



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CRISTIAN KALLAHAN SILVA CHAGAS

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE ALCALOIDES DE
Aspidosperma nitidum Benth (Ex. Müll.Arg) E POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO.**

BELÉM - PARÁ
2024

CRISTIAN KALLAHAN SILVA CHAGAS

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE ALCALOIDES DE
Aspidosperma nitidum Benth (Ex. Müll.Arg) E POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO.**

Dissertação do mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fâni Dolabela.

Coorientadora: Andreza do Socorro Silva da Veiga

BELÉM - PARÁ
2024

CRISTIAN KALLAHAN SILVA CHAGAS

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE ALCALOIDES DE
Aspidosperma nitidum Benth (Ex. Müll.Arg) E POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO.**

Dissertação do mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador (a): Profa. Dra. Maria Fâni Dolabela

Coorientadora: Andreza do Socorro Silva da Veiga

Aprovado em: 05/02/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria Fâni Dolabela (Orientadora)

Prof^a. Dra. Vanessa Jóia de Mello (Membro interno)

Prof^a. Dra. Kelly Cristina Oliveira de Albuquerque (membro externo)

BELÉM - PARÁ
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

- C426a Chagas, Cristian Kallahan Silva.
ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE ALCALOIDES DE
Aspidosperma nitidum Benth (Ex. Müll.Arg) E POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO. / Cristian Kallahan Silva Chagas.
— 2024.
81 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof^ª. Dra. Maria Fâni Dolabela
Coorientação: Prof^ª. Dra. Andreza do Socorro Silva da
Veiga
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2024.
1. Aspidosperma nitidum. 2. Docagem. 3.
Leishmania. I. Título.

CDD 615.4

Dedico este trabalho à todas as pessoas com Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade, que já ouviram tantas vezes que jamais conseguiriam algo na vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a mim mesmo, por ter realizado esse trabalho mesmo com todas as dificuldades que o TDAH me traz diariamente, e ainda assim, ter escrito um trabalho o qual me orgulho muito.

Agradecerei também as forças superiores universais (Deus, se assim você preferir), que me acompanham diariamente iluminando meus pensamentos e afastando tudo que possa me fazer mal.

Aos meus pais, Eloisa Chagas e Valdir Gonçalves, por todos os ensinamentos, pela força, pela ajuda, pelo apoio, e principalmente pelo amor a mim fornecido desde 26 anos atrás, amo vocês demais.

Ao meu marido Thiago Leite, pela presença na minha vida, por não ter deixado eu desistir, por sempre estar ao meu lado me aconselhando, me jogando para cima quando principalmente, eu não estava acreditando em mim mesmo.

À minha orientadora Maria Fani Dolabela, por esses 6 anos de amizade, companheirismo, e conselhos, obrigado por ter me ajudado a desenvolver esse pesquisador e homem que sou hoje, nossa jornada que começou em 2017 culminou em uma amizade muito importante para mim.

À Otavio Braga, pelas risadas, pelos gritos, pelos conselhos, por me apoiar desde a época da pandemia, pelas horas que ficamos no discord, pelas chamadas de atenção, e principalmente, por me levantar e me ajudar quando eu não consegui sozinho.

À Ryan Sales, pelas conversas, pelo apoio, pelo carinho, pelas horas no discord, pelas chamadas de atenção, e por sempre, sempre, me levantar quando eu estava me sentindo para baixo.

À Jorge Nascimento, amigo, você sabe que meu carinho por você é maior que tudo, obrigado pelo apoio, por torcer por mim, por estar do meu lado sempre e me mostrar que amizades, devem ser, principalmente, confortáveis.

À Gleison Gonçalves, amigo, eu sempre serei, grato a você, obrigado pela ajuda nesse trabalho, você é alguém que sempre posso contar, que me ajudou a controlar meus surtos, minhas inseguranças, você é uma tranquilidade no meio da turbulência, muito obrigado mesmo.

À Isis Kosmisky, por ser uma amiga incrível, e companheira, uma das únicas pessoas que iria comigo na Brazz Brazz durante uma chuva, pode contar comigo para tudo.

Aos meus amigos do mestrado, Ana Carolina, Paulo Ricardo, Amanda Ramos, pelas risadas, pelas saídas, nossas vidas vão seguir um curso cada vez mais incrível, obrigado pela amizade, e sempre torcerei por cada um de vocês.

Ao meu casal, Luan Ramos e Anisia Barros, a ausência física de vocês do meu lado durante o mestrado foi sentida, sinto saudades demais de vocês, mas fico feliz ainda, que estamos juntos e sei que vocês vão ainda mais longe.

A Thais e Valeria pela amizade de anos, pelo carinho, pelo apoio, amizade, palavras de carinho, memes trocados, e risos verdadeiros.

Ao grupo MAHOU, formado pelos meus amigos Franklin, Igor Blackjacks, Igor Catueba, Juliana, João, Karen, Lucas Carrilho, Luiz Felipe, Lucas Oliveira, Raphaela, Ryan Sales e Évora Gardênia, e claro, o serzinho de luz que é Bernado, obrigado pelos risos, amizades, partidas de LOL e carinho, mal posso esperar para visitar vocês novamente.

As minhas queridas do PET-Farmácia Daiana Borges e Débora Correa, uma amizade formada pela orientação e pelo estágio docente, vocês duas vão absurdamente longe, obrigado pela amizade.

Ao Laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas por ter sido meu lar durante 7 longos anos.

À FAPESPA, pela bolsa fornecida que me permitiu fazer este trabalho.

Ao PPGCF, pela oportunidade de ter um diploma de mestrado em Ciências Farmacêuticas.

*We need love
But all we want is danger
We team up
Then switch sides like a record changer
The rumors are terrible and cruel
But honey, most of them are true*

*'Cause baby, I could build a castle
Out of all the bricks they threw at me
And every day is like a battle
But every night with us is like a dream
Baby, we're the new romantics
Come on, come along with me*

*Heartbreak is the national anthem
We sing it proudly
We are too busy dancing
To get knocked off our feet
Baby, we're the new romantics
The best people in life are free*

New Romantics – Taylor Swift

RESUMO

De *Aspidosperma nitidum* foram isolados alcaloides promissores para o tratamento da leishmaniose e estudos em microscopia eletrônica demonstraram alterações morfológicas no corpo celular, flagelo (diminuição do tamanho e flagelos duplos) e no seu citoplasma, principalmente na bolsa alveolar. Este trabalho tem como objetivo determinar o possível mecanismo de ação antileishmania de alcaloides de *A. nitidum*. Através da maceração do pó obtido das cascas foi obtido o extrato etanólico (EEAN), que foi submetido a partição ácido: base, obtendo-se as frações de neutros (FNAN) e de alcaloides (FAAN). A FAAN foi analisada através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjos Diiodos (CLAE-DAD) e da ressonância magnética nuclear de hidrogênio. Para os estudos de predição, Mcule para físico-química, PreADMET para farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade e VEGA também para Toxicidade, e para o docking o programa GOLD. Em todas as amostras EEAN (rendimento=5,1%) e FAAN (29,25%) foram detectados alcaloides em CLAE-DAD e RMN. A partir de FAAN obteve-se subfrações 5-6, diidrocorinanteol e subfração 9 apresentaram, de forma concentração-dependente, atividade contra a forma promastigota de *L. amazonensis*, causando principalmente alterações estruturais no citoesqueleto e no flagelo. Os estudos de predição apontam que apenas a Desoxicordifolina não seguiu a regra de Lipinski, baseado na toxicidade, as moléculas Aspodospermina, Diidrocorinanteol e Corinanteol parecem ser os mais promissores. No docking molecular, para a proteína actina (P1), o corinanteol foi o composto que melhor se ligou à proteína em comparação com o inibidor cristalografado, para a proteína do cinetócoro (P2), todos os compostos se ligaram melhor e de modo mais estável que o inibidor imidazol, para o transportador intraflagelar (P3), o corinanteol foi o composto que melhor se ligou à proteína em comparação com o GDP, e para a proteína BILBO2 (P4), o ligante cristalografado FPC4 foi superior a todas as moléculas estudadas. Em síntese, o corinanteol parece ser a molécula mais promissora atuando tanto no citoesqueleto quanto no flagelo, sendo que o diidrocorinanteol também atua no flagelo e citoesqueleto de modo menos eficaz.

Palavras-Chaves: *Aspidosperma nitidum*; Docagem; *Leishmania*.

ABSTRACT

Promising alkaloids for the treatment of leishmaniasis have been isolated from *Aspidosperma nitidum* and electron microscopy studies have shown morphological changes in the cell body, flagella (decrease in size and double flagella) and cytoplasm, especially in the alveolar pouch. The aim of this study was to determine the possible mechanism of antileishmanial action of *A. nitidum* alkaloids. By macerating the powder obtained from the bark, the ethanolic extract (EEAN) was obtained, which was subjected to an acid: base partition, obtaining the neutral (FNAN) and alkaloid (FAAN) fractions. The FAAN was analyzed using high-performance liquid chromatography coupled to Diode Arrays (HPLC-DAD) and hydrogen nuclear magnetic resonance. For the prediction studies, Molecule for physicochemistry, PreADMET for pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity and VEGA also for Toxicity, and for docking the GOLD program. In all the samples EEAN (yield=5.1%) and FAAN (29.25%) alkaloids were detected in HPLC-DAD and NMR. From FAAN, subfractions 5-6, dihydrocorinanteol and subfraction 9 showed concentration-dependent activity against the promastigote form of *L. amazonensis*, mainly causing structural changes in the cytoskeleton and flagellum. The prediction studies show that only Desoxychordifolin did not follow Lipinski's rule, based on toxicity, the molecules Aspidospermin, Dihydrocorinanteol and Corinanteol seem to be the most promising. In the molecular docking, for the actin protein (P1), corinanteol was the compound that bound better to the protein compared to the crystallographed inhibitor, for the kinetochore protein (P2), all the compounds bound better and more stable than the imidazole inhibitor, for the intraflagellar transporter (P3), corinanteol was the compound that bound better to the protein compared to GDP, and for the BILBO2 protein (P4), the crystallographically bound FPC4 was superior to all the molecules studied. In summary, corinanteol seems to be the most promising molecule acting on both the cytoskeleton and the flagellum, while dihydrocorinanteol also acts on the flagellum and cytoskeleton less effectively.

Keywords: *Aspidosperma nitidum*; Docking; Leishmania.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> spp.....	21
Figura 2 – Morfologia da <i>Leishmania</i>	22
Figura 3 - Incidência mundial de casos de leishmaniose cutânea em 2021.....	23
Figura 4 - Incidência mundial de casos de leishmaniose visceral em 2021.....	24
Figura 5 - <i>Aspidosperma nitidum</i> Benth. Ex Müll. Arg.....	26
Figura 6 – Compostos isolados de <i>A. nitidum</i>	28
Figura 7 - Cromatograma do extrato etanólico e espectrometria em ultravioleta da <i>Aspidosperma nitidum</i>	44
Figura 8 - Cromatograma da fração alcaloídica de <i>Aspidosperma nitidum</i> e espectros em ultravioleta dos picos de maior intensidade.....	45
Figura 9 – Espectro de RMN de H ¹	46
Figura 10 - Análises microscópicas da forma promastigota de <i>L. amazonensis</i> não tratadas e tratadas por 72 horas, com frações, subfrações, diidrocorinanteol obtidos das cascas de <i>A. nitidum</i>	48
Figura 11 – Moléculas escolhidas para os estudos In Silico.....	52
Figura 12 - Comparação entre as posições dos ligantes cristalografados (em azul) com a posição criada pelo programa (em vermelho)	61
Figura 13 - Interações entre a Proteína 1 e ligantes.....	64
Figura 14 - Interações entre a Proteína 2 e ligantes.....	67
Figura 15 - Interações entre a Proteína 3 e ligantes.....	70
Figura 16 - Interações entre a Proteína 4 e ligantes.....	16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da toxicidade aguda em roedores.....	41
Tabela 2 – Comparações de espectro de RMN ¹ H entre os do autor e da literatura.....	46
Tabela 3 – Predição de propriedades físico-químicas.....	53
Tabela 4 – Predição das propriedades farmacocinéticas.....	54
Tabela 5 – Predições de Toxicidade dos alcaloides.....	56
Tabela 6 – Resultados do Docking molecular.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADP – Adenosina Difosfato
ASP – Área de Superfície Polar
ASPD - Aspidospermina
BHE – Barreira Hematoencefálica
CAESAR - Computer-Assisted Evaluation of industrial chemical Substances
According to Regulations
CYP - Citocromo
CRN - Corinanteol
CCDC - Cambridge Crystallographic Data Centre
CC – Concentração Citotóxica
Cl₅₀ – Concentração Inibitória de 50%
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CH - ChemScore
DAD – Detector de Arranjo de Diodos
DMSO - Dimetiilsulfóxido
DL₅₀ – Dose Letal 50%
DCRN - Diidrocorinanteol
EE – Extrato Etanólico
FAZ - Zona de Ligação do Flagelo
FPC4 – Flagellar Pocket Collar 4
FN – Fração de Neutros
FA – Fração de Alcalóides
FrHEX – Fração Hexânica
FrDLC – Fração de Diclorometano
FrAcOEt – Fração Acetato de Etila
FrMeOH – Fração de Metanol
FDA – Food and Drug Administration
GS – GoldScore
GTP – Guanosina Trifosfato
QSAR - Quantitativa de Relações Estrutura-Atividade
GDP – Guanosina Difosfato

IFT25 – Transportador Intraflagelar 25
IFT27 - Transportador Intraflagelar 27
LC – Leishmaniose Cutânea
LMC – Leishmaniose Mucocutânea
LV – Leishmania Visceral
Logp – Logaritmo Partição Octanol-Água
MEOH - Metanol
MDCK – Madin Darby Canine Kidney
MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NTP - National Toxicology Program
NNN - Novy-Nicolle-Mcneal
PDB – Protein Data Bank
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium
RMSD – Root Mean Square Deviation
SF5-6 – Subfração 5
SF9 – Subfração 9
TMS - Tetrametilsilano
TR – Tempo de Retenção
 $\mu\text{g/mL}$ – Microgramas por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Leishmaniose	20
2.2 <i>Aspidosperma nitidum</i>	25
2.3 Estudos <i>in silico</i>	31
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Material	34
4.1.1 EQUIPAMENTOS	34
4.1.2 SOLVENTES, FASES ESTACIONÁRIAS E DEMAIS REAGENTES	34
4.1.3 MATERIAL PLÁSTICO, METAL E VIDRARIA	34
4.1.4 MEIO DE CULTURA E OUTROS.....	35
4.1.5 SOFTWARES E PROGRAMAS	35
4.1.6 MATERIAL BIOLÓGICO	36
4.1.6.1 Leishmania	36
4.1.6.2 Coleta e identificação do material vegetal	36
4.2 Métodos	36
4.2.1 ESTUDOS FITOQUÍMICOS.....	36
4.2.2 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA	37
4.2.2.1 Cultivo da leishmania.....	37
4.2.2.2 Ensaio antipromastigota	38
4.2.2.3 Análise microscópica	39
4.2.3 ESTUDO DE PREDIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, FARMACOCINÉTICA, FARMACODINÂMICA E TOXICOLÓGICA	40

4.2.6 DOCAGEM MOLECULAR	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Estudos Químicos	43
5.2. Avaliação da atividade antileishmania de <i>A. nitidum</i> por microscopia óptica	47
5.3 Estudo de Predição Farmacocinética, Farmacodinâmica e Toxicológica	51
5.4 Docagem molecular	58
6 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença causada por um protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, encontrada em mais de 90 países das regiões tropicais e subtropicais, sendo mais predominante em ambientes rurais do que em urbanos, entretanto, devido mudanças climáticas e atividades humanas (como o desmatamento) ocorre um aumento no número de casos nas áreas urbanas, devido principalmente à infecção de vetores urbanos (OLIVEIRA; DUTHIE; PEREIRA, 2020).

Esta doença possui diversas formas clínicas, categorizadas em cutânea (LC), caracterizada por lesões na pele, mucocutânea (LMC), que acomete principalmente mucosas, e a Visceral (LV), que é mais grave e letal, caso não haja tratamento, é caracterizada pela infecção do parasito no fígado, baço e medula espinhal (OLIVEIRA; DUTHIE; PEREIRA, 2020).

O tratamento das leishmanioses é realizado principalmente com os antimoniais pentavalentes (SB⁵⁺; Antimoniato de N-Metil glucamina-Glucantime® e o Estibogluconato de sódio-Pentostan®), que são quimioterápicos de alto custo, apresentam eventos adversos de elevada gravidade, além de casos de resistência ao tratamento (RIBEIRO, 1987; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018; OLIVEIRA; DUTHIE; PEREIRA, 2020). Como uma alternativa a esse tratamento, pode ser utilizada a anfotericina B e suas formulações (Anfotericina B lipossomal e Anfotericina B Dispersão-Coloidal). Entretanto, ainda é um fármaco bem tóxico e de alto custo, sendo necessária a supervisão clínica ou internação durante o tratamento (longa administração), devido os seus efeitos adversos, como nefrotoxicidade, hipocalcemia e miocardite (LANZA et al., 2019; OLIVEIRA; DUTHIE; PEREIRA, 2020).

Outro problema relacionado ao tratamento das leishmanioses é a resistência parasitária à múltiplos fármacos, a principal causa dessa resistência é ocasionada devido a variabilidade genética e mutações da *Leishmania*, já sendo descrito na literatura casos de falha terapêutica ou recidiva em pacientes tratados com o Estibogluconato de Sódio (SUNDAR et al., 2000), assim como resistência ao tratamento com Miltefosina (SRIVASTAVA et al., 2017; CARNIELLI et al., 2019). Devido isso, surge a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos menos tóxicos, mais baratos e que ajam contra os parasitos resistentes. Nesse contexto, a busca por compostos naturais presentes em plantas medicinais é muito forte, tendo

em vista seu uso no tratamento de diversas enfermidades por cerca de 80% da população (OLIVEIRA; DUTHIE; PEREIRA, 2020).

Dentre as diversas espécies utilizadas na medicina popular para o tratamento de ferida de difícil cicatrização (DEL VITO; PETENATTI; PETENATTI, 1997), a *Aspidosperma nitidum* Benth apresenta grandes evidências da sua atividade, sendo que todas suas frações alcaloídicas se demonstraram ativas contra *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*: FAlc₁ (Concentração Inibitória de 50%- CI₅₀: 3,417 µg/mL); FAlc₄ (CI₅₀: 2,692 µg/mL); FAlc₇ (CI₅₀: 5,449 µg/mL); FAlc₁₀ (CI₅₀: 4,284 µg/mL); FAlc₁₄ (CI₅₀: 25,12 µg/mL), mas apenas as frações FAlc₁ (CI₅₀: 5,114 µg/mL), FAlc₄ (CI₅₀: 8,699 µg/mL) e FAlc₇ (CI₅₀: 17,14 µg/mL) apresentaram atividade frente à *Leishmania* (V.) *braziliensis* (NASCIMENTO, 2013).

