.; DIAS, D.S.; RIBEIRO, P.A.F.; ANTINARELLI, L.M.R.; LUDOLF, F.; DUARTE, M.C.; COIMBRA, E.S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; ROATT, B.M.; MENEZES-SOUZA, D.; BARICHELLO, J. M.; ALVES, R.J.; COELHO, E.A.F. A Pluronic® F127-based polymeric micelle system containing an antileishmanial molecule is immunotherapeutic and effective in the treatment against Leishmania amazonensis infection. **Parasitol. Int.** v. 68, n.1, p.63-72, 2019.

TSAI, Y. H.; CHANG, J. T.; CHANG, J. S.; HUANG, C. T.; HUANG, Y. B., WU, P. C. The effect of component of microemulsions on transdermal delivery of buspirone hydrochloride. **J. Pharm. Sci.** v. 100, n. 6, p. 2358-2365, 2011.

ÜSTÜNDAĞ OKUR, N.; APAYDIN, S.; YAVAŞOĞLU, N. U. K.; YAVAŞOĞLU, A.; KARASULU, H. Y. Evaluation of skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. **Int. J. Pharm.** v. 416, n. 1, p. 136-144, 2011.

VAN BOCXLAER, K.; GAUKEL, E.; HAUSER, D.; PARK, S.H.; SCHOCK, S.; YARDLEY, V.; RANDOLPH, R.; PLATTNER, J.J.; MERCHANT, T.; CROFT, S.L.; JACOBS, R.T.; WRING, S.A. Topical Treatment for Cutaneous Leishmaniasis: Dermato-Pharmacokinetic Lead Optimization of Benzoxaboroles. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 62, n. 5, p.e02419-17, 2018.

VAN BOCXLAER, K.; YARDLEY, V.; MURDAN, S.; CROFT, S.L. Topical formulations of miltefosine for cutaneous leishmaniasis in a BALB/c mouse model. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 7, p.862-872, 2016.

VARIKUTI, S.; OGHUMU, S., SALJOUGHIAN, N.; PIOSO, M.S.; SEDMAK, B.E.; KHAMESIPOUR, A.; SATOSKAR, A.R. Topical treatment with nanoliposomal Amphotericin B reduces early lesion growth but fails to induce cure in an experimental model of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana*. **Acta Trop**, v. 173, p. 102-108, 2017.

VASCONCELOS, A.S.; OLIVEIRA, I.C.; VIDAL, L.T.; RODRIGUES, G.C.; GUTIERREZ, S.J.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, S.M.; DE FRANÇA FONTELES, M.M.; GASPAR, D.M.; DE SOUSA, F.C. Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. **Fundam. Clin. Pharmacol.,** v.29, n.4, p.394-403, 2015.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly epidemiological record**. v. 91, n. 22, p. 285 - 296, 2016.

YI-HUNG, T.; JUNG, T. C.; JUI-SHENG, C.; CHI-TE, H.; YAW-BIN, H.; PAO-CHU, W. The Effect of Component of Microemulsions on Transdermal Delivery of Buspirone Hydrochloride. **J. Pharm. Sci.** v. 100, n. 6, p. 2358-2365, 2011.

7. CONCLUSÃO

- A partir do estudo de prospecção de alvos bioquímicos em estudos de docagem molecular foi possível encontrar várias proteínas que desempenham importantes funções biológicas nos parasitas, sendo um excelente ponto de partida para os estudos de docagem molecular realizados neste trabalho.
- As riparinas A-F apresentaram uma potente ação citotóxica *in vitro* em formas promastigotas de *Leishmania major*, principalmente para RipC e RipE. As moléculas com maior atividade citotóxica contra o parasita, RipC e E, apresentaram IS de 7,22 e 12,90, respectivamente. As RipD e F apresentaram bons resultados de atividade antileishmania, porém com menor IS.
- Quanto ao perfil ADME-Tox, as riparinas A-F apresentaram pequenas diferenças quanto a suas propriedades físico-químicas, principalmente para polaridade e solubilidade aquosa. Todas elas mostraram perfil adequado para *drug-likeness.* O LogP foi um importante parâmetro para as diferenças encontradas de atividade antileishmania *in vitro* entre as moléculas.
- Nos estudos por docagem molecular, os ligantes apresentaram Ki<1 μM para *Lm*NMT e *Lm*LEI. Foram encontradas interações moleculares importantes em resíduos do sítio ativo e de regiões adjacentes de tais enzimas.
- As riparinas apresentam um excelente potencial para aplicação na terapêutica antileishmania, principalmente para as riparinas C, D, E e F que apresentaram os melhores perfils de resultados *in silico* e *in vitro.*
- Foi possível a incorporação de RipC em dois sistemas microemulsionados, apesar da sua baixa solubilidade aquosa. Não houve significativas alterações em suas características físico-químicas com a incorporação de RipC.
- As formulações apresentaram excelente tamanho de gotícula e potencial zeta, com destaque para ME2-RipC.
- A metodologia analítica desenvolvida pode ser utilizada como método de controle de qualidade e demonstrou ser de fácil execução, de baixo custo, utiliza solventes poucos tóxicos e que pode ser aplicado em pequenos laboratórios.
- As formulações apresentaram excelente estabilidade físico-química em 180 dias a temperatura ambiente e em testes de estresse térmico e ciclo gelo-degelo.