Em um estudo com extrato e frações de *A. nitidum*, verificou-se que o extrato etanólico e a fração alcaloídica, se mostraram ativos contra a forma promastigota de *L. (L.) amazonensis*, com CI₅₀ de 23,87 µg/mL e 18,8 µg/mL. As outras frações, hexânica e diclorometano, foram classificadas com atividade moderada (CI₅₀: 143,0 µg/mL e 204,5 µg/mL, respectivamente). Da fração alcaloídica obteve-se o diidrocorinanteol, que se mostrou mais ativo que o extrato e fração. As subfrações 5-6 (CI₅₀: 100,3 µg/mL) e 8-9 (CI₅₀: 62,4 µg/mL) foram consideradas ativas. As análises em microscopia de varredura foi observado que o diidrocorinanteol ocasionava mudanças na bolsa flagelar da forma promastigota da *L. amazonensis*, com o aparecimento de flagelos duplos ou curtos, sendo que essas alterações podem ser o mecanismo de ação para causar sua atividade leishmanicida (VEIGA et al., 2022).

Uma estratégia que pode ser utilizada para a investigação do possível mecanismo de ação é a docagem molecular. A docagem (ou *docking*) molecular consiste na predição da conformação bioativa de uma micromolécula, o ligante, a uma macromolécula, proteínas, enzimas, receptores, gerando um score e uma classificação do modo de ligação, desse modo, as predições realizadas a partir da docagem molecular, são mais específicas e confiáveis (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008).

Além disso, outros aspectos moleculares devem ser investigados, tais como suas características físico-químicas, farmacocinética e toxicidade. Neste contexto, os estudos *in silico* tem uma grande vantagem, devido a rapidez na sua execução, seu baixo custo e a capacidade de complementar os ensaios *in vitro* e *in vivo*, permitem

um maior direcionamento para aquelas moléculas que apresentam uma melhor predição físico-química e atividades biológicas, diminuindo assim, o número de animais utilizados (DE MACEDO-SILVA et al., 2013).

Tendo em vista todo esse contexto, estudos de predição com moléculas isoladas de *A. nitidum* podem contribuir para a compreensão do mecanismo de ação, aspectos físico-químicos, farmacocinéticos e toxicidade, direcionando quais seriam os compostos mais promissores. Deste modo, este trabalho é importante pois ao elucidar os mecanismos de ação é possível prever o comportamento do composto no corpo humano, assim como toxicidades, e planejar possíveis alterações no composto aprimorando suas propriedades físico-químicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leishmaniose

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas pelos protozoários de várias espécies do gênero *Leishmania*, podendo acometer, a pele, mucosas e vísceras. Classificação taxonômica do gênero *Leishmania* segundo Lainson & Shaw (1987).

- Reino: Protista Haeckel;
- Filo: Sarcomastigophora;
- Subfilo: Mastigophora;
- Classe: Zoomastigophorea;
- Ordem: Kinetoplastida;
- Família: Trypanosomatida;
- Gênero: *Leishmania*.

A infecção causada por espécies do gênero *Leishmania* inicia-se quando uma fêmea (não infectada) do *Lutzomia* ou do *Psychodopygus* alimenta-se em um hospedeiro vertebrado infectado. A fêmea durante o repasto sanguíneo irá se infectar com a forma amastigota do parasita, instalando-se no trato digestivo do vetor (mosquito flebotomíneo), multiplicando por divisão binária, migrando para o esôfago. Então, inicia o processo de metaciclogênese, que consiste na transformação de promastigotas procíclicos em promastigotas metacíclicos altamente infectivos (Figura 1; LAZAR; ABASS, 2020).

A fêmea infectada ao realizar o repasto sanguíneo, dilacera os tecidos e vasos sanguíneos, formando uma pequena cavidade onde poderá se alimentar, durante esse processo, irá regurgitar as formas promastigotas metacíclicas, e então, penetrar na corrente sanguínea do hospedeiro (RIBEIRO, 1987; ANTOINE et al., 1998).

Na corrente sanguínea, as formas promastigotas serão fagocitadas por células do sistema imunológico (macrófagos e neutrófilos), internalizadas no fagossoma, onde deveriam sofrer lise celular. Entretanto, devido adaptações evolutivas, estes parasitos possuem a capacidade de inibição destes mecanismos imunes (inibição dos lisossomos, inibição de estresse oxidativo), transformando-se na forma amastigota. Esta forma consegue se multiplicar por divisão binária, até ocasionar a ruptura das

células fagocitárias, liberando outras formas amastigotas na corrente sanguínea, que irão infectar outras células fagocitárias (LAZAR; ABASS, 2020).

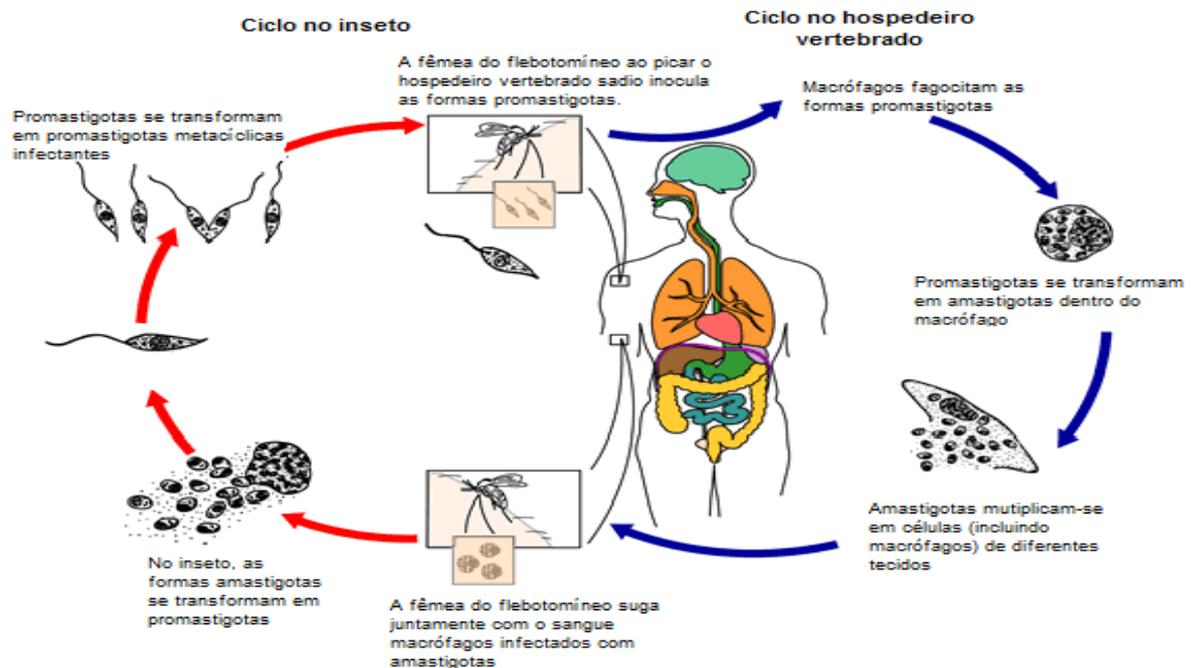


Figura 1 - Ciclo de vida do parasito *Leishmania* spp. Fonte: Adaptado de CDC, 2017

A forma amastigota é ovóide ou esférica, com vacúolos em seu citoplasma (contendo estruturas membranosas como complexo de Golgi, mitocôndria, ribossomos, etc.), um núcleo, um cinetoplasto e uma bolsa flagelar sem flagelo livre (Figura 2). Entretanto, com um flagelo não móvel interno, com funções de organização celular e percepção sensorial (GADELHA; CUNHA-E-SILVA; DE SOUZA, 2013; TEIXEIRA et al., 2013). A forma promastigota é alongada, medindo cerca de 5 a 20 μm , sendo observados o núcleo e os vacúolos, um cinetoplasto ovóide, uma bolsa alveolar, onde há um flagelo livre com função de locomoção, que apresenta um axonema clássico, com haste paraflagelar. A adesão do flagelo ao corpo da célula é mediada pela zona de ligação do flagelo (FAZ), esta parece estar associada a adaptação do tripanosomatídeos ao ambiente sanguíneo do hospedeiro (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011; HALLIDAY et al., 2021).

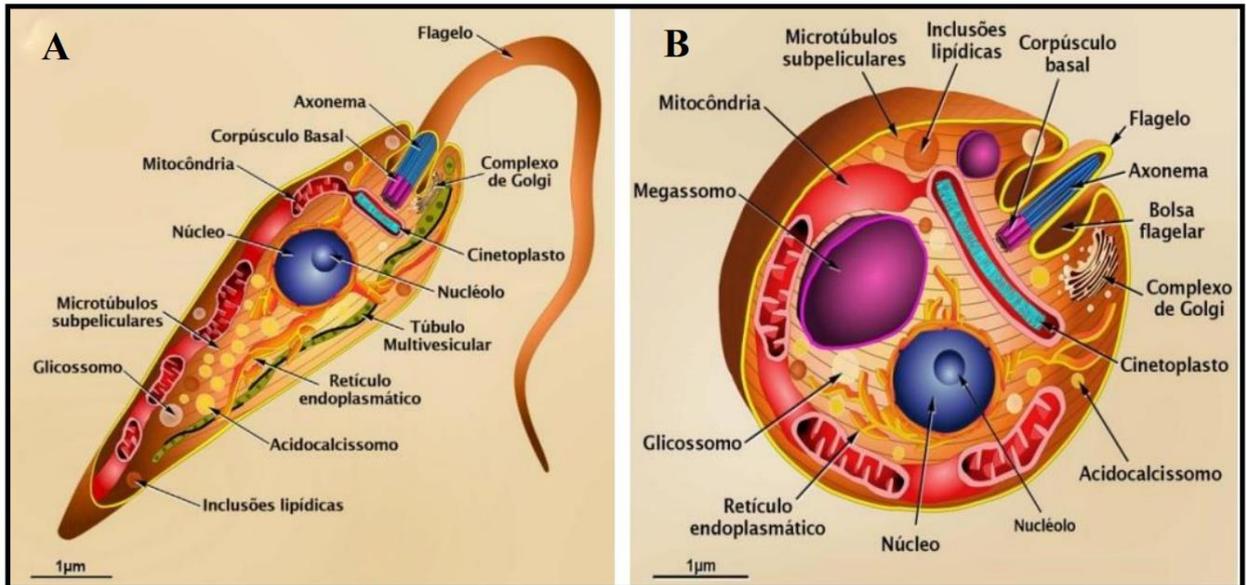


Figura 2 – Morfologia da *Leishmania*. Legenda: A: forma amastigota; B- forma promastigota. Fonte: QUEIROZ, 2019

Comumente associada à pobreza, condições precárias de habitação e falta de recursos, a leishmaniose é predominante em regiões subdesenvolvidas como África, Ásia e América Latina, estima-se que, cerca de 350 milhões de pessoas possuem risco de contrair essa doença (WHO, 2022), além disso, é possível delimitar que, populações com renda familiar menor que 2 dólares por dia, apresentam uma maior chance de contrair, tendo em vista que cerca de 80% dos casos ocorrem em famílias nessa faixa de renda (VIJAYAKUMAR; DAS, 2018). As principais formas clínicas das leishmanioses são: cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV) (OLIVEIRA; DUTHIE; PEREIRA, 2020).

A leishmaniose cutânea (ou tegumentar), é a forma mais comum das leishmanioses, geralmente do tipo úlcera, podendo ser única ou múltipla (até 10 lesões), com tendência à cura espontânea e apresenta boa resposta ao tratamento. Essa forma causa lesões cutâneas, principalmente as úlceras, deixando cicatrizes permanentes na pele e resultando em incapacidade grave, ou evoluir para cura com uma cicatriz. Em casos de pacientes imunodeprimidos pode evoluir para o estado de leishmaniose cutânea difusa, caracterizada pela intensa proliferação do parasito e presença disseminada de nódulos múltiplos não ulcerativos (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021).

Além disso, é possível outra forma de evolução da LC, que é a leishmaniose mucocutânea, apresentando-se como uma lesão crônica, que se caracteriza por acometer mucosas com lesões destrutivas, principalmente nas vias aéreas superiores, podendo levar à destruição parcial ou total das mucosas do nariz, boca e garganta (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021).

Cerca de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Em 2021, mais de 85% dos novos casos de Leishmaniose cutânea ocorreram em países desta área, como o Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Líbia, Paquistão, Peru, República Árabe da Síria e Tunísia (Figura 3: WHO, 2022).

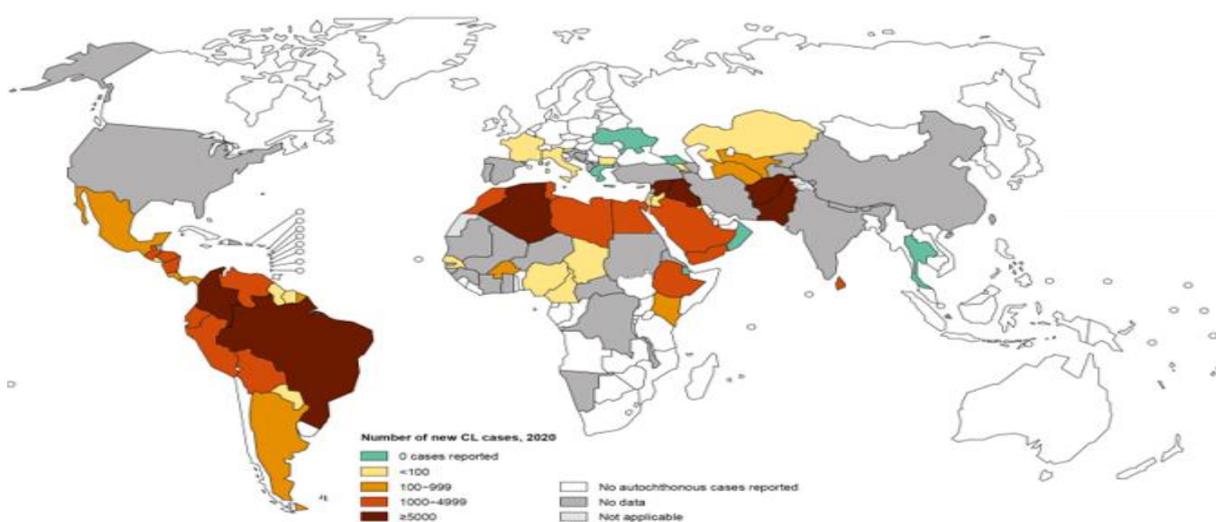


Figura 3 - Incidência mundial de casos de leishmaniose cutânea em 2021. Fonte: WHO, 2022

A leishmaniose visceral, também conhecida como doença de calazar (ou Kala-Azar), é a forma mais grave e fatal da doença. Manifesta-se com escurecimento da pele, perda de peso, hepatoesplenomegalia, causada principalmente pelas espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania chagasi*, nestas os parasitos promovem infecção em órgãos distantes como fígado, baço e medula óssea (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021). Em relação à LV, em 2021 foram registrados 12.838 novos casos de no mundo, sendo que, cerca de 90% destes, ocorreram em apenas 10 países, o

Brasil, China, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Iêmen (Figura 4, WHO, 2022).

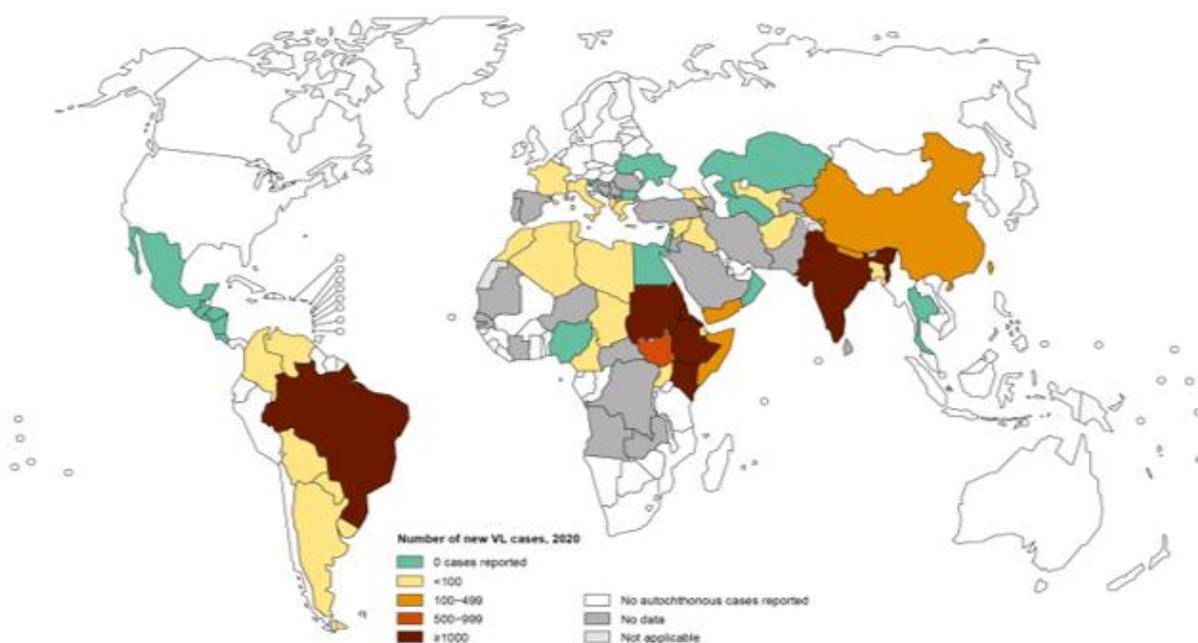


Figura 4 - Incidência mundial de casos de leishmaniose visceral em 2021. Fonte: WHO, 2022).

As principais espécies que causam a doença são: *Leishmania major* e a *Leishmania tropica*, afetando principalmente no sul da Europa, Ásia e África; a *L. mexicana* nas Américas Central e do Sul e a *L. braziliensis*, na América do Sul. No Brasil são encontrados os dois subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*), que são classificadas de acordo com o desenvolvimento e a proliferação dos parasitos no trato digestivo do vetor, e cerca de 8 espécies, assim como as principais formas clínicas: a *L.(L.) infantum* (LV), *L. (L.) amazonensis* (LC e LCD), *L. (V.) braziliensis* (LC e LMC), *L. (V.) guyanensis* (LC e LMC), *L. (V.) lainsoni* (LC), *L. (V.) naiffi* (LC), *L. (V.) shawi* (LC) e a *L. (V.) lindenberg* (LC) (GALVIS-OVALLOS et al., 2020).

O tratamento da leishmaniose de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes (Meglumina e Estibogluconato de Sódio), apesar de serem muito eficientes, há relatos de casos de resistência a esse fármaco, e apresenta diversos efeitos adversos, como náuseas, vômitos, fraqueza, erupções cutâneas, hepato e cardiotoxicidade, além da sua aplicação ser via parental e diária, que pode diminuir as

chances de adesão ao tratamento. A segunda linha de tratamento seria a Pentamidina, é um fármaco altamente tóxico, cujas reações adversas são vômitos, hipoglicemia, náuseas, vômitos, dor de cabeça, podendo apresentar complicações graves, como toxicidade cardíaca e gastrointestinal, nefrotoxicidade e hipotensão (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021; OLIVEIRA et al., 2021).

Em casos de resistência ao tratamento com os antimoniais pentavalentes e em condições clínicas como a infecção pelo vírus HIV que impedem a sua utilização, a Anfotericina B é a primeira linha de tratamento contra a leishmaniose visceral, apesar de ser eficaz ainda possui muitas reações adversas como nefrotoxicidade (contornada nas suas formas lipossomal e nanopartículas), anemia, hipocalcemia e febre. Em casos onde há tanto leishmaniose visceral quanto cutânea, pode ser utilizada a Miltefosina, apresenta menores reações adversas, como distúrbios gastrointestinais e nefrotoxicidade, porém, apresenta uma meia vida longa e é teratogênico (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021; OLIVEIRA et al., 2021)

É perceptível que todos os fármacos utilizados são muito tóxicos e apresentam diversas reações adversas, isso dificulta muitas vezes a adesão do paciente ao tratamento, que devido alto grau de desconforto, opta por descontinuar o tratamento, o que pode ocasionar a resistência do parasita a esses fármacos, como o Estibogluconato de Sódio (SUNDAR et al., 2000), e a Miltefosina (CARNIELLI et al., 2019), principalmente em áreas endêmicas, e a recidiva da doença. Nesse contexto, surge a necessidade de desenvolver novos fármacos com atividade antileishmania menos tóxicos e com formas farmacêuticas mais baratas e menos invasivas (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019).

Dentre as estratégias de busca de novos fármacos, está o estudo de plantas medicinais utilizadas muitas vezes por populações tradicionais como única forma de tratamento, e dentre as espécies utilizadas, a *A. nitidum*, é uma das mais promissoras para o tratamento de doenças causadas por protozoários.

2.2 *Aspidosperma nitidum*

A *Aspidosperma nitidum*, conhecida popularmente como Pau de Remo, Sapupema e carapanaúba, é comumente encontrada no continente americano, do Panamá até o Brasil. Apresenta seu tronco dividido longitudinalmente em lamelas

delgadas, com septos capazes de abrigar mosquitos (característica que deu origem ao nome Carapanaúba) (Figura 5: COINTE, 1947; OLIVEIRA et al., 2009).

De acordo com o estudo de Marcondes-Ferreira (1988):

A. nitidum caracteriza-se por árvores de 7 a 40 metros de altura com tronco trançado e sulcado ou lamelado. Sua casca é fina, dura, muito amarga e não exsuda látex quando cortada. Os ramos cinzentos ou castanhos, às vezes, comprimido, lateralmente com o pecíolo decorrente ao ramo, dando a esse um aspecto de ramo subalado. As lenticelas são alongadas ou esféricas, mas às vezes podem ser verruculosas. As folhas vão de cartáceas a coriáceas, elípticas, ovaladas ou obovadas de base arredondada, obtusa ou largamente revoluta pouco decorrente ao pecíolo. O ápice é arredondado, obtuso ou acuminado, podendo também às vezes ser cuspidado. O pecíolo varia entre 1 a 2 cm, com face superior glabra ou glabrascente, brilhante ou opaca, mas pode ser também glaucescente. A nervura principal é impressa na face superior e proeminente na face inferior. Inflorescência lateral ou subterminal, axilares ou subaxilares, formada por dicásios compostos modificados, podendo está abreviada, formando subfascículos. O cálice mede por volta de 2 mm com lobos ovais, de velutino a asparso-pubérulo. A corola vai de esverdeada a esbranquiçada; serícea com algumas partes glabra, tubo com 3-4 cm, lobos de 1 mm ovais e internamente com pelos longos, logo abaixo dos estames. Os estames estão inseridos no terço ou quarto do tubo superior, com anteras ovais que variam de 0,7 a 1 mm.

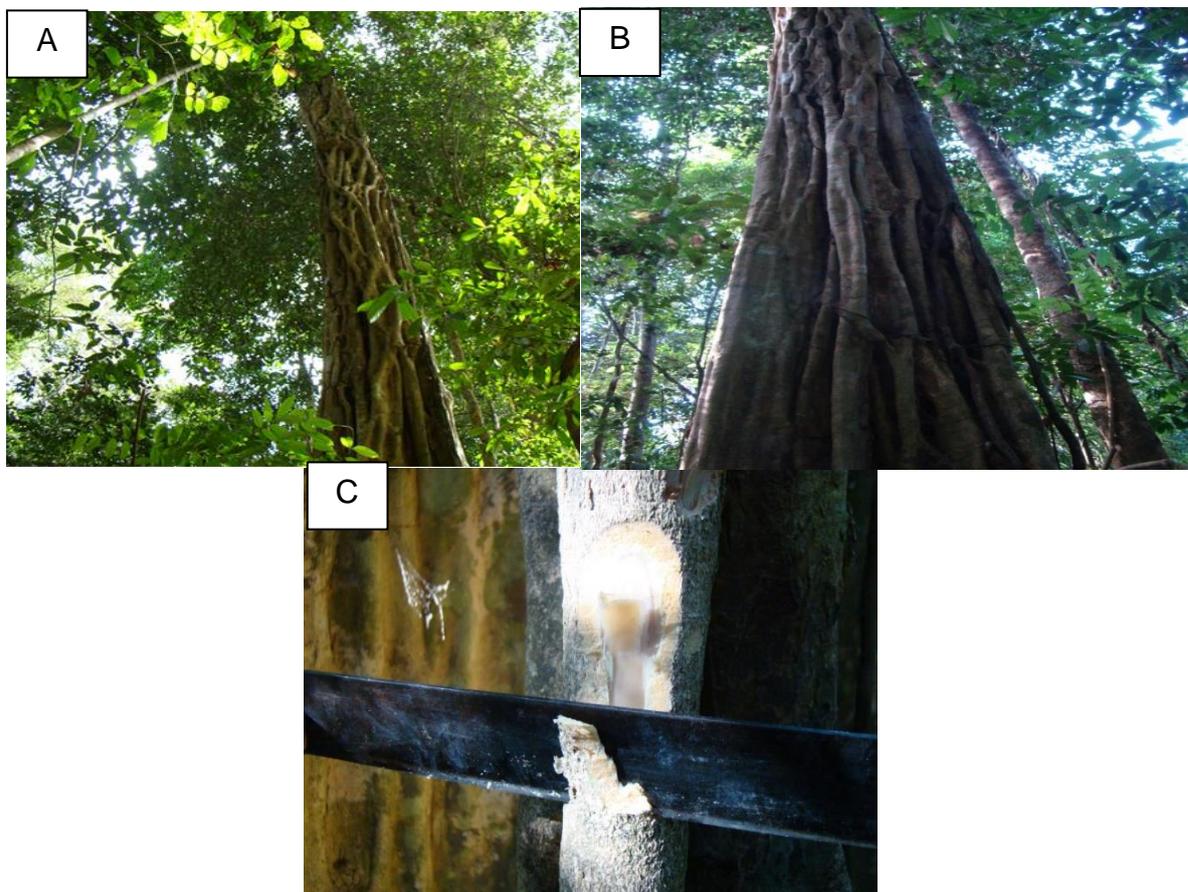


Figura 5 - *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. Arg. Legenda: A e B- Caule; C- casca do caule. Fonte: SANTOS-TRINDADE, 2014.

Estudos etnobotânicos com diferentes comunidades no Brasil e na Colômbia apontaram que a utilização da casca de *A. nitidum* por infusão é utilizada para tratar malária (MILLIKEN; ALBERT, 1997; AÑEZ, 2009; TOMCHINSKY et al., 2017), como contraceptiva (WENIGER et al., 2001), anti-inflamatória (ESTRELLA, 1995; WENIGER et al., 2001), e como cicatrizante em feridas de difícil cicatrização (ESTRELLA, 1995).

Na prospecção fitoquímica, através do método da precipitação do extrato etanólico das cascas de *A. nitidum* foi detectado a presença dos seguintes metabólitos: alcaloides, cumarinas, taninos condensados, triterpenos, esteróides e açúcares redutores (MATOS, 2009). Através da cromatografia em camada delgada já foram detectados alcalóides, triterpenos e esteroides (MARTINS, 2012). Apesar de utilizar métodos diferentes, a presença de alcalóides em ambos os métodos é sempre detectada, isso demonstra que esses compostos são os majoritários nessa espécie, como pode ser visto a seguir.

Diversos estudos fitoquímicos utilizando as cascas *A. nitidum* levaram ao isolamento e identificação de sitosterol, estigmasterol, lupeol e beta-amirina (Pereira et al. 2007). Além disso, foram isolados os seguintes alcaloides: 10-metoxidiidrocorinanteol, corinanteol (ARNDT et al., 1967), aspidospermina, quebrachamina, iombina (MARQUES et al., 1996), 3-harmanocarboxílico, braznitidumina, diidrocorinanteol (PEREIRA et al., 2007), ácido 3-metil-harmanocarboxílico, deshidrositsriquina (NASCIMENTO, 2013), desoxicordifolina e carapanaubina (Figura 6; SALES, 2019).

Dentre as atividades biológicas já estudadas de *A. nitidum*, já foi avaliada a atividade antimicrobiana das cascas do tronco, através do extrato etanólico, fração alcaloídica e fração de neutros da *A. nitidum*, frente à *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*. De forma geral, o EE, FN e FA não foram promissores para nenhuma das cepas, sendo que apenas o EE mostrou uma moderada atividade contra o *S. aureus* (CIM: 250 µg/mL) (BRÍGIDO et al., 2020).

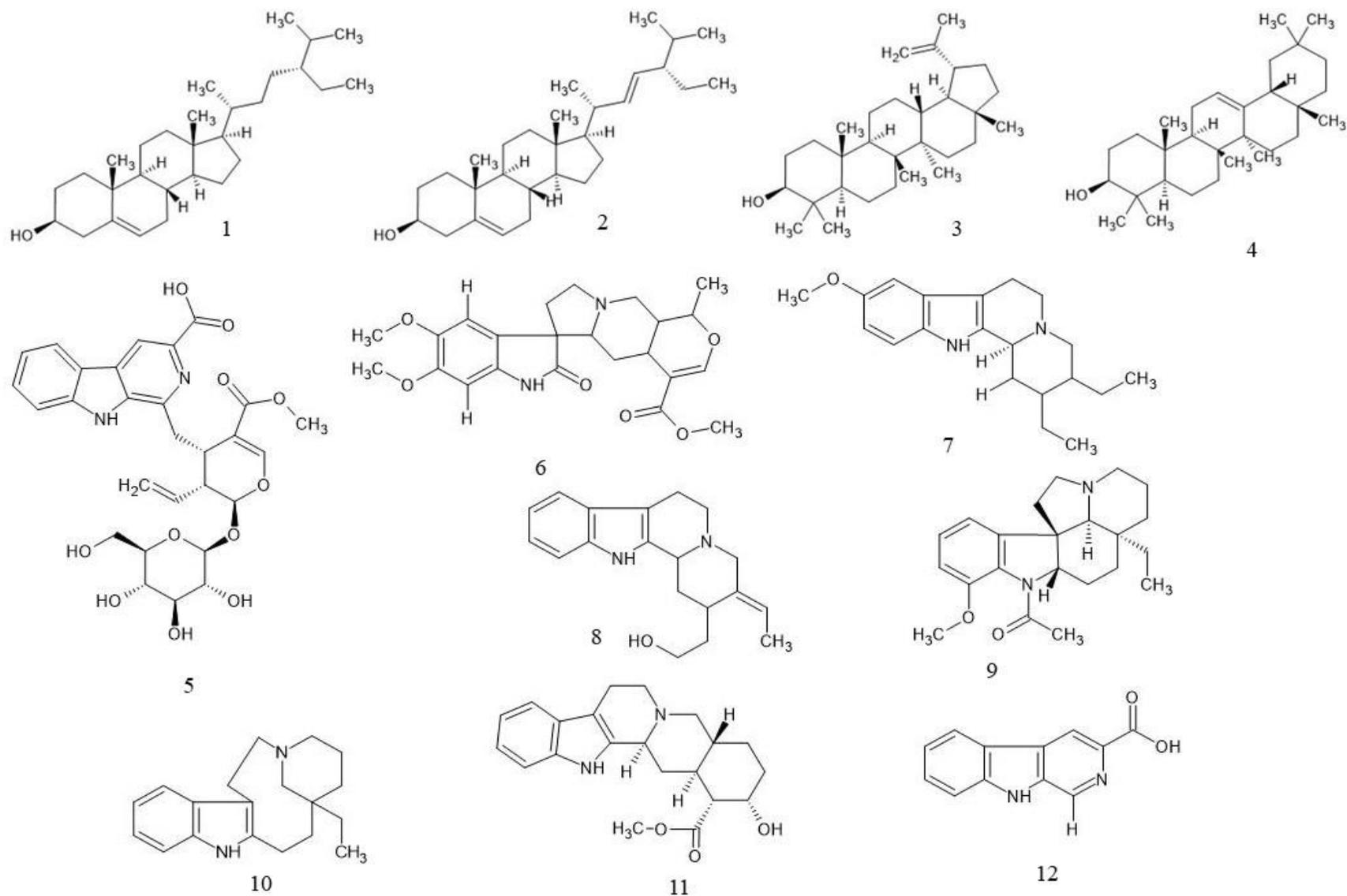


Figura 6 – Compostos isolados de *A. nitidum*. Legenda: 1: β -Sitosterol, 2: Estigmasterol, 3: Lupeol, 4: β -Amirina, 5: Desoxicordifolina, 6: Carpanaubina, 7: 10-metoxi-18,19-diidrocorinanteol, 8: Corinanteol, 9: Aspidospermina, 10: Quebrachamina, 11: Ioimbina, 12: Ácido Harmanocarboxílico. Fonte: Autor.

Um estudo avaliou a atividade antiplasmódica, contra o clone de *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina (W2), com o extrato e frações de neutros e alcaloídica obtidos das cascas da *A. nitidum*. O extrato ($CI_{50}=3,65 \mu\text{g/mL}$), a fração de neutros, ($CI_{50}=2,35 \mu\text{g/mL}$) e a fração alcaloídica ($CI_{50}=2,32 \mu\text{g/mL}$) apresentaram elevada atividade antiparasitária (BRANDÃO et al., 2020).

A atividade antileishmania do extrato etanólico das cascas *A. nitidum* e frações (FN e FA) foi avaliada em forma promastigota de *L. amazonensis*, sendo consideradas moderadamente ativas (EE: $CI_{50}=109,7 \mu\text{g/mL}$; FA= $137,1 \mu\text{g/mL}$ e FN= $169,1 \mu\text{g/mL}$). Entretanto, contra a forma amastigota, apenas o extrato e a fração alcaloídica foram ativos (VEIGA, 2013). Frações e subfrações obtidas do EE da casca da *A. nitidum*, bem como o diidrocorinanteol, foram avaliados contra a forma promastigota, onde se observou que o fracionamento contribuiu para a atividade (SF-5-6= $CI_{50}: 100,3 \mu\text{g/mL}$; SF-9= $CI_{50}: 62,4 \mu\text{g/mL}$ e Diidrocorinanteol= $CI_{50}: 62,4 \mu\text{g/mL}$) (VEIGA et al., 2022).

Visando identificar as alterações morfológicas na Leishmania durante a fase promastigota ocasionadas pelo EE, frações, subfrações e diidrocorinanteol foram realizadas análises utilizando microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Na microscopia eletrônica de varredura foram verificadas alterações concentração-dependentes, dentre elas estão septação da membrana e diminuição do flagelo na concentração de $25 \mu\text{g/mL}$ do diidrocorinanteol, em $12,5 \mu\text{g/mL}$, verificou-se o arredondamento da forma promastigota. No caso das frações SF5-6, diidrocorinanteol e SF9, as alterações também foram concentração-dependentes, em $50 \mu\text{g/mL}$ foi verificada a diminuição do tamanho do flagelo, flagelos duplicados, protuberâncias no flagelo e arredondamento da sua forma (VEIGA et al., 2022).

Na microscopia de transmissão, a fração dicloro ($50 \mu\text{g/mL}$) causou perda completa da morfologia normal, retração do corpo celular, bolsa flagelar dilatada com evaginação de sua membrana para formação de vesículas, além de vacuolização citoplasmática. As amostras tratadas com o diidrocorinanteol, na concentração de $25 \mu\text{g/mL}$, apresentaram desorganização citoplasmática, retração do corpo celular, perda completa da morfologia normal da bolsa flagelar, com vesículas provavelmente resultantes da evaginação da membrana da bolsa flagelar e presença de material com aspecto granular em seu interior vesículas. Já na concentração de $12,5 \mu\text{g/mL}$ promoveu o aparecimento de inclusões lipídicas, alteração da membrana da bolsa

flagelar, que apresentava vesículas com material granular decorrente dessa evaginação, e dilatação das cisternas do complexo de Golgi (VEIGA et al., 2022)

Em outro estudo observou-se que o extrato etanólico e a fração alcaloídica de *A. nitidum* reduziram o tamanho das úlceras ocasionadas por *L. amazonensis*, sendo que a resposta foi tempo dependente, sendo que o extrato se mostrou mais promissor reduzindo o tamanho da lesão 37,42% no 14º dia e 55,08% no 28º dia de tratamento. O tratamento com a fração alcaloídica não causou nenhuma redução, porém, causou uma redução na velocidade de crescimento da úlcera (BRÍGIDO, 2021).

Além disso, avaliando se o extrato e a fração alcaloídica causariam redução da parasitemia em animais infectados com *L. amazonensis*, o extrato etanólico, na dose de 200 mg/kg/dia causou redução da parasitemia em 23,64% no apenas no 28º dia, enquanto que, na dose de 400 mg/kg/dia de extrato etanólicos foi observado uma redução no 14º dia, de 11,4% e no 28º dia, redução 42,46%. Para a fração alcaloídica, na dose de 200 mg/kg/dia foi verificado uma redução de 7,69%, na dose de 400 mg/kg/dia, a redução foi de 22.1%. Em síntese, foi verificado que tanto o extrato quanto a fração alcaloídica, na dose de 400 mg/kg apresentaram um aumento de produção de interferon- γ após 28 dias, comparado ao Glucantime® (BRÍGIDO, 2021).

Avaliando a citotoxicidade em macrófagos murinos (BALB/c), do extrato e frações de *A. nitidum*, a fração diclorometano e a acetato de etila (>500 $\mu\text{g/mL}$), apresentaram a menor citotoxicidade, seguido do extrato etanólico (491,8 $\mu\text{g/mL}$) e a fração de metanol (473,0 $\mu\text{g/mL}$), podendo ser classificados como não citotóxicos, comparados com a Anfotericina B (>100 $\mu\text{g/mL}$) (VEIGA et al., 2021). Em um estudo avaliando a citotoxicidade das frações alcaloídicas contra linhagem HepG2 A16 (linhagem celular de mamíferos, HepG2 A16, procedente de um hepatoblastoma primário humano), todas as frações demonstraram ser menos tóxicas que a cloroquina, apresentando CC_{50} maior que 250 ($\mu\text{g/mL}$) (NASCIMENTO, 2013).

Avaliando a toxicidade aguda em camundongos machos, o extrato etanólico e a fração alcaloídica, na concentração de 2000 mg/kg não induziu nenhuma morte ou sintomas tóxicos em nenhum dos animais, nem apresentaram mudanças de comportamento, ganhos ou perdas de peso, alterações hematológicas, e com sua função renal intacta. Além disso, foi avaliado a toxicidade subaguda, com concentração de 1000/mg/kg por 28 dias, e igualmente nenhum animal morreu durante o experimento, nem apresentou mudanças de peso, nem mudanças

hematológicas ou renais. Nas análises morfológicas tanto o tecido cardíaco quanto o renal não apresentaram nenhuma alteração também (BRÍGIDO et al., 2021).

Dentre os estudos que já foram realizados, a maioria deles avalia atividade em extrato e frações, e não os compostos isolados, sendo que desse modo não é possível identificar qual seria o mecanismo de ação dos compostos estudados, dito isso, estudos computacionais podem ser utilizados para se conhecer a físico-química, farmacocinética, para entender como o composto se comporta nos tecidos humanos, além de ser possível prever as interações de um composto frente uma proteína específica.