- As formulações apresentaram bons perfis de cinética de liberação *in vitro*, com uma liberação de ME2-RipC 1,3x superior a ME1-RipC. Tais formulações foram capazes ainda de permear a pele da região dorsal de camundongos Balb/c, novamente com destaque para ME2-RipC.
- No estudo de atividade antileishmania *in vivo*, ME1-RipC, ME2-RipC e AMB% foram capazes de retardar o desenvolvimento das lesões leishmanióticas e a frequência de ulcerações em relação aos grupos controles, com $p<0,05$ apenas para ME2-RipC e o controle positivo AMB3%. ME1-RipC, ME2-RipC e AMB3% foram capazes de reduzir de forma estatisticamente significativa a carga parasitária nas lesões em relação a ME1 e ME2.
- Foi observado a ausência de toxicidade do tratamento proposto para o parâmetros peso, hematócrito, função renal e hepática e ausência de sinais clínicos de toxicidade aguda.
- As MEs obtidas tem potencial para aplicação tópica, podendo compor um sistema de liberação de fármacos para o tratamento da leishmaniose cutânea.

PERSPECTIVAS

- A partir dos melhores resultados da interação de RipC na docagem molecular, pode-se melhor avaliar a ação das riparinas em alvos de *Leishmania major* através de estudos de dinâmica molecular, técnica computacional que avalia a evolução temporal das posições e velocidades dos átomos do complexo proteína-ligante.

- Realizar avaliação terapêutica da eficácia clínica da associação de ME2-RipC com a administração da terapia convencional parenteral de anfotericina B e/ou antimoniato de meglumina, de forma a possibilitar de redução de doses, tempo de tratamento e/ou o número de complicações do tratamento com fármacos convencionais.

- Realizar avaliação da retenção no extrato córneo da pele de camundongos Balb/c após estudo de permeação cutânea utilizando a técnica de "tape stripping".

ANEXOS

Carta de aprovação do Comitê de Ética No Uso de Animais

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Screening de moléculas naturais e desenvolvimento de bioprodutos tecnológicos para o tratamento das leishmanioses**", registrada nº **265/'16**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. FERNANDO AÉCIO DE AMORIM CARVALHO do Departamento de Bioquímica e Farmacologia/ CCS/ UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **05/05/2017**.

Sub-Projetos:

1. "Screening de biomoléculas para o tratamento das Leishmanioses".

2. "Desenvolvimento tecnológico de uma microemulsão contendo riparina para o tratamento das Leishmanioses: obtenção, caracterização e avaliação farmacológica me-rip-leish".

3. "Desenvolvimento tecnológico e atividade *in vivo* de emulgel tópico leishmanicida de anfotericina B+ *platonia insignis* Mart.".

Finalidade	**( ) Ensino ( ) Pesquisa Científica**
Vigência da Autorização	**Junho/ 2017 à Junho/ 2021**
Espécie/Linhagem/raça	**1. Camundongo isogênico/ Balb/c** **2. Caprino/ Mestiço**
Nº de Animais	**1. 485** **2. 01**
Peso/ Idade	**1. 25 g/ 2-4 semanas** **2. 77 kg/ 2 anos**
Sexo	**1. 245 Machos e 240 Fêmeas** **2. 01 Macho**
Origem	**Camundongos: Biotério do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais- NPPM/ CCS/ UFPI.** **Ovino: Biotério do Centro de Ciências Agrárias/ UFPI.**

Teresina, 05 de Maio de 2017.

Profª. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

Trabalhos apresentados em eventos científicos



MEDLAB | V Congresso Norte-Nordeste de Medicina Laboratorial

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **PROSPECÇÃO DE DOCAGEM MOLECULAR DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS PARA A LEISHMANIOSE** de autoria de **KAYO ALVES FIGUEIREDO, Pós-Graduação Biotecnologia (RENORBIO) - Instituto Federal do Piauí; JÉSSICA FREIRE DA SILVA FIGUEIREDO, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Piauí; ANDRÉ LUIS MENEZES CARVALHO, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Piauí; FRANCISCO DE ASSIS ALVES LIMA, Professor Orientador Universidade Estadual do Piauí/Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)** apresentado na Modalidade Banner recebeu MENÇÃO HONROSA do V Congresso Norte-Nordeste de Medicina Laboratorial, realizado no período de 24 a 26 de novembro de 2016, no Centro de Convenções Atlantic City, Teresina, Piauí.