2.3 Estudos *in silico*

Metodologias de predição computacional tem sido cada vez mais utilizadas na descoberta de novos princípios ativos, e descoberta de novos horizontes para princípios já descobertos e que poderiam ser utilizadas em outras patologias. Nesse sentido, o potencial dos métodos computacionais em diminuir o uso de modelos animais na pesquisa farmacológica, direcionar os estudos e recursos para substâncias mais promissoras, que apresentassem uma predição mais favorável dentre os compostos avaliados (BROGI et al., 2020).

Um dos campos de pesquisa computacional para o desenvolvimento de novos fármacos é a modelagem quantitativa de relações estrutura-atividade (QSAR), que desenvolveu muitos algoritmos importantes de predição de atividade, nos últimos 55 anos. O QSAR é definido por modelos de regressão linear, onde moléculas diferentes que apresentam a mesma atividade biológica (específica do alvo), o qual um composto x (denominado *símile*) é comparado com composto y (denominado *líder*), sendo possível através de cálculos, prever qual seria o comportamento deste composto x (denominada *comparação líder-símile*) (FUJITA; WINKLER, 2016).

São diversas aplicações do modelo QSAR, principalmente na predição de ADMETox, que vêm sendo aplicada nas indústrias químicas, agroquímicas, farmacêuticas e cosméticas no mundo todo. Por se tratar de uma ciência muito dinâmica e rápida, as bases de dados que utilizam métodos QSAR se retroalimentam, onde a informação ali presente é o tempo todo renovada e aprofundada, além do

surgimento de novos algoritmos, métodos de predição, que irão fazer parte desta rede de informação (MURATOV et al., 2020).

Outro modelo *in silico* muito utilizado é a docagem molecular, que utiliza modelos baseados em estrutura para prever a posição, orientação, e simular uma ligação entre o princípio ativo e o receptor, desse modo, se há ou não ativação de receptores. Nesse contexto, o docking molecular, é uma análise com maior nível de confiabilidade, pois é mais específico, pela sua simulação de comportamento entre o ligante e seu receptor (NETO et al., 2020).

Entre os benefícios da docagem molecular estão: seu baixo custo de realização, otimização de recursos financeiros, ao permitir escolher a substância que apresente os melhores resultados; prever reações adversas; causar o reposicionamento de fármacos já estabelecidos na indústria, para tratar de novas doenças, entre outros (PINZI; RASTELLI, 2019).

Dentre as proteínas relacionadas ao citoesqueleto e flagelo presentes na estrutura da *Leishmania* e *Trypanosoma*, estão: a Proteína 1, de código do PDB 7Q8C, é um filamento de actina ligado a um ADP, necessária para a manutenção do citoesqueleto da leishmanias, mudanças na sua capacidade estrutural (como inibição) causam a desestabilização do citoesqueleto (KOTILA et al., 2022).

Proteína 02, de código do PDB 6ZPJ, é uma proteína do cinetócoro, que se liga aos microtúbulos, devido isso, alterações nesta proteína poderiam causar mudanças no processo de divisão celular e a desestabilização dos microtúbulos (LUDZIA et al., 2021).

Proteína 03, de código do PDB 6IAE, é um transportador intraflagelar, similar a uma GTP-ASE, responsável pela estruturação do complexo flagelar devido seu papel na regulação de do tráfego membranar, a qual possibilita a origem de cílios e flagelos nos Cinetoplastideos, de modo que, alterações na atividade dessa proteína podem levar à má formação ciliar e flagelar (WACHTER et al., 2019).

Proteína 04, de código do PDB 7A1I, é a proteína BILBO2, complexada com um peptídeo flagelar, presente no colar da bolsa flagelar, que conecta o flagelo ao colar da bolsa flagelar, sendo vital para a manutenção das atividades metabólicas do parasito, sua inibição poderia causar desestabilização a da bolsa flagelar a mudanças flagelares (ISCH et al., 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial antileishmania de alcalóides isolados de *A. nitidum*.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar em termos químicos o extrato e frações de *A. nitidum*;
- Avaliar as alterações morfológicas causada pelas frações ocorridas na *L. (L) amazonensis*
- Predizer os parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e toxicidade de alcaloides isolados de *A. nitidum*.
- Analisar as interações intermoleculares através de docagem molecular dos alcalóides isolados de *A. nitidum* contra proteínas de *L. (L). amazonensis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 EQUIPAMENTOS

- Banho-maria
- Balança analítica Bel Engineering M214Ai
- Bomba de vácuo TECNAL TE-0581
- Bomba de aeração
- Banho de Ultrassom – Tecnal Equipamentos para laboratório, modelo 2210 Branson
- Capela de exaustão SP Labor
- Câmara de Neubauer
- Cromatógrafo da linha Alliance e2695 (Waters) acoplado a Detector de Arranjo de diodos
- Centrífuga Cientec Equipamentos para Laboratório, modelo CT-600R
- Destilador de água Tipo Pilsen SolidSteel
- Estufa de esterilização e secagem SolidSteel
- Estufa ventilada para secagem de material vegetal
- Evaporador rotatório fisaton, modelo R 803, com banho-maria modelo 558
- Leitor de microplacas (Biotek, modelo ELX 808)
- Micropipetas - volume ajustável 10µL - 100 µL, 100 µL - 1000 µL
- Microscópio óptico binocular 1600x Objetivas Acromáticas MIC-100 Marte
- Microscópio Biológico Trinocular Invertido – Opton
- Notebook modelo HP
- Geladeira modelo eletrolux

4.1.2 SOLVENTES, FASES ESTACIONÁRIAS E DEMAIS REAGENTES

- Metanol (Merck)

4.1.3 MATERIAL PLÁSTICO, METAL E VIDRARIA

- Balões de fundo redondo 250, 500 e 1000 ml

- Bastão de vidro
- Béqueres 10, 50, 100, 500 e 2000 ml
- Bisturi
- Cubas cromatográficas
- Dessecador de vidro
- Placa Petri 55mm de diâmetro
- Erlenmeyers 250 e 2000 ml
- Entellan
- Espátulas de metal
- Lâmina FirstLab 26x76 mm
- Lamínula Olen 24X60 mm
- Papel alumínio comercial
- Pinça
- Pipetas de vidro graduadas 2, 5 e 10 ml
- Pipeta Pasteur de vidro
- Placas cromatográficas de vidro 10x5 cm
- Placas de Cultura de Fundo Chato

4.1.4 MEIO DE CULTURA E OUTROS

- Anfotericina B (Cristália produtos farmacêuticos)
- Dimetilsulfóxido (DMSO; Dinâmica)
- Meio NNN
- Meio RPMI 1640 (Gibco)
- Giemsa

4.1.5 SOFTWARES E PROGRAMAS

- ChemSketch
- PreADMET
- ProTOX
- TopSpin 4.2.0
- CMCassist 2.25
- VEGA®

4.1.6 MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.6.1 Leishmania

As formas de leishmania foram cedidas pelo Instituto Evandro Chagas, Sob Registro MHOM/BR/2009/M26361, com origem em Ulianópolis – PA.

4.1.6.2 Coleta e identificação do material vegetal

A cascas de *A. nitidum* foram coletadas em Santa Bárbara do Pará, PA-Brazil (S 01° 10 '946' W 048° 11 '715') durante o mês de maio de 2013, e a espécie foi identificada pelo herbário do Museu Emilio Goeldi, sobre o número MG206608. O material foi retirado de dentro da mata virgem, sem causar danos ao vegetal, sendo coletadas pequenas porções. O projeto respeita e atende as diretrizes e legislações nacionais e internacionais, sendo registrado no Sistema Nacional de Gestão e Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), que concedeu licença para coleta das espécies sob registro A2C3188.

4.2 Métodos

4.2.1 ESTUDOS FITOQUÍMICOS

O material vegetal foi lavado, seco e submetido à moagem em moinho de facas, obtendo-se um pó, que foi subsequentemente, posto para macerar com álcool 96 °GL, por 7 dias, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Esse macerado foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida, até resíduo, em seguida, este concentrado foi acondicionado em frasco de vidro e armazenando em estufa a 40°C, até peso constante, obtendo assim, o extrato etanólico (EE) da *A. nitidum*. O EE foi submetido a uma partição ácido base para realização de estudos químicos, que originou a fração alcaloídica (FA) e a fração de neutros (FN), assim como foi submetido a uma nova extração sob refluxo, para os estudos antipromastigota, dando origem a 4 frações, a fração hexânica (FrHEX), fração diclorometano (FrDLC), fração

acetato de etila (FrAcOEt) e fração metanólica (FrMeOH). Da Fração dicloro, foi refracionada e obtidas as subfrações SF-5-6, SF-9 e o diidrocorinanteol.

O extrato e a fração alcaloídica foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a coleta dois espectros por segundo na região do ultravioleta e visível, na faixa entre 210 e 600 nm, utilizando o método exploratório. As separações foram realizadas em uma coluna de fase reversa Sunfire C18, o volume de amostra injetado foi de 20 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 40° C. A fase móvel constituiu-se de uma mistura de H₂O e MeOH (Merck). O gradiente exploratório linear de eluição usado foi de H₂O-MeOH 95:5 a 0:100 em 40 min com mais 5 min mantidos na última concentração. O fluxo do eluente foi de 1 mL/min. Os cromatogramas foram obtidos em 3 comprimentos de onda 340 nm, 254 nm e 212 nm.

Os espectros de Ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H foram obtidos em espectrômetro BRUKER AVANCE DRX 400 MHz. O solvente utilizado para solubilização das amostras foi o clorofórmio. Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Para processamento dos dados de espectro utilizou-se o programa TOPSPIN 3.0 – Bruker. O tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência interna.

4.2.2 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

4.2.2.1 Cultivo da leishmania

As formas promastigotas da espécie *L. (L) amazonensis* foram cultivadas em meio NNN (Novy-Nicolle-Mcneal) e posteriormente transferidas para o meio de crescimento RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium; Gibco) sendo mantidas através de passagens semanais, de maneira, através da transferência de 100 µL de suspensão das formas promastigotas do meio NNN para garrafas de cultura de células, cada uma contendo 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco) completo. A seguir, observou-se o cultivo em microscópio invertido para verificar a viabilidade das formas em meio RPMI 1640. O cultivo do parasito em meio RPMI completo foi feito a 25°C ± 1°C. Nas passagens posteriores partiu-se da suspensão de promastigotas em meio RPMI 1640, realizando-se uma diluição 1:1 (suspensão de promastigotas: meio RPMI

1640 completo), mantendo-se o cultivo na mesma condição de temperatura citada anteriormente.

4.2.2.2 Ensaio antipromastigota

A forma promastigota de *L. (L) amazonensis* (MHOM/BR/2009/M26361) foi obtida durante a fase logarítmica de crescimento e reunida por centrifugação em meio RPMI 1640 completo 3500 rpm por 10 minutos. O pellet foi ressuspendido em meio RPMI completo, as promastigotas quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração correspondente a 4×10^6 parasitos/100 μ L. Esta suspensão foi distribuída em placas de cultura de células com fundo chato previamente pré-dosificadas (100 μ L/poço) contendo o extrato etanólico, frações e substância pura nas seguintes concentrações: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 μ g/mL. Em seguida, as placas foram incubadas durante 72 h à 26°C. O controle negativo consistiu de uma suspensão do parasito e meio de cultura, o controle do solvente (MEOH evaporado + suspensão do parasito + meio) e o controle positivo consistiu de uma suspensão de promastigotas adicionada de Anfotericina B (25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 e 0,3906 μ g/mL).

Após o período de incubação de promastigotas com as amostras e fármacos foram adicionados 10 μ L de MTT (5 mg/mL) em cada poço. A placa foi recoberta com papel alumínio, sucedendo-se nova incubação por 4 h em estufa a 26°C para que o MTT seja metabolizado e conseqüentemente fossem formados os cristais de formazan. Após 4 h, foi adicionado 20 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), para solubilizar os cristais de formazan gerados e nova incubação a 26°C foi realizada por 1 h. Em seguida, realizou-se a leitura da densidade óptica (D.O.) das amostras em leitor de microplacas sob comprimento de onda de 490 nm. A viabilidade das formas promastigotas foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor da absorbância gerada.

A porcentagem de células viáveis (promastigotas) foi calculada de acordo com uma adaptação de Ngure et al. (2009), sendo que a Concentração Inibitória 50% (CI₅₀) é a concentração que causa a redução de 50% das células em crescimento (viáveis) e foi determinada pelo programa GraphPad Prism versão 5.04. As absorbâncias

utilizadas no cálculo da CI_{50} foram obtidas através da leitura em leitor de absorbância em microplacas.

4.2.2.3 Análise microscópica

Com base na curva concentração/tempo definiu-se a melhor concentração e tempo a serem utilizados no ensaio de Microscopia Óptica. Deste modo, formas promastigotas *L. (L.) amazonensis* foram centrifugadas 3.000 rpm 5 min (“Lavagem do parasito”). O “pellet” foi ressuscitado em meio RPMI, as promastigotas quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração correspondente a 4×10^6 parasitos/500 μ L. Esta suspensão (500 μ L/poço) foi distribuída em placas de cultura de células de 24 poços previamente dosificadas contendo fração e as subfrações (50 μ L/poço) nas concentrações estabelecidas. Em seguida, as placas foram incubadas durante 72 h/26 °C. O controle negativo consistiu de uma suspensão do parasito e meio de cultura, controle do solvente (MEOH evaporado + suspensão do parasito + meio) e o controle positivo consistiu de uma suspensão de promastigotas adicionada de Anfotericina B em concentrações previamente estabelecidas.

O experimento foi realizado em triplicata de poços. Após tratamento das formas promastigotas durante 72 h com as substâncias testadas, o conteúdo de cada poço foi centrifugado a 3000 rpm por 5 min. e sobrenadante descartado. A seguir, o pellet foi ressuscitado em 500 μ l de PBS e nova centrifugação foi realizada. Posteriormente, o pellet foi ressuscitado 500 μ l de metanol e centrifugado (3000 rpm/5 min), após o metanol foi evaporado e o pellet novamente “lavado” com PBS e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 200 μ L de PBS, deste volume foi tirado 50 μ l que foi depositado em lamínulas circulares de vidro previamente organizadas em placas Petri. Após secagem das lamínulas a temperatura ambiente, estas foram fixadas com metanol por 3 a 5 minutos e coradas com Giemsa, diluído 1:10 em água tamponada, durante 20 min. Posteriormente, lavadas com PBS para remover o excesso de corante e deixadas secando a temperatura ambiente. As lamínulas foram, então, montadas em lâminas de vidro com Entellan®. A análise morfológica foi feita em microscópio óptico, objetiva de imersão (100x) e as imagens obtidas em câmera digital acoplada.

4.2.3 ESTUDO DE PREDIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, FARMACOCINÉTICA, FARMACODINÂMICA E TOXICOLÓGICA

Para a avaliação *in silico* dos alcaloides da *A. nitidum* foram adotados os seguintes critérios: terem sido isolados de qualquer parte vegetal da *A. nitidum*; pertencerem a classe dos alcaloides; terem sua estrutura química já elucidada e disponibilizada na literatura.

As predições físico-químicas foram realizadas pelo software Mcule® (MCULE, sd.) e a análise seguiu como critério a regra dos cinco de Lipinski, a qual diz que para uma molécula apresentar um bom perfil de absorção via oral, deve apresentar 4 características: Massa molecular menor ou igual a 500 Daltons, Logaritmo da Partição Octanol/Água (Logp) menor ou abaixo de 5, quantidade de doadores de hidrogênio menor (nDH) ou igual a 5, e quantidade aceptores de hidrogênio (nAH) menor ou igual a 10 (LIPINSKI, 2004). Além disso, foi levado em consideração também a área de superfície polar (ASP) para as análises farmacocinéticas (ERTL, 2007).

Para os estudos farmacocinéticos será avaliada a absorção intestinal humana (HIA: baixa - 0-20%; média 20-70%, e elevada >70%) e absorção cutânea (alta: <0,1, baixa: > 0,1) (YEE, 1997). Os modelos de estudo com células Madin Darby Canine Kidney (MDCK) e Células Epiteliais de Carcinoma do Cólon Humano (CACO-2) são utilizadas para avaliar a permeabilidade de membranas e absorção intestinal, sendo utilizados os seguintes critérios: alta permeabilidade: >70 nm/sec; média 4-70 nm/sec e baixa <4 nm/sec) (YAZDANIAN et al., 1998).

Caso a substância seja absorvida, há uma chance da molécula se ligar em proteínas plasmáticas, como a albumina para substâncias ácidas e a glicoproteína ácida α para básicas, para ser distribuída para outros tecidos, sendo adotados os seguintes critérios: forte ligação: maior que 90%, de moderada a fraca: menor que 90%. Sobre a distribuição no Sistema Nervoso Central, serão adotados os seguintes critérios: (atravessa livremente >2,0, moderada 2,0-0,1 e reduzida ou não atravessa <0,1) (AJAY; BEMIS; MURCKO, 1999)

Sobre a avaliação do metabolismo, será utilizado os seguintes critérios: se sofrem metabolismo de fase 1, se inibem alguma CYP e quais as CYPs são inibidas. Sabe-se que substâncias duas ou mais CYPs podem interferir diretamente do

metabolismo de muitos fármacos, o ideal é que as substâncias estudadas não induzam nem inibam nenhuma CYP.

Para a predição de toxicidade realizada pelo software PreADMET®, sendo avaliada a mutagenicidade dos compostos, utilizando o teste de Ames, com diferentes estirpes da *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100 e TA1535), a variável a ser testada é a capacidade de reversão de mutação para o crescimento em meio isento de histidina, sendo mutagênicas as substâncias que reverteram a mutação e as bactérias cresceram novamente, não mutagênicas quando não houve reversão e logo não cresceu nenhuma bactéria, e ambíguo ou falso positivo quando não houve reversão da mutação em nenhum clone da bactéria e mesmo assim o programa classificou como mutagênico, o resultado não foi considerado (AMES; MCCANN; YAMASAKI, 1975). A predição do potencial carcinogênico em ratos e camundongos, utilizou como critérios os dados obtidos a partir do Food And Drug Administration (FDA) e National Toxicology Program (NTP), e cruzados com o banco de dados do PreADMET, sendo classificados em carcinogênico (+) e não-carcinogênico (-).

A respeito da predição de toxicidade oral, foi utilizado o software PROTOX, que utiliza algoritmos que consideram a similaridade molecular, probabilidade de fragmentos (CLUSTER baseado na similaridade de fragmentos), tendo como base 33 modelos para a predição de vários pontos de toxicidade, como toxicidade aguda, citotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, imunotoxicidade, além classificar a Dose Letal de 50% (DL₅₀) em roedores, de I a V (Tabela 1; NATIONS, 2011; DRWAL et al., 2014).

Tabela 1 – Classificação da toxicidade aguda em roedores

Classificação	Dose Letal (DL₅₀)	Interpretação
Classe I	DL ₅₀ ≤ 5	Fatal se ingerido
Classe II	5 < DL ₅₀ ≤ 50	Tóxico se ingerido
Classe III	50 < DL ₅₀ ≤ 300	Nocivo se ingerido
Classe IV	300 < DL ₅₀ ≤ 2000	Prejudicial se ingerido
Classe V	2000 < DL ₅₀ ≤ 5000	Não tóxico

Adaptado de: Nações Unidas (NATIONS, 2011). Fonte: Autor

O programa VEGA, utiliza diversas bases de dados (plataformas WEKA, OpenPDF, Chemistry Development Kit e Jpmml) e modelos de cálculos para predição de toxicidade, dentre eles estão o CAESAR (Computer-Assisted Evaluation of

industrial chemical Substances According to Regulations), CONSENSUS, que utiliza diversos modelos e fornece um score baseado nas respostas de cada método, entre outros. Sendo analisada a capacidade causar aberrações cromossômicas e a mutagenicidade, sendo classificados em ativo (+) ou inativo (-) (CASSANO et al., 2010; BENFENATI; MANGANARO; GINI, 2013).

4.2.6 DOCAGEM MOLECULAR

A docagem molecular foi utilizado para explorar as possíveis conformações do ligante com o receptor de ligação, estimando a força de interação proteína-ligante. as moléculas foram desenhadas e preparadas a partir das estruturas obtidas na literatura sendo desenhadas do programa ChemSketch ®, e preparadas para a docagem no programa BIOVIA ®, através dos acréscimos de hidrogênios polares. Os alvos foram obtidos da base de dados Protein Data Bank (PDB), tendo como foco alvos relacionados ao citoesqueleto e bolsa flagelar, sendo os códigos das proteínas escolhidos: 7Q8C (KOTILA et al., 2022) (proteína 01), 6ZPJ (LUDZIA et al., 2021) (proteína 2), 6IAE (WACHTER et al., 2019) (proteína 3) e 7A1I (ISCH et al., 2021) (proteína 04), sendo preparados no Software BIOVIA através do acréscimo de hidrogênios polares, remoção de qualquer ligante presente.

As simulações de docagem molecular foram realizadas usando o programa GOLD 2020.1 (JONES et al., 1997) (Cambridge Crystallographic Data Centre - CCDC, Cambridge, UK), que utiliza um algoritmo genético para gerar e selecionar conformações de compostos flexíveis que se ligam ao local do receptor de uma proteína (JONES; WILLETT; GLEN, 1995), e foram acoplados aplicando a função de pontuação GoldScore, com pesquisa 100% eficiente. O programa GOLD permite o rescore através de outras funções gerando uma predição mais assertiva, sendo a escolhida a função ChemScore, e todas as interações foram analisadas pelo BIOVIA ®. Como método de validação da docagem, foi realizado o redocagem que consiste em reacoplar o ligante cristalografado no sítio ativo, prevendo sua conformação, sendo considerado como válido, aqueles que possuíam Root Mean Square Deviation (RMSD) menor que 2 Angströms.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos Químicos

O EE (Extrato Etanólico), a FN (Fração de Neutros), FA (Fração Alcaloídica), FrHEX (Fração Hexânica), FrDCL (Fração Diclorometano), FrAcOEt (Fração de Acetato de Etila), FrMeOH (Fração Metanólica), as subfrações SF-5-6, SF-9 e o diidrocorinanteol, já foram caracterizados pelo grupo por Veiga et al. (2022), sendo as Subfrações 5-6, 9 e o Diidrocorinanteol obtidas da fração alcaloídica. Diante disso, foram obtidos extrato e novas frações para este estudo. Inicialmente, foram obtidos o extrato etanólico (EE; rendimento= 5,1%), a fração de neutros (FN; rendimento= 21,8%) e a fração alcaloídica (FA, rendimento = 29,25 %), entretanto somente o EE e FA foram submetidas a análise em CLAE-DAD. No EE foram encontrados 4 picos majoritários no extrato com absorvâncias de 291,4 nm para os picos a, b e d, e 281.4 nm para o pico c, enquanto que na fração, apareceu um pico majoritário com três leituras de absorvância, 251,3, 306,8 e 350,8 nm (Figura 7).

Os resultados encontrados são indicativos fortes da presença de alcaloides, havendo similaridades destes resultados com outro estudo, em que os picos e absorvância estão próximos. Os cromóforos apontados no extrato apresentam absorvâncias máximas de 281,9 e 291,4 nm (Figura 7), que também foram semelhantes em outro estudo (BRÍGIDO et al., 2021), esses picos são sugestivos de cromóforos de alcalóides indólicos. Sabe-se os alcalóides são os compostos majoritários presentes na casca da *A. nitidum* e que já foram isolados compostos desta classe, como a iombina, corinanteol e diidrocorinanteol, esses dados indicam a forte presença de alcalóides no extrato etanólico da planta estudada (OLIVEIRA et al., 2009).

O cromatograma da fração alcaloídica apresentou TR: 13,433 min (λ_{max} = 251,3 nm, 306,8 nm e 350,8 nm), apresentando um pico majoritário e seu espectro em ultravioleta sugere que se trata de um alcalóide indólico, semelhante ao encontrado em outro trabalho (BRÍGIDO et al., 2021) (Figura 8). Desse modo, analisando os resultados de CLAE-DAD, é possível sugerir que os compostos majoritários presentes no EE e FA, são os alcalóides indólicos, que já foram isolados desta espécie (VEIGA et al., 2021).

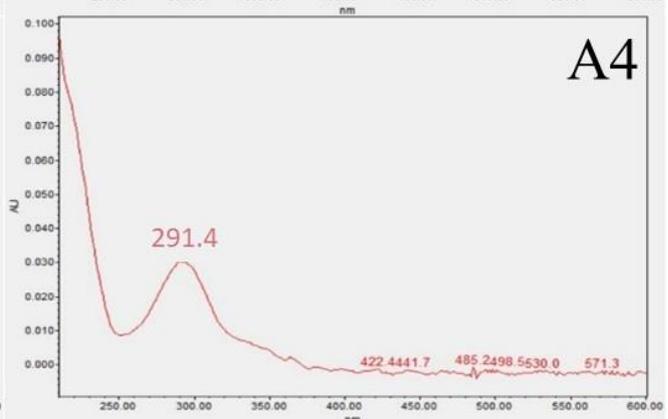
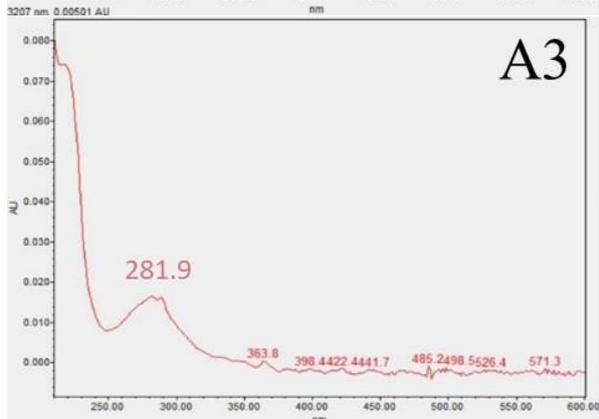
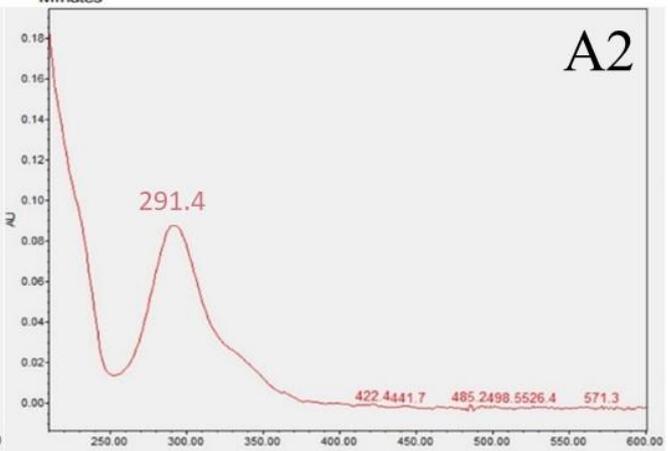
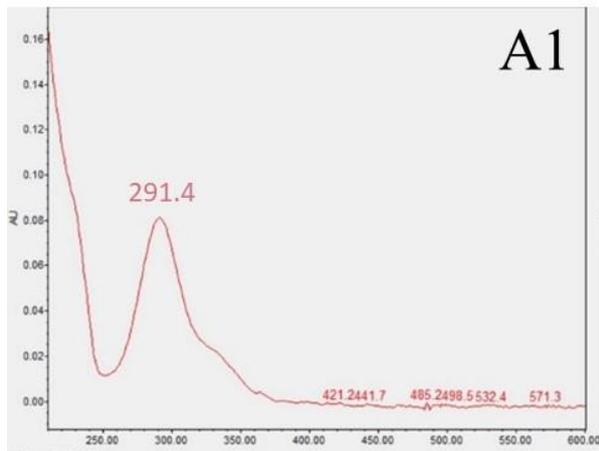
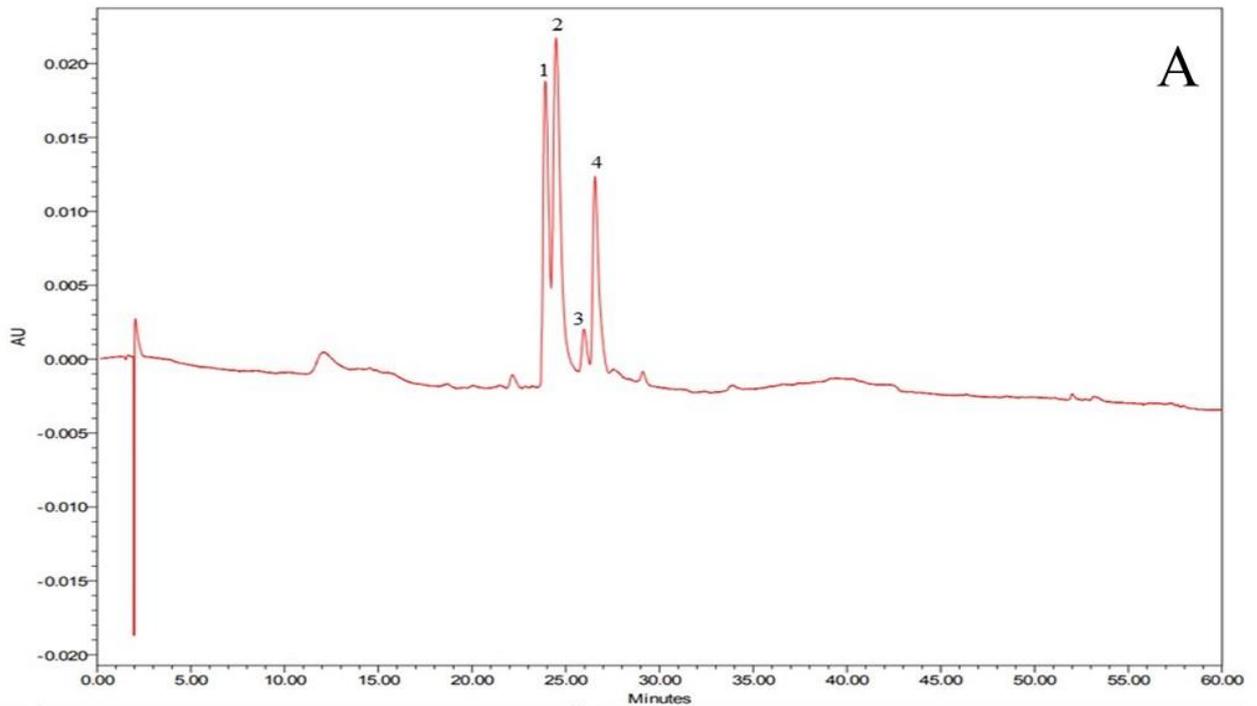


Figura 7 - Cromatograma do extrato etanólico e espectrometria em ultravioleta da *Aspidosperma nitidum*. Legenda: A: Cromatograma do extrato etanólico de *Aspidosperma nitidum*; B: Espectro ultravioleta do pico número 1; C: Espectro ultravioleta do pico número 2; D: Espectro ultravioleta do pico número 3; E: Espectro ultravioleta do pico número 4. Condições cromatográficas: comprimento de onda 340 nm, Coluna de fase reversa Sunfire C18 (150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula 5 µm. Temperatura: 40° C. Fase móvel: H2O (a) e MeOH (b); To= 95%A:5%B; T55min.: 0%A: 100%B; T60min: 0%A: 100%B. Fonte: Autor

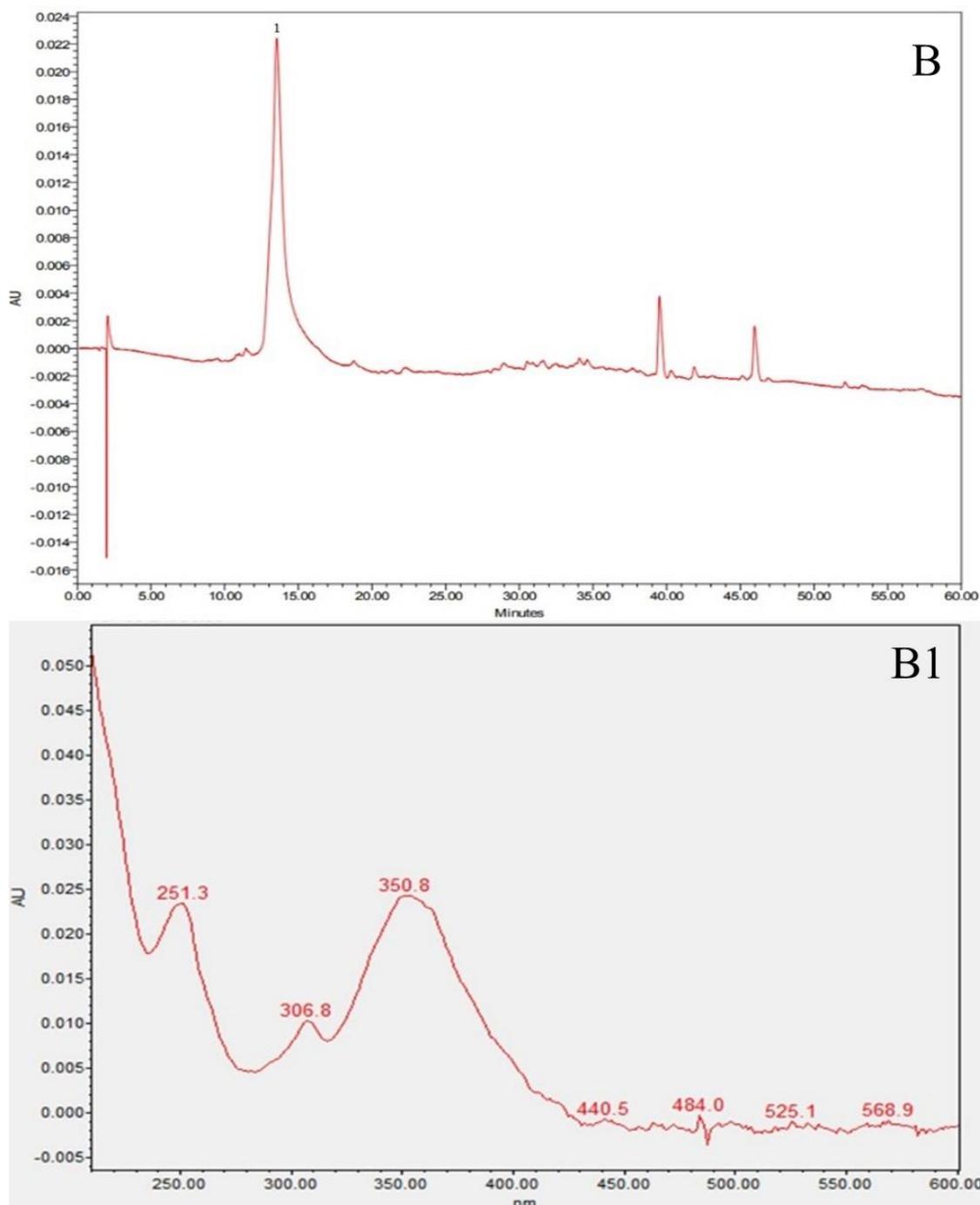


Figura 8 - Cromatograma da fração alcaloídica de *Aspidosperma nitidum* e espectros em ultravioleta dos picos de maior intensidade. Legenda: A: Cromatograma da fração alcaloídica de *Aspidosperma nitidum*; B: Espectro de ultravioleta do pico número 1. Condições Cromatográficas: Coluna de fase reversa Sunfire C18 (150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula 5 μ m. Temperatura: 40 $^{\circ}$ C. Fase móvel: H₂O (a) e MeOH (b); T₀= 95%A:5%B; T_{55min.}: 0%A: 100%B; T_{60min.}: 0%A: 100%B. Fonte: Autor

A observação do espectro de RMN ^1H da fração alcaloídica obteve constante de acoplamento de $j = 11,9$ Hz. Sendo encontrado: um sinal múltiplo em δH 2,67, integrado a três hidrogênios que sugerem a presença do grupamento metoxila,

provavelmente ligados ao anel benzênico; descolamento simples centrado em δH 7,28 característicos de hidrogênios aromáticos sugerindo a presença de um núcleo indólico, corroborado pelo deslocamento δH 9,61, atribuído a um único hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio presente no núcleo indólico (LEITE, 2016; SALES, 2019). A constante de acoplamento encontrada foi de $j = 11,9$ Hz (Figura 9; Tabela 2).

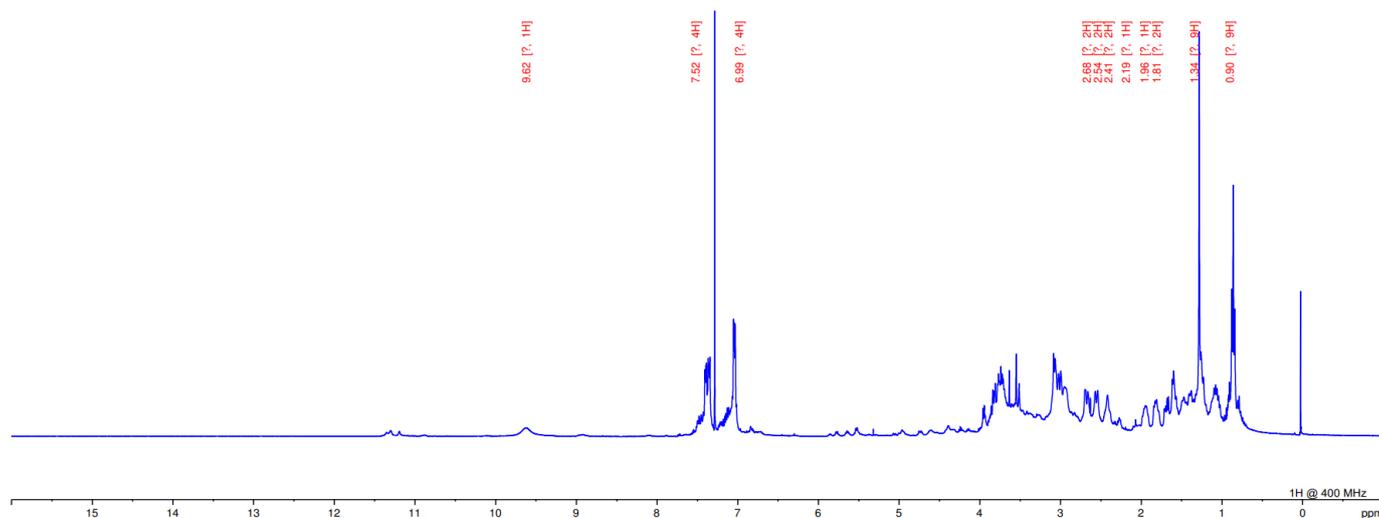


Figura 9 – Espectro de RMN de H^1

Tabela 2 – Comparações de espectro de RMN $1H$ entre os do autor e da literatura.