Teresina-PI, 26 de novembro de 2016.

Amanda Torres Nunes
Presidente do V MEDLAB

Antonio Carlos Mendes de Moura
Coordenador Científico do GPI Cursos

REALIZAÇÃO GPI cursos



CERTIFICADO

MEDLAB | Feira Hospitalar Piauí | 30 de Nov e 01 e 02 de Dez 2017 10h as 20h Atlantic City - Teresina-PI

Certificamos que o trabalho intitulado "AVALIAÇÃO IN SILICO POR DOCAGEM MOLECULAR DOS ANÁLOGOS ESTRUTURAIS DAS RIPARINAS EM PROTEÍNAS DE Leishmania major" de autoria de **KAYO ALVES FIGUEIREDO, RAYLA KELLY MAGALHAES COSTA, STANLEY JUAN CHAVEZ GUTIERREZ, ANDRÉ LUIS MENEZES DE CARVALHO, FRANCISCO DAS CHAGAS ALVES LIMA,** foi apresentado na modalidade Banner no **VI Congresso Norte-Nordeste de Medicina Laboratorial – VI MEDLAB** que aconteceu dia 02 de dezembro de 2017 no Centro de Convenções Atlantic City, Teresina, Piauí.

Teresina, PI, 02 de dezembro de 2017.

Diretor GPI Cursos
Starley Jone Nogueira Candeira

Presidente VI MEDLAB
Dra. Symonara Faustino

Apoio | Patrocínio | Patrocínio Master: Bioclin | Realização: GPI Cursos, SINDHOSPI



III EECF

Certificado

II Simpósio Internacional de Farmácia Clínica

Certificamos que **FIGUEIREDO, K.A; FIGUEIREDO, J.F.S; GUTIERREZ, S. J. C; CARVALHO, A. L.M; LIMA, F.C.A** pela apresentação do trabalho: "**ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS, FARMACOCINÉTICOS E TOXICOLÓGICOS IN SILICO DOS ANÁLOGOS ESTRUTURAIS DAS RIPARINAS"** na **modalidade ORAL** recebendo **MENÇÃO HONROSA** durante o III Encontro Estratégico de Ciências Farmacêuticas, II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos e do II Simpósio Internacional de Farmácia Clínica proferindo a realizado no período de 26 a 28 de Abril de 2017 na Universidade Federal do Piauí na cidade de Teresina, Piauí, Brasil.

Lívio César Cunha Nunes
Presidente

Apoio institucional: PPGCF UFPI | Co-organizadores: GQM | Patrocínio: ART FARMA, LAPON, FADEX, CRF-PI



IV Congresso Regional de BIOFÍSICA
Sociedade Brasileira de Biofísica
Do ensino à pesquisa

SBBf 124

A comissão Organizadora do IV Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica vem certificar que o trabalho intitulado "VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE RIPARINA C EM NANOCARREADOR TRANSDÉRMICO" da autoria de KAYO ALVES FIGUEIREDO; RAYLA KELLY MAGALHÃES COSTA; STANLEY JUAN CHAVEZ GUTIERREZ; ANDRÉ LUIS MENEZES CARVALHO; FRANCISCO DAS CHAGAS ALVES LIMA; foi apresentado em sessão pública durante a programação do evento que ocorreu de 04 a 08 de junho de 2018 na Universidade Federal do Piauí.

Teresina-PI: 08/06/2018

Profº Dr. Paulo Humberto Moreira Nunes
(Presidente do Evento)

Profº Dr. Antônio José da Costa Filho
(Presidente da SBBf)

Universidade Federal do Piauí
Departamento de Biofísica e Fisiologia/CCS

CNPq CAPES FAPEPI SINPPM PPGF SBBf

CERTIFICATE

We certify that the work EVALUATION OF IN VITRO RELEASE KINETICS OF RIPARIN C IN TRANSDERMAL NANOCARRIER, authorship of GLÁUCIA LAÍS NUNES LOPES , KAYO ALVES FIGUEIREDO, RAYLA KELLY MAGALHÃES COSTA, STANLEY JUAN CHAVEZ GUTIERREZ, ANDRÉ LUÍS MENEZES CARVALHO, was presented as POSTER PRESENTION at the IV Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences - Biological Drugs: From Technology to Pharmaceutical Care, held in São Paulo (SP), Brazil, from September 6 to 8, 2018.