Autor	LEITE, 2016	SALES, 2019
Δ	Δ	Δ
0,02	1,68	2,01
0,95	1,97	2,08
1,27	2,69	2,25
1,59	2,78	4,25
1,82	3,10	7,13
2,20	3,94	
2,40	4,21	
2,57	4,47	
2,67	6,86	
7,06	7,17	
7,28	7,57	
9,61		

O deslocamento δH 2,57 de um duplete largo sugere que ele se originou de um processo de acoplamento de um hidrogênio com o grupamento amina que criou o múltiplo sinal. Os deslocamentos δH 2,40 simpleto e os multipletos δH 1,27, 1,82 e

195 sugerem a presença de hidrogênios metilênicos, com isso, podemos notar que a amostra apresenta a presença de grupamentos metoxila e amina, além de hidrogênios benzênicos e metilênicos o que sugerem a presença de alcaloides do tipo indólico (Figura 9; Tabela 2; LEITE, 2016; SALES, 2019). Com todos esses achados, é possível sugerir fortemente que os alcaloides estão presentes no extrato e na fração alcaloídica, corroborando com o que há na literatura, somado aos estudos que comprovam a sua atividade antileishmania e com baixa toxicidade, os alcalóides já isolados de *A. nitidum* foram os escolhidos para a fase da predição *in silico*.

5.2. Avaliação da atividade antileishmania de *A. nitidum* por microscopia óptica

Anteriormente a esse estudo, foi realizada a análise em microscopia eletrônica de varredura, verificando as alterações ultra estruturais do extrato e frações de *A. nitidum*, e dando continuidade a esse estudo, foi realizada a microscopia óptica para verificar as alterações morfológicas causadas pelos mesmos extratos e frações. A análise em microscopia óptica, foi realizada com a fração diclorometano, as subfrações SF-5-6, SF-9 e o diidrocorinanteol, utilizando a anfotericina como controle positivo, obtidas anteriormente pelo grupo, de acordo com Veiga et al. (2022), utilizando as CC_{50} igualmente obtidas anteriormente. Visando compreender as possíveis alterações ocasionadas no parasito após 72h de tratamento, com as amostras ativas (SF5-6, diidrocorinanteol e SF9) realizou-se as análises em microscopia óptica (MO).

Nas promastigotas tratadas com 100 $\mu\text{g/mL}$ da subfração SF5-6, estes parasitos apresentaram as seguintes alterações morfológicas: formato arredondado e tamanho reduzido, retração do material citoplasmático, não havendo aparentemente redução no tamanho do flagelo na maioria das promastigotas visualizadas. Na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ desta subfração, apresentou-se também formato arredondado, tamanho reduzido, retração do material citoplasmático e sem núcleo evidente, não se observando aparente alteração no tamanho do flagelo na maioria dos parasitos visualizados, bem como identificou-se a presença de cinetoplasto, e na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ não houve mudanças morfológicas evidentes (Figura 10).

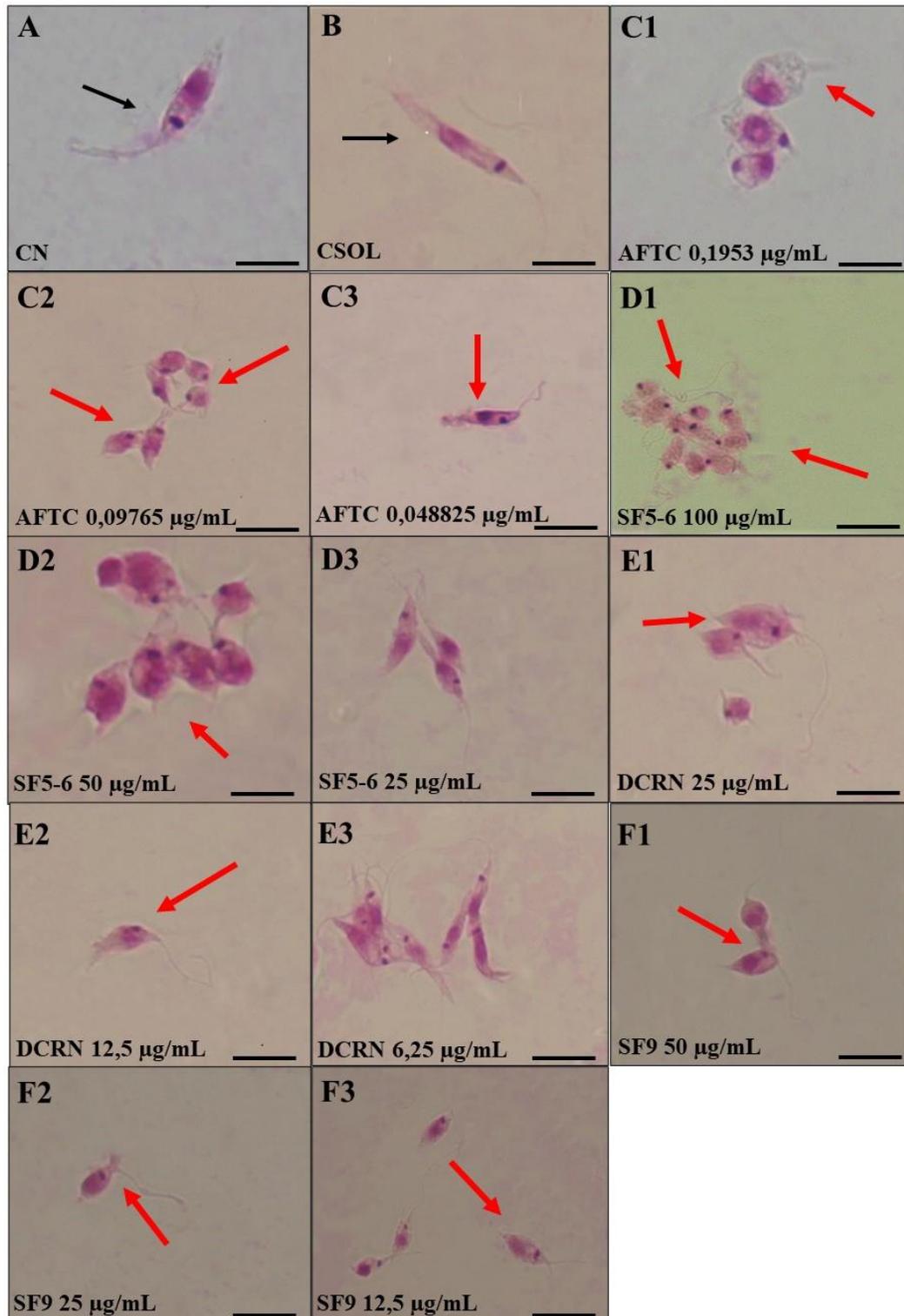


Figura 10 - Análises microscópicas da forma promastigota de *L. amazonensis* não tratadas e tratadas por 72 horas, com frações, subfrações, diidrocorinanteol obtidos das cascas de *A. nitidum*. Legenda: A: Controle Negativo; B: Controle do Solvente; C1, C2 e C3: Controle Positivo com Anfotericina nas concentrações de 0,1953 µg/mL, 0,09765 µg/mL e 0,048825 µg/mL respectivamente; D1, D2 e D3: Fração Diclorometano (FrDCL) nas concentrações de 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL, respectivamente; E1, E2 e E3: subfração SF-9 nas concentrações: 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL, respectivamente; F1, F2 e F3: Diidrocorinanteol nas concentrações: 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL, respectivamente; G1, G2 e G3: Subfração S9 nas concentrações de 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL. As setas pretas indicam promastigotas apresentando morfologia típica como corpo alongado e flagelo único. As setas vermelhas indicam promastigotas com morfologia alterada. Barras: 10 µm.

Isso demonstra o possível caráter dose-dependente para a subfração 5-6, pois, em concentrações maiores (100 µg/mL), ocorreram um número maior de alterações, e de tipos diferentes, enquanto que na menor concentração (25 µg/mL), não ocorreram alterações morfológicas em comparação ao controle negativo (Figura 10).

O estudo por microscopia óptica do diidrocorinanteol demonstrou que, parasitos tratados com 25 µg/mL apresentaram formato arredondado, com retração do material citoplasmático, e em sua maioria, flagelo curto e sem núcleo evidente, apresentando ainda o cinetoplasto em todas as células visualizadas. Na concentração de 12,5 µg/mL, visualizou-se promastigotas ainda com formato arredondado, mas a maioria apresentava flagelo longo, núcleo e cinetoplasto, e na concentração de 6,25 µg/mL, quase a totalidade das promastigotas apresentou formato alongado, com a presença de flagelo longo, cinetoplasto e núcleo evidentes (Figura 10).

Comparando as concentrações, é possível identificar novamente um padrão dose dependente da atividade, pois verifica-se que na maior concentração (25 µg/mL), as alterações foram mais acentuadas e diversas, a de média concentração (12,5 µg/mL) ainda ocorreram alterações vistas na de maior concentração, porém menos acentuadas, e na de menor concentração (6,25 µg/mL), ainda é possível visualizar alterações, porém a sua morfologia está mais próxima do controle negativo, demonstrando alterações leves (Figura 10).

Os resultados do estudo com a subfração SF9, na concentração de 50 µg/mL demonstrou que, os parasitos apresentaram formato arredondado, redução do corpo celular e retração do material citoplasmático, mas verificou-se a presença de flagelo longo, núcleo e cinetoplasto. Na concentração de 25 µg/mL, visualizou-se promastigotas, também, com formato arredondado, redução do corpo celular e retração do material citoplasmático, mas verificou-se a presença de flagelo longo, núcleo e cinetoplasto. O tratamento com 12,5 µg/mL, demonstrou que os parasitos começaram a apresentar formato mais alongado, identificando-se, também, presença de flagelo longo, núcleo e cinetoplasto semelhante as concentrações anteriores (Figura 10).

As alterações visualizadas novamente seguem o padrão dose dependente, sendo possível identificar que nas maiores concentrações (50 µg/mL) ocorrem um maior número de alterações, quando comparadas com as de média (25 µg/mL) e,

estas apresentam mais alterações quando comparadas com as de baixa concentração (12,5 µg/mL) (Figura 10).

Não foram encontradas nenhuma alteração no controle negativo nem no controle do solvente (Figura 10), já no controle positivo, observou-se que promastigotas tratadas com anfotericina B na concentração de 0,1953 µg/mL, apresentaram redução do corpo de celular, formato arredondado, aparente desorganização do conteúdo citoplasmático e alteração no tamanho do flagelo, mas se observou a presença de núcleo e cinetoplasto. Na concentração de 0,09765 µg/mL verificou-se ainda formato arredondado e redução do corpo celular, mas identificou a presença de núcleo, cinetoplasto e flagelo longo, e por último, na concentração de 0,048825 µg/mL, percebeu-se que a maioria destas formas de *Leishmania* apresentaram formato mais alongado, flagelo longo, núcleo e cinetoplasto evidentes (Figura 10). Estes resultados demonstraram que nas maiores concentrações (0,1953 e 0,09765 µg/mL), os parasitos apresentaram alterações no tamanho e no formato do corpo celular, o que já não se observa na menor concentração (0,048825 µg/mL). No entanto, verificou-se núcleo e cinetoplasto nas formas promastigotas de *L. amazonensis* em todas as concentrações testadas do medicamento. Então, sugere-se que as principais alterações nas promastigotas quando tratadas com as concentrações 0,1953 e 0,09765 µg/mL de anfotericina B estão relacionadas ao corpo celular, mas que aparentemente não afetariam o núcleo e cinetoplasto do parasito.

Os resultados obtidos nos ensaios das frações obtidas de *A. nitidum* sugerem que nas maiores concentrações (50 e 25 µg/mL), os parasitos apresentavam alterações no formato do corpo celular e retração do material citoplasmático, observando-se que ambas concentrações ocasionaram as mesmas alterações no parasito, enquanto que na menor concentração (12,5 µg/mL), identificou-se um menor número de alterações morfológicas. Em síntese, o efeito sobre a morfologia do parasito parece ser concentração dependente. Quando se compara os resultados de microscopia óptica das amostras ativas (SF5-6, SF9 e diidrocorinanteol) contra formas promastigotas com a anfotericina B percebe-se alterações morfológicas semelhantes (Figura 10).

Os resultados obtidos com diidrocorinanteol demonstraram que na maior concentração (25 µg/mL), os parasitos apresentavam alterações no formato e no flagelo; enquanto que à medida que as concentrações diminuía estas alterações

tornaram-se menos evidentes (12,5 e 6,25 µg/mL). Em síntese, sugere-se que o efeito sobre o formato celular e o flagelo parecem ser concentração dependente e que estas alterações (encurtamento do corpo celular e flagelo) podem ser causadas pela desestabilização do citoesqueleto e alterações na bolsa flagelar (MARQUES ADADE, 2010; SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010).

Em um estudo realizado pelo grupo, utilizando a microscopia eletrônica de varredura, visualizou que as promastigotas tratadas com a fração diclorometano, com a SF5-6, SF-9 e o diidrocorinanteol apresentaram mudanças no corpo celular e alterações flagelares, como diminuição e septação do flagelo. Quando utilizou a microscopia de transmissão foram visualizadas alterações citosólicas, como inclusões lipídicas, alterações na bolsa flagelar como a dilatação e vacuolização, alterações no corpo celular como a retração deste (VEIGA et al., 2022).

Outras espécies da família Apocynaceae já foram estudadas contra a forma promastigota de *L. amazonensis*. Uma espécie bastante promissora foi a *Geissospermum vellosii*, sendo observado que o fracionamento contribuiu para a atividade (EE - Cl_{50} = 14,71 µg/mL; FA- Cl_{50} = 1.07 µg/mL) e o alcaloide flavopereirina foi mais ativa. Para todas as amostras avaliadas, a atividade antipromastigota foi tempo-dependente, de modo que apresentaram as melhores atividades em 72 horas de exposição, em comparação com as de 24 e 48 horas (Cl_{50} = 0.15µg/mL) (DA SILVA E SILVA et al., 2019)

5.3 Estudo de Predição Farmacocinética, Farmacodinâmica e Toxicológica

Para os estudos de predição foram selecionados todos alcaloides isolados de *A. nitidum*, sendo incluído: Diidrocorinanteol (1); Ácido 3-harmanocarboxílico (2); Ácido 3-metil-harmanocarboxílico (3); Corinanteol (4); Deshidrositsirikina (5); lombina (6); 10-metoxidiidrocorinanteol (7); Aspidospermina (8); Quebrachamina (9); Desoxicordifolina (10); Braznitidumina (11) e Carapanaubina (12) (Figura 11).

Nos ensaios de avaliação dos aspectos físico-químicos, com a exceção da molécula 10 que apresentou massa molecular superior à 500 Daltons, 13 aceptores de hidrogênio, 6 doadores de hidrogênio e área de superfície polar superior 140 Å², os demais alcaloides seguiram a regra de Lipinski (Tabela 3). Deste modo, todos

compostos seguem esta regra possuem elevadas possibilidades de serem bem absorvido no trato gastrointestinal e boa distribuição pelo organismo (LIPINSKI, 2004).

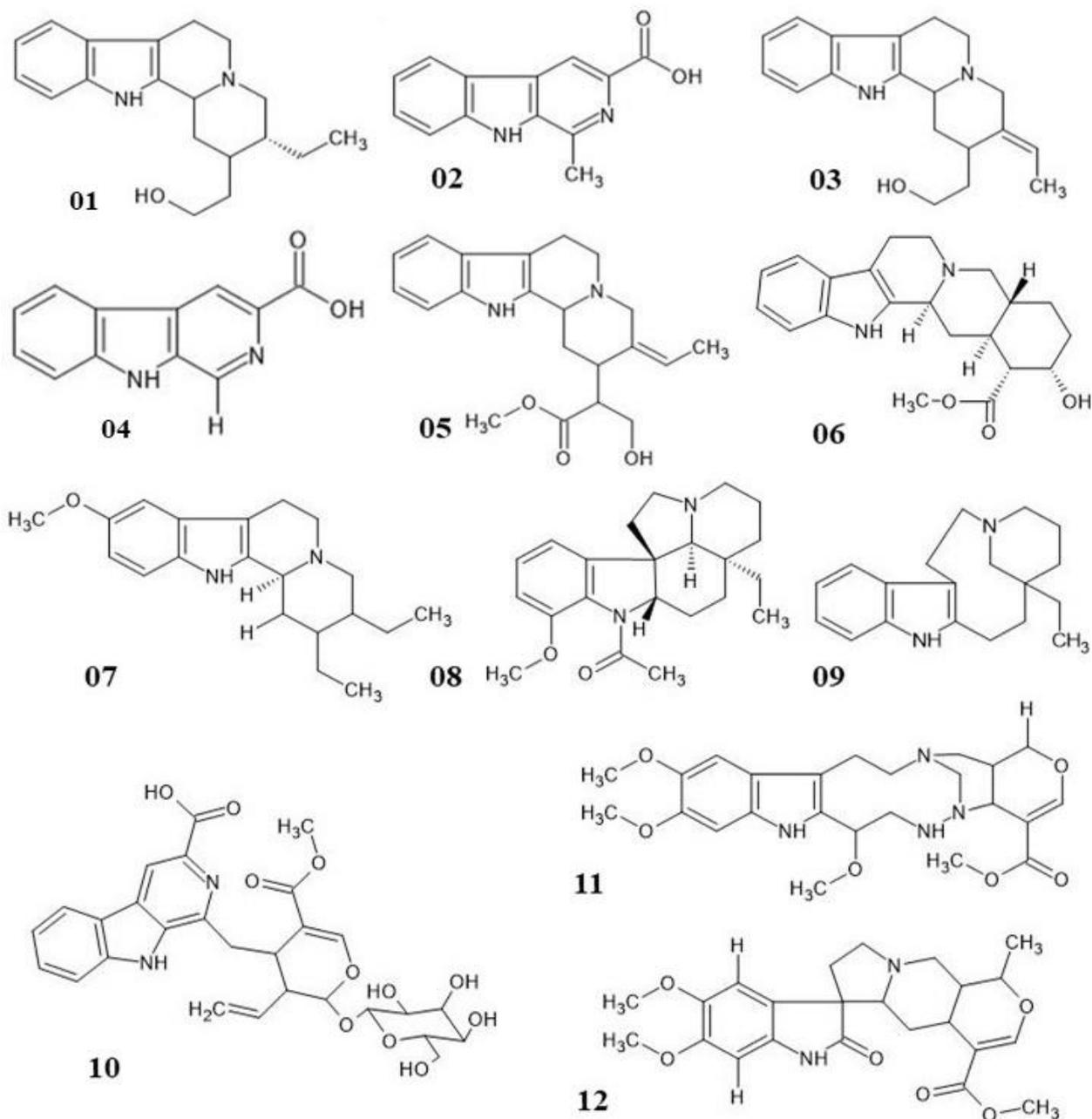


Figura 11 – Moléculas escolhidas para os estudos *In Silico*. Legenda Dihidrocorinanteol (1); ácido 3-harmanocarboxílico (2); Ácido 3-metil-harmanocarboxílico (3); Corinanteol (4); Deshidrositsirikina (5); lombina (6); 10-metoxidiidrocoringanteol (7); Aspidospermina (8); Quebrachamina (9); Desoxicordifolina (10); Braznitidumina (11); e Carapanaubina (12).

A maioria dos compostos se encontram com LogP entre 0 e 3, com exceção dos compostos 7, 9, o que os garante um equilíbrio entre o seu caráter apolar e polar. O composto 10 violou a regra de Lipinski em três critérios e também apresentou a área

de superfície polar superior a 140 Å (Tabela 3). A violação da regra de Lipinski demonstra que há uma alta probabilidade desses compostos de não serem bem absorvidos via oral, devido sua característica de polaridade, principalmente (LIPINSKI, 2004).

Tabela 3 – Predição de propriedades físico-químicas

Compostos	Massa Molar (Da)	LogP	Aceptores de Hidrogênio	Doadores de Hidrogênio	ASP (Å ²)
1	298,4219	3,4335	3	2	39,2600
2	212,2035	2,4143	4	1	65,9800
3	226,2301	2,7227	4	2	65,9800
4	296,4059	3,3536	3	2	39,2600
5	356,4578	2,4622	5	2	61,8000
6	354,4419	2,5850	5	2	65,5600
7	312,4484	4,4697	3	1	28,2600
8	354,4850	3,7293	4	0	32,7800
9	282,4225	4,0867	2	1	19,0300
10	570,5432	0,6049	13	6	200,8900
11	472,5334	1,7849	10	2	97,5200
12	428,4772	2,1556	8	1	86,3300

Legenda: Dihidrocorinanteol (1); Ácido 3-harmanocarboxílico (2); Ácido 3-metil-harmanocarboxílico (3); Corinanteol (4); Deshidrositsirikina (5); lombina (6); 10-metoxidiidrocorinanteol (7); Aspidospermina (8); Quebrachamina (9); Desoxicordifolina (10); Braznitidumina (11); e Carapanaubina (12). Para ser bem absorvido precisa apresentar: massa molar menor que 500 Da; LogP menor que 5; Aceptores de Hidrogênio menor que 10; Doadores de Hidrogênio menor que 5 e Área de Superfície Polar (ASP) menor que 140 Å² (LIPINSKI, 2004; ERTL, 2007). Fonte: Autores.

A respeito da absorção cutânea, todas as substâncias apresentam baixa absorção cutânea. Apresentaram baixa permeabilidade em células MDCK os compostos 10, 11 e 12, média permeabilidade 5, 6, 7 e 9, e alta 1, 2, 3, 4 e 8 (Tabela 4). Estes resultados sugerem que os compostos 10, 11 e 12, provavelmente, terão dificuldade de serem transportados por difusão passiva (KATHURIA et al., 2021). As moléculas 10, 11 e 12 por parecem ter maior dificuldade em atravessar as barreiras biológicas e extravasam para o meio aquoso externo com maior facilidade, nesse sentido, ao pensar em formulações com esses compostos, deve-se pensar em tecnologias com intuito de ultrapassar as barreiras biológicas, quando administrados via oral (KATHURIA et al., 2021).

Em relação as células Caco-2, apenas os compostos 1, 2 e 10 apresentam baixa permeabilidade os demais apresentam média permeabilidade (Tabela 4). Estas células simulam a absorção em nível de colón e compostos com baixa permeabilidade

nestas células, provavelmente, são absorvidos em outras regiões do intestino. Em relação absorção intestinal humana, apenas o composto 10 apresenta moderada absorção, todas as outras apresentam alta absorção (Tabela 4), que é uma característica esperada devido as moléculas seguirem a regra de Lipinski, comprovando sua boa absorção via oral. O caráter lipofílico e a massa molecular impactam diretamente na absorção desses compostos.

Tabela 4 – Predição das propriedades farmacocinéticas

Composto	Absorção				Distribuição		Metabolismo	
	Cutânea	MDCK	Caco-2	HIA	PP	BHE	Fase 1	Inibição de CYP
1	Baixa	Alta	Média	Alta	Moderada	Livre	Fraco	CYP2D6
2	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Forte	Média	Não	CYP2C9
3	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Forte	Média	Não	CYP2C9
4	Baixa	Alta	Média	Alta	Moderada	Livre	Sim	CYP2D6
5	Baixa	Média	Média	Alta	Moderada	Livre	Sim	-
6	Baixa	Média	Média	Alta	Moderada	Livre	Sim	CYP2D6
7	Baixa	Média	Média	Alta	Moderada	Livre	Fraco	CYP2D6
8	Baixa	Alta	Média	Alta	Moderada	Média	Sim	-
9	Baixa	Média	Média	Alta	Moderada	Livre	Sim	CYP2D6
10	Baixa	Baixa	Baixa	Moderada	Moderada	NA	Sim	CYP2C9, CYP3A4
11	Baixa	Baixa	Média	Alta	Moderada	Média	Sim	CYP2D6, CYP3A4
12	Baixa	Baixa	Média	Alta	Moderada	NA	Sim	-

Legenda: Dihidrocorinanteol (1); Ácido 3-harmanocarboxílico (2); Ácido 3-metil-harmanocarboxílico (3); Corinanteol (4); Deshidrositsirikina (5); lombina (6); 10-metoxidiidrocorinanteol (7); Aspidospermina (8); Quebrachamina (9); Desoxicordifolina (10); Braznitidumina (11); e Carapanaubina (12). Permeabilidade cutânea (alta: >0,1, baixa: < 0,1); Caco-2 (Human Colon Adenocarcinoma Cells) e MDCK (Madin Darby Canine Kidney) (Alta >70 nm/sec, média 4-70 nm/sec e baixa <4 nm/sec); Absorção intestinal humana (HIA) (baixa - 0-20%; média 20-70%, e elevada >70%); Ligação à proteínas plasmáticas (PP) ligado fortemente >90% e moderada a fraca <90%); Atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) (livre >2,0, moderada 2,0-0,1 e reduzida ou não atravessa (NA) <0,1) (YEE, 1997; YAZDANIAN et al., 1998; AJAY; BEMIS; MURCKO, 1999). Fonte: Autores

Quanto a ligação as proteínas plasmáticas apenas os compostos 2 e3 se ligam fortemente e os demais de forma moderada (Tabela 4). Apenas a fração livre do fármaco, isto é, não ligada a proteína plasmática consegue ser distribuída para outros compartimentos biológicos e a elevada ligação a proteína plasmática pode ser um

fator que limita sua distribuição. Outro problema relacionado a extensa ligação a proteínas plasmáticas é a possibilidade de ocorrer interações medicamentosas, isto é, se o composto for associado a outro fármaco que se liga fortemente a albumina poderá ocorrer competição pelos sítios de ligação, alterando o equilíbrio dinâmico entre as frações livre e ligada. Diante destes problemas, os compostos mais promissores são 1, 4 a 12.

Quanto a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) os compostos 10 e 12 não a atravessam, os compostos 1, 2, 8 e 11 atravessam medianamente e os demais atravessam livremente (Tabela 4). Estudos tem demonstrados que os alcaloides indólicos podem se difundir de forma passiva pela BHE ou se utilizar de co-transportadores, principalmente, por glicoproteínas (ZHANG et al., 2017b).

Ao avaliar a metabolização desses compostos, 1 e 2 não sofrem metabolismo de fase 1, os compostos 4 e 7, sofrem fracamente e todas as outras passam por esse metabolismo. A metabolização é a fase catalítica a qual os compostos passam por transformações físico-químicas. A superfamília do citocromo P450 é a principal via de metabolização de fármacos administrados por via enteral, a predição demonstra que os compostos 2 e 3 não realizam metabolismo de primeira passagem, mas inibem a isoforma CYP2C9, já os compostos 1 e 7 são fracamente metabolizados pelas CYPs, inibido CYP2D6 (Tabela 4).

Os compostos 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e 12 realizam metabolismo de primeira passagem, sendo que 5, 8 e 12 não inibem nenhuma isoforma das CYPs e 10 e 11 inibiram além da CYP2C9 a CYP3A4, que é a principal isoforma do citocromo P450 responsável pela metabolização de outros fármacos o que predispõe esses compostos a maior interação com outros fármacos que também são metabolizados por CYPs, o que pode levar a uma interferência na fase de metabolização, podendo ocasionar um aumento nas reações adversas destes fármacos (Tabela 4; KAPETAS et al., 2021).

Os compostos 5, 8 e 12 são os únicos que não inibem de CYPs (Tabela 4), o que é uma característica muito benéfica, pois diminui as possibilidades de interações medicamentosa de origem farmacocinética com outros fármacos que sejam metabolizados por CYPs (KAPETAS et al., 2021).

Visando avaliar a segurança da utilização dos alcaloides foram realizados os estudos de predições de toxicidade. Na predição de genotoxicidade, nenhum alcaloide parece ser genotóxico (Tabela 5). Estudo demonstrou que os efeitos tóxicos de alcaloides estão relacionados a concentração usada, sendo pronunciado em concentrações elevadas. Um exemplo é a aspidospermina que em 50 μ M ocasionou na interrupção do ciclo celular não permitindo a reparação dos danos, enquanto que 100 μ M de aspidospermina induz apoptose através de uma resposta UPR (unfolded protein response) persistente (COATTI et al., 2016).

Tabela 5 – Predições de Toxicidade dos alcaloides

Composto	Geno- toxicidade	Mutagenicidade		Carcinogênese		Toxicidade Aguda		Efeitos Tóxicos
		Teste de Ames	CAESAR	Camun- dongo	Ratos	DL ₅₀	Classe	
1	-	NM	-	C	C	760	IV	-
2	-	M*	+	NC	NC	1550	IV	H
3	-	NM	+	C	NC	1550	IV	H
4	-	NM	-	C	NC	760	IV	-
5	-	NM	-	C	NC	300	III	-
6	-	NM	-	C	NC	300	III	-
7	-	NM	+	NC	C	760	IV	I
8	-	NM	-	NC	NC	325	IV	-
9	-	NM	-	NC	C	200	III	-
10	-	NM	+	C	NC	2000	IV	I
11	-	NM	-	NC	NC	620	IV	C e I
12	-	NM	-	NC	C	406	IV	C e I

Legenda: Dihidrocorinanteol (1); Ácido 3-harmanocarboxílico (2); Ácido 3-metil-harmanocarboxílico (3); Corinanteol (4); Deshidrositsirikina (5); lombina (6); 10-metoxidiidrocorinanteol (7); Aspidospermina (8); Quebrachamina (9); Desoxicordifolina (10); Braznitidumina (11); e Carapanaubina (12). *Cepa TA100_10RLI. DL₅₀: Dose Letal de 50%; H- Hepatotóxico; I- Imunotóxico; C- Carcinogênico; sendo classificado em M: mutagênico e NM: não mutagênico. CAESAR: utiliza o consenso entre 5 parâmetros de toxicidade (sensibilização cutânea, mutagenicidade, carcinogenicidade e desenvolvimento de toxicidade, ou teratogenicidade), classificado em Positivo: + e Negativo: - (TOGO et al., 2023). Classe I: DL₅₀ ≤ 5 mg/kg=Fatal se ingerido; Classe II: 5 < DL₅₀ ≤ 50 mg/kg = Tóxico se ingerido; Classe III: 50 < DL₅₀ ≤ 300 mg/kg= nocivo se ingerido; Classe IV: 300 < DL₅₀ ≤ 2000 mg/kg= Pode ser prejudicial se ingerido; Classe V: 2000 < DL₅₀ ≤ 5000 mg/kg= Não tóxico. Adaptado de Nações Unidas (NATIONS, 2011).

Dentre as análises de carcinogenicidade, os compostos 1, 3, 4, 5, 6 e 10 são carcinogênicos para camundongos, enquanto que para ratos, apenas os compostos 1, 7, 9 e 12, são carcinogênicos, de acordo com o PreADMET, além disso, segundo o PROTOX, os compostos 11 e 12 apresentam possível atividade carcinogênica, essas diferenças de resultados podem ocorrer devido os diferentes algoritmos e a quantidade de compostos presente na base de dados (Tabela 5).

Quando se relaciona os resultados da mutagenicidade e carcinogenicidade, não se observa uma correlação direta, isto é, o composto com potencial mutagênico não se mostrou carcinogênico. Importante ressaltar a dicotomia entre apenas uma substância ser mutagênica de acordo com o teste de Ames, e outras apresentarem o potencial carcinogênico, o que demonstra, uma possível indução ao aparecimento de câncer, importante ressaltar que estes sintomas podem aparecer apenas a longo prazo, e que, ambos os testes utilizam diferentes espécies para seus modelos de estudo, *Salmonella typhimurium* para o TA e roedores para carcinogenicidade, o que pode ter sido a causa dos diferentes resultados (AMES; MCCANN; YAMASAKI, 1975).

Carcinogenicidade é a capacidade de um composto provocar ou estimular o aparecimento de carcinomas em um organismo, seu mecanismo de ação pode ser através do aparecimento direto de mutações ou ativação de vias sinalizadoras pró-Tumorigênicas, o que pode ser o mecanismo das moléculas deste estudo, devido a presença de carcinogênese com ausência de mutagenicidade (SARMIENTO-SALINAS et al., 2021). Enfatiza-se a importância da avaliação da carcinogenicidade *in silico*, uma vez que a carcinogenicidade pode ser um aspecto crítico no desenvolvimento de fármacos. Este aspecto, se não for devidamente gerido, pode levar à suspensão ou atrasos na aprovação de medicamentos pelas autoridades reguladoras (MOOLGAVKAR; KNUDSON, 1981)

Além disso, os alcaloides foram submetidos ao teste CAESAR (Computer Assisted Evaluation of industrial chemical Substances According to Regulations), os compostos 2, 3, 7 e 10 foram positivos (Tabela 5). Na predição utilizando o teste de Ames, o composto 2 parece apresentar potencial mutagênico para a cepa TA100_10RLI (cepa com substituição G:C para A:T), quando se relaciona estes resultados aos de mutagenicidade e carcinogenicidade observa-se que um 2 foi mutagênico e + CAESAR, podendo apresentar os potenciais mutagênicos, teratogênicos e toxicidade reprodutiva. Os demais compostos (3, 7, e 10) apresentaram potencial carcinogênico e ainda podem ser teratogênicos e toxicidade reprodutiva, essa característica é prejudicial para fármacos, sendo necessária atenção em tratamentos de longa duração principalmente, para o manejo dos efeitos adversos (Tabela 5; TOGO et al., 2023).

A respeito da classificação da sua toxicidade aguda, os compostos 5, 6, e 9 apresentam classificação III, nocivo se ingerido, e todos os outros apresentam

classificação IV, pode ser prejudicial se ingerido (Tabela 5). O software PROTOX prediz a toxicidade oral aguda de acordo com a comparação com 38000 compostos cuja DL₅₀ já conhecida, e através das similaridades estruturais, é possível estimar qual a DL₅₀ de um composto desse modo, os compostos apresentam possibilidade alta de causar toxicidade oral aguda, tendo em vista seus valores de DL50, o que não é adequado para fármacos via oral (DRWAL et al., 2014).

A respeito dos efeitos tóxicos possíveis, os compostos 2 e 3 são hepatotóxicos, os compostos 7, 10, 11 e 12, são imunogênicos (Tabela 5). Os efeitos tóxicos preditos pelo PROTOX, estão relacionadas à capacidade destes compostos de causarem falha hepática aguda, enquanto que a imunotoxicidade está relacionada com a capacidade de diminuir a viabilidade celular das células do sistema imune, isso demonstra que caso estas moléculas tornem-se fármacos, deve-se prestar atenção em manejos de reações adversas para não afetar a adesão de pacientes (BANERJEE et al., 2018).

Em síntese, todos os compostos apresentaram tipo de toxicidade, existe uma diversidade de estudos que avaliam a capacidade de alcaloides de agirem ou não como agentes mutagênicos, a maioria aponta para a capacidade protetora ou não mutagênica (FRAGOSO et al., 2008; CERAVOLO et al., 2018; ZHAO et al., 2020), enquanto os mutagênicos demonstram ação sobre proteínas (FERREIRA; BRANDÃO; DOLABELA, 2020).

Ao se avaliar todos os resultados, as moléculas mais promissoras são o corinanteol, diidrocorinanteol e a aspidospermina, pela sua atividade já avaliada, pelas suas características físico químicas e perfil de toxicidade, e apenas essas moléculas passaram para o estudo com docagem molecular.

5.4 Docagem molecular

As proteínas para o estudo do docking foram selecionadas de acordo os resultados encontrados neste trabalho e no de Veiga et al (2022), tendo como foco o citoesqueleto e a bolsa flagelar/Flagelo, dentre elas estão a actina (Proteína 1), uma proteína do cinetócoro (Proteína 2), um transportador flagelar (Proteína 3) e uma proteína estrutural da bolsa flagelar (Proteína 4).

Considerando os valores de pontuação para a proteína 1, o corinanteol foi o mais promissor, pois apresentou o maior valor de ChemScore (CH) e o menor valor

de ΔG , em comparação com o ligante cristalografado (ADP), entretanto, contraditoriamente, o ADP apresentou um valor de GoldScore (GS) e de energia de Van Der Waals maior que os compostos testes (Tabela 6). O diidrocorinanteol apresentou valores um pouco abaixo ao do corinanteol, devido sua alta semelhança estrutural, e aspidospermina foi a única inferior ao ADP. Quanto mais baixa for a energia de ligação (ΔG) do complexo proteína-ligando, maior será a sua estabilidade, assim sendo, o corinanteol possui um valor de GoldScore maior e um ΔG menor que os ligantes de referência. demonstrando que o ligante cristalográfico se liga melhor que todos os compostos estudados (Tabela 6; JOSEPH et al., 2017).

Tabela 6 – Resultados do Docking molecular.

	Proteína	Composto	ChemScore	ΔG	GoldScore	VdW
Citoesqueleto	01	DCRN	30,72	-30,81	48,53	30,93
		CRN	31,30	-31,51	51,28	32,07
		ASPD	26,19	-28,86	42,21	30,38
		ADP*	28,19	-28,74	77,77	33,56
	02	DCRN	22,60	-24,15	22,98	16,71
		CRN	22,28	-22,41	35,16	21,21
		ASPD	22,33	-22,51	31,61	22,99
		Imidazol*	10,99	-11,00	18,20	8,87
03	DCRN	22,88	-23,01	36,72	25,45	
	CRN	24,51	-24,75	38,66	26,87	
	ASPD	22,88	-23,01	31,13	20,05	
Flagelo/Bolsa		GDP*	23,53	-23,69	63,55	36,55
Flagelar	04	DCRN	29,88	-29,88	33,04	24,03
		CRN	31,02	-31,38	36,80	26,76
	ASPD	30,79	-30,90	30,96	22,51	
	FPC4*	35,41	-35,55	54,15	37,93	

Legenda: *Ligante Inibitório Cristalografado; ΔG : Energia de ligação; VdW: Energia de Van Der Waals, DCRN; Diidrocorinanteol; CRN: Corinanteol; ASPD: Aspidospermina. Proteína 01: Actina; Proteína 02: Proteína do Cinetócoro, Proteína 03: Transportador intraflagelar e Proteína 04: Proteína Estrutural do Flagelo.

Para a proteína 2, todos os compostos apresentam valores de CS maiores que Imidazol, e valores menores de ΔG , demonstrando que necessitam menores quantidades de energia para que ocorra sua ligação, em comparação com o imidazol, e também todos os compostos estudados apresentaram valores maiores de GS e de energia de Van der Waals (Tabela 6). Para a proteína 03, apenas o Corinanteol apresentou valores de CS maiores e menor energia de ligação comparada ao ΔG , já no GS e energia de van der Walls, o GDP apresentou os maiores valores, demonstrando uma maior estabilidade, em comparação com os ligantes, entretanto, dentre os estudados, o corinanteol apresentou o melhor resultado (Tabela 6). Para a proteína 4, o ligante FCP4 apresentou os melhores resultados em todos os critérios, diante disso, dentre os compostos estudados, o corinanteol foi aquele que apresentou o melhor resultado, apesar dos valores de CS, ΔG , GS e van der Walls dentre eles apresentarem poucas variações (Tabela 6).

Quanto maior for o valor do GoldScore, maior será a capacidade de ligação aos resíduos de proteínas. As ligações de hidrogênio junto das hidrofóbicas desempenham um papel essencial na afinidade de ligação e a estabilidade dos complexos proteína-ligante. Além disso, quanto mais baixa for a energia de ligação (ΔG) do complexo proteína-ligando, maior será a sua estabilidade, assim sendo, os compostos que possuam um valor de GoldScore maior e um ΔG menor que os ligantes de referência, apresentariam teoricamente uma atividade biológica superior, o que ocorre para o Corinanteol na proteína 01 e proteína 03, para todos os compostos estudados na proteína 02, e com nenhum dos compostos na proteína 04, demonstrando que o ligante cristalográfico se liga melhor que todos os compostos estudados (Tabela 6; JOSEPH et al., 2017).

A função GoldScore utiliza uma função de pontuação baseada em campo de força, sendo composta por 4 componentes: energia de ligação de hidrogênio proteína-ligante, energia de van der Waals externa, energia de van der Waals interna do ligante, e a energia de ligação de hidrogênio intramolecular do ligante (ANNAMALA; INAMPUDI; GURUPRASAD, 2007), enquanto que a função ChemScore foi derivada empiricamente de 82 complexos de proteína ligante disponíveis, estimando a alteração total da energia livre que ocorre na ligação, utilizando como um dos seus critérios a área de interação hidrofóbica (WANG et al., 2015). Ambas as funções apresentam diferentes métodos algorítmicos, porém, os resultados conversam entre

si, possuindo diferentes abordagens que garantem um resultado mais acurado, o que ocorre neste estudo, onde para a proteína 01 o Chemscore do ligante ADP é o menor, porém seu GoldScore, é o maior, demonstrando as variações de energia, o mesmo ocorre para a proteína 03 onde o Chemscore do GDP é menor que o do corinanteol, porém seu GoldScore é muito maior (Tabela 6).

Com intuito de validar a metodologia utilizada, foi realizado o redocking de todos os compostos, e todos os foram considerados válidos, pois apresentaram Root Square Mean Deviation (RMSD) menor que 2 Å², para o ADP, foi encontrado o valor de 0,5776 Å²; para o Imidazol, 0,0046 Å²; para o GDP, 0,6911 Å²; e para o FCP4, 0,8074 Å² (Figura 12; CHEN et al., 2015).

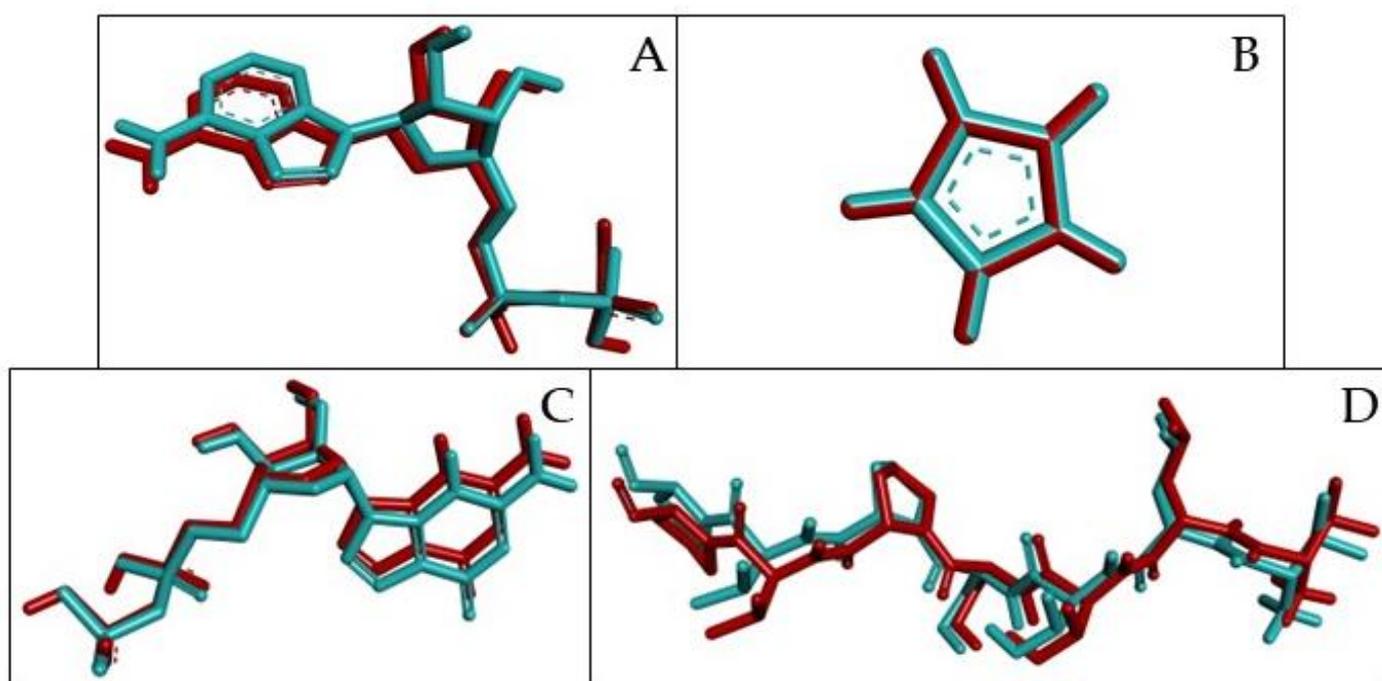


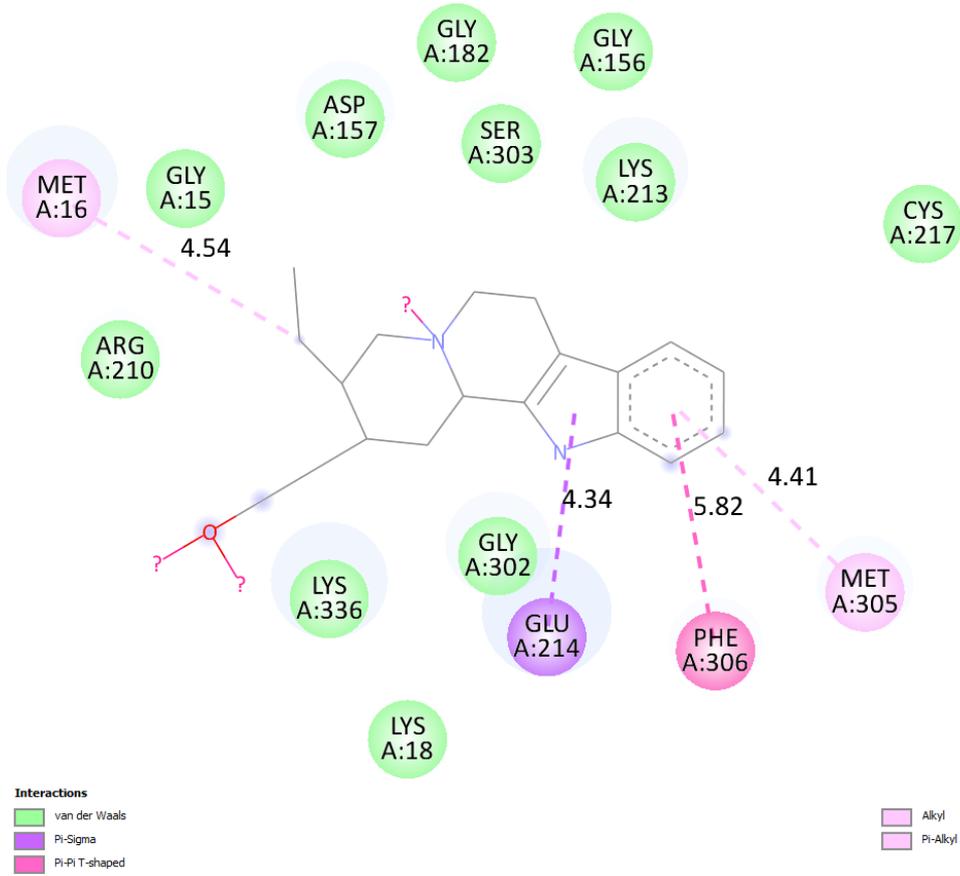
Figura 12 - Comparação entre as posições dos ligantes cristalografados (em azul) com a posição criada pelo programa (em vermelho). Legenda: A: ADP; B: Imidazol, C: GDP; D: FCP4.

A respeito das interações que presentes na Proteína 1, o diidrocorinanteol ligou-se ao aminoácido Met16 por ligação tipo alquil (4.54 Å), e com o Met305 via Pi-alquil (4.41 Å), uma ligação Pi-Sigma com Glu214 e, uma Pi-Pi em forma de T com Phe306 (5.82), e realizou 11 interações de Van der Waals, já o Corinanteol, realizou as mesmas ligações, porém com distâncias diferentes, Met16 (4.0 Å), Met305 (4.73

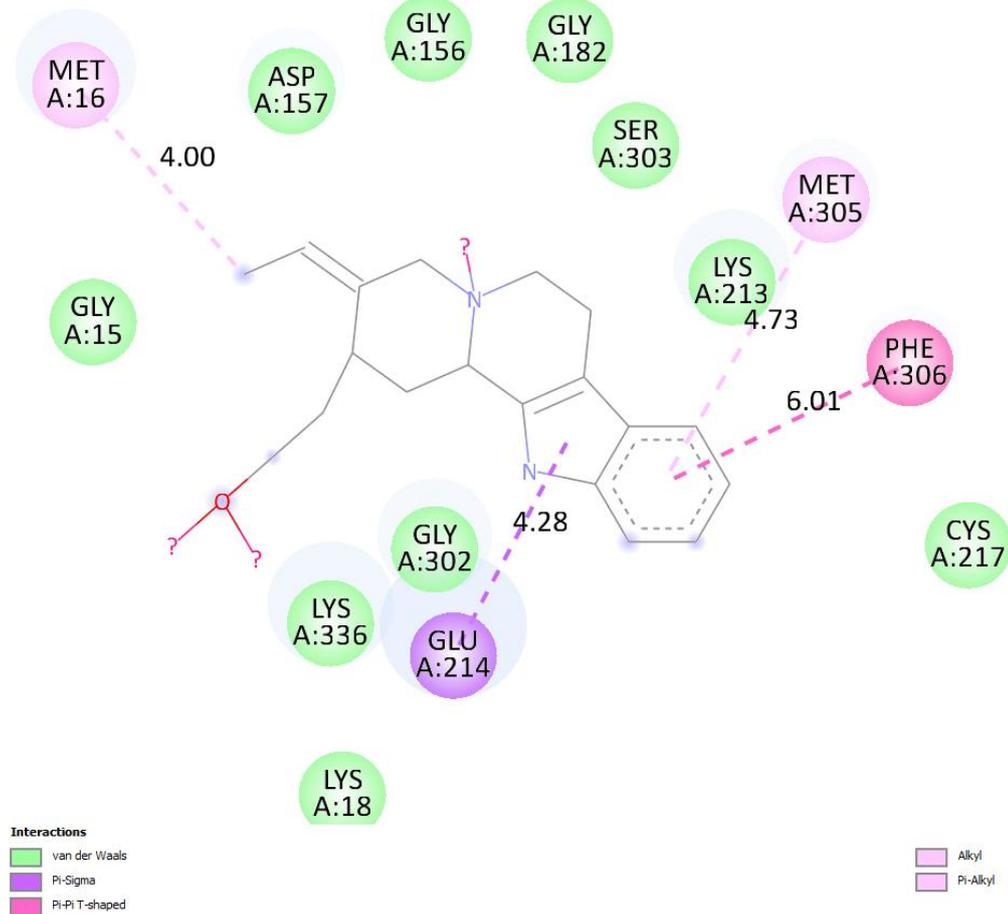
Å), Glu214 (4.28 Å) e, Phe306 (6.01), e realizou 10 interações de Wan der Waals. A aspidospermina realizou 3 ligações tipo alquil, com os aminoácidos Met305, Phe306 e Lys336 e 1 uma tipo Pi-alquil com a Lys213, além de 14 interações de Van Der Waals e, por último, o GDP, realizou uma ligação tipo Pi-Pi em forma de T com a Phe306 (6.44 Å), uma ligação Pi-sigma (4.28 Å) e uma Pi-alquil (5.69 Å) com a Met305 e uma ligação desfavorável com a Lys336 (6.34 Å), além de 4 ligações convencionais de hidrogênio com a Gly15 (3,88 Å), Met16 (4.05 Å), Asp157 (6.02 Å) e Gly302 (4.83 Å), além de 10 interações de Van der Waals (Figura 13).

O ADP forma uma ligação pi-sigma com a Met305, além de, todos os compostos testes formam uma ligação pi-alquil com o mesmo aminoácido, além de uma ligação pi-alquil em forma de T com a Phe306, semelhante a encontrada no diidrocorinanteol e o corinanteol, somado a isso, esses dois compostos apresentam uma ligação alquil com a Met16, não presente no ADP, que possui ligações de hidrogênio convencional, que são mais fracas, o que pode ser o que causou os maiores scores de ligação, tornando-os mais ativos (Figura 13). A actina é uma proteína presente no citoesqueleto, no flagelo, na bolsa flagelar e cinetoplasto, que são locais onde aconteceu alterações tanto no presente estudo quanto no de (VEIGA et al., 2022), de modo que, como os compostos por apresentarem afinidades maiores que o ADP, ocupariam o local de ação, e assim, impedindo a ligação do ADP ao sítio ativo, causando má formações nas zonas as quais essa proteína está presente, e modificações na atividade da actina, que pode ser uma das causas da perda da morfologia normal da leishmania, visualizadas nesse estudo (KOTILA et al., 2022).

A



B



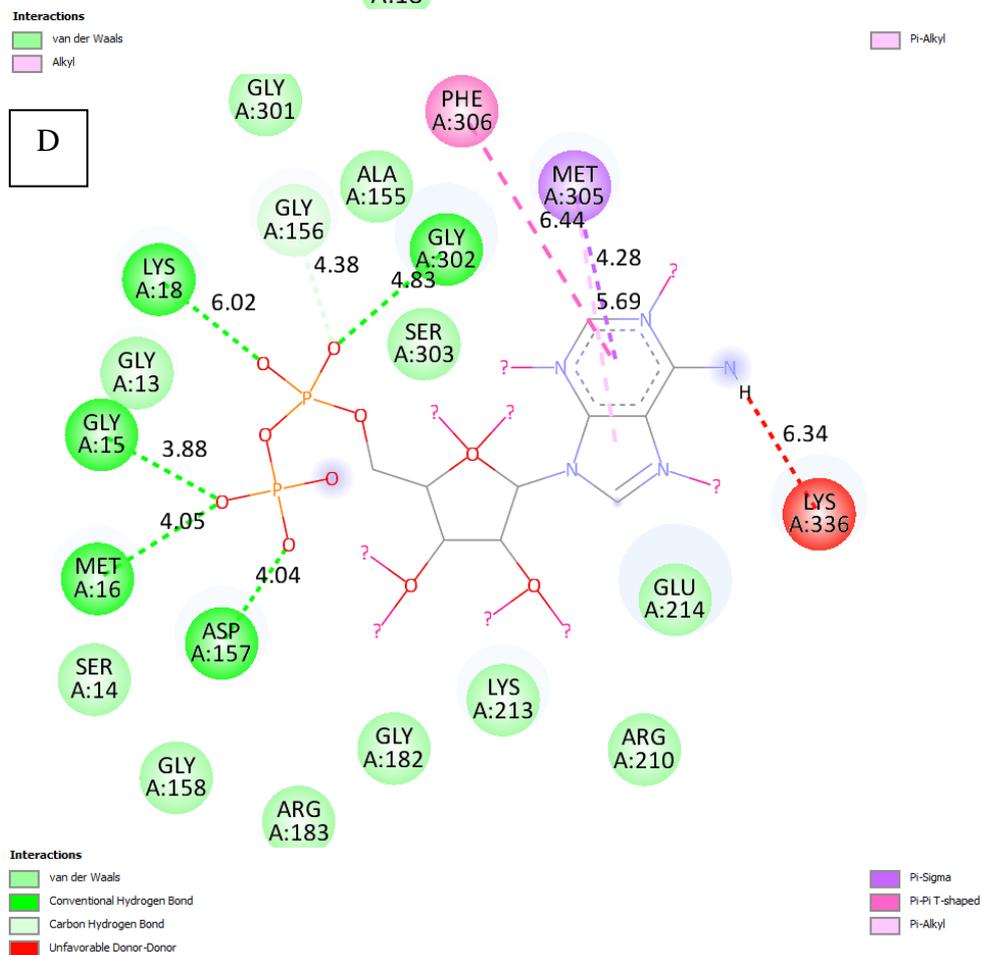
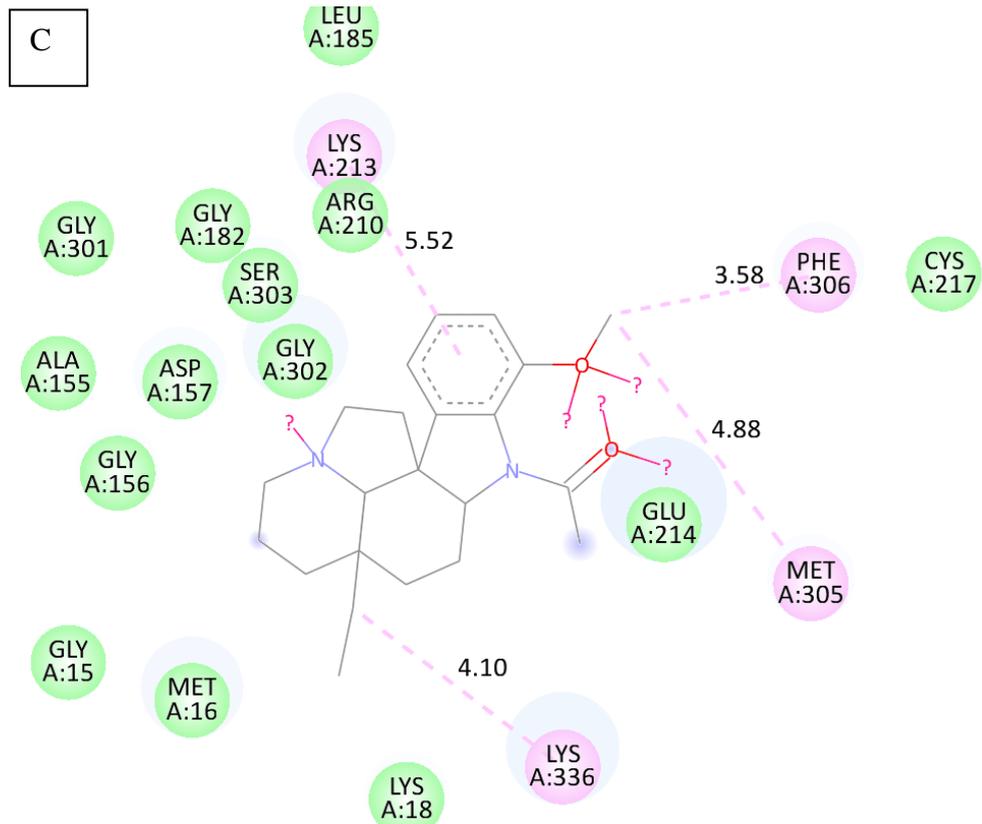