Maria José Soares Mendes Giannini
President Congress

Teresa Dalla Costa
President ABCF

ABCF 15 ABCF

IV ABCF CONGRESS

ABCF - 2018
BRAZILIAN ASSOCIATION OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
Biological Drugs: from Technologies to Pharmaceutical Care
September 06 to 08, 2018
CENTRO FECOMERCIO DE EVENTOS, SÃO PAULO, SP

Artigo Publicado

Revista Virtual de Química

ISSN 1984-6835

Artigo

Prospecção de Alvos Bioquímicos para Estudo *in silico* na Quimioterapia Antileishmania

Figueiredo, K. A.; Figueiredo, J. F. S.; Costa, R. K. M.; Alves, M. M. M.; Magalhães, J. L.;* Carvalho, A. L. M.; Lima, F. C. A.

Rev. Virtual Quim., **2018**, *10* (5), 1485-1501. Data de publicação na Web: 1 de outubro de 2018

http://rvq.sbq.org.br

Prospecting Biochemical Targets for *in silico* Study for Antileishmania Chemotherapy

Abstract: The objective of this work is to carry out a prospection of docking molecular on biochemical targets of *Leishmania* sp. The scientific prospection was executed in May /2017 and based on the search for articles in the Virtual Health Library (VHL). In 2006-2017, 84 articles were selected from several countries, including India, Brazil and Mexico. In the classification of the Protein Data Bank (PDB), molecular targets were found belongs to oxidoreductases, hydrolases, transferases, isomerases, DNA, proteases, etc. The most important species of *Leishmania* sp. were *L. major, L. donovani, L. infantum, L. amazonensis*, etc. The 3 main molecular targets were found trypanothione reductase, pteridine reductase and topoisomerase I, besides various targets involved in the immune system, carbohydrate metabolism, ATP, nitrogen bases, amino acids, etc. It was possible to find the 3 most studied enzymes (trypanothione reductase - 2JK6; pteridine reductase 1 - 1E7W; topoisomerase I - 2B9S) what play important biological functions in the parasites and important molecular targets in antileishmania therapy.

Keywords: Leishmaniasis; *in silico*; docking; antileishmania therapy.

Resumo

O objetivo deste trabalho é realizar uma prospecção de estudos de docagem molecular em alvos bioquímicos de *Leishmania* sp. A prospecção de estudos de docagem molecular foi realizada em maio/2017 e com base na busca de artigos na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). No período de 2006-2017 foram selecionados 84 artigos de vários países, incluindo Índia, Brasil e México. Segundo a classificação do Protein Data Bank (PDB), foram encontrados alvos moleculares de oxidorredutases, hidrolases, transferases, isomerases, DNA, proteases, etc. As principais espécies de *Leishmania* sp. foram: *L. major, L. donovani, L. infantum, L. amazonensis*, etc. Os 3 alvos moleculares principais encontrados foram tripanotiona redutase, pteridina redutase e topoisomerase I, além de alvos diversos envolvidos no sistema imune, metabolismo dos carboidratos, ATP, bases nitrogenadas, aminoácidos, etc. Neste estudo, foi possível encontrar as 3 enzimas mais estudadas (tripanotiona redutase - 2JK6; pteridina redutase 1 - 1E7W; topoisomerase I - 2B9S) e que desempenham importantes funções biológicas nos parasitas e são promissores alvos moleculares para o desenvolvimento tecnológico de novos fármacos antileishmania.

Palavras-chave: Leishmaniose; *in silico*; docagem molecular; terapia antileishmania.

* Universidade Federal do Piauí, Departamento de Química, Centro de Ciências da Natureza, CEP 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

*janildo@ufpi.edu.br

DOI: 10.21577/1984-6835.20180101

Artigo submetido

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to
Journal of Medicinal Chemistry

Manuscript ID
jm-2018-019658

Title
Antileishmanial Activity of Riparin Structural Analogues of Aniba riparia: Biological Evaluation, In Silico Adme-Tox, and Molecular Docking

Authors
Figueiredo, Kayo
Costa, Rayla Kelly
Rocha, Jefferson
Gutierrez, Stanley Juan
Ramos, Ricardo
Alves, Michel
Carvalho, Fernando
Carvalho, André Luis
Lima, Francisco

Date Submitted
15-Dec-2018

Produto tecnológico - patente de invenção

1/1

RESUMO

"FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA MICROEMULSIONADA PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA"

Compreende-se a presente invenção como uma composição farmacêutica para tratamento da leishmaniose cutânea, contendo riparina C como agente ativo objetivando aumentar sua penetração cutânea e caracterizada por um composto medicamentoso na forma de microemulsão que possui altas taxas de liberação do fármaco, boa estabilidade fisico-química e que provê a uma excelente capacidade de permear membranas biológicas como a pele e reduzindo o tamanho das lesões, %ulceração e carga parasitária em animais infectados experimentalmente com *L. major*, podendo compor um medicamento para uso tópico, composto pela mistura dos seguintes componentes polissorbato 80, dietilenoglicol monoetil éter, miristato de isopropila, água purificada e riparina C, e preparada a frio por simples agitação, sendo industrialmente aplicável.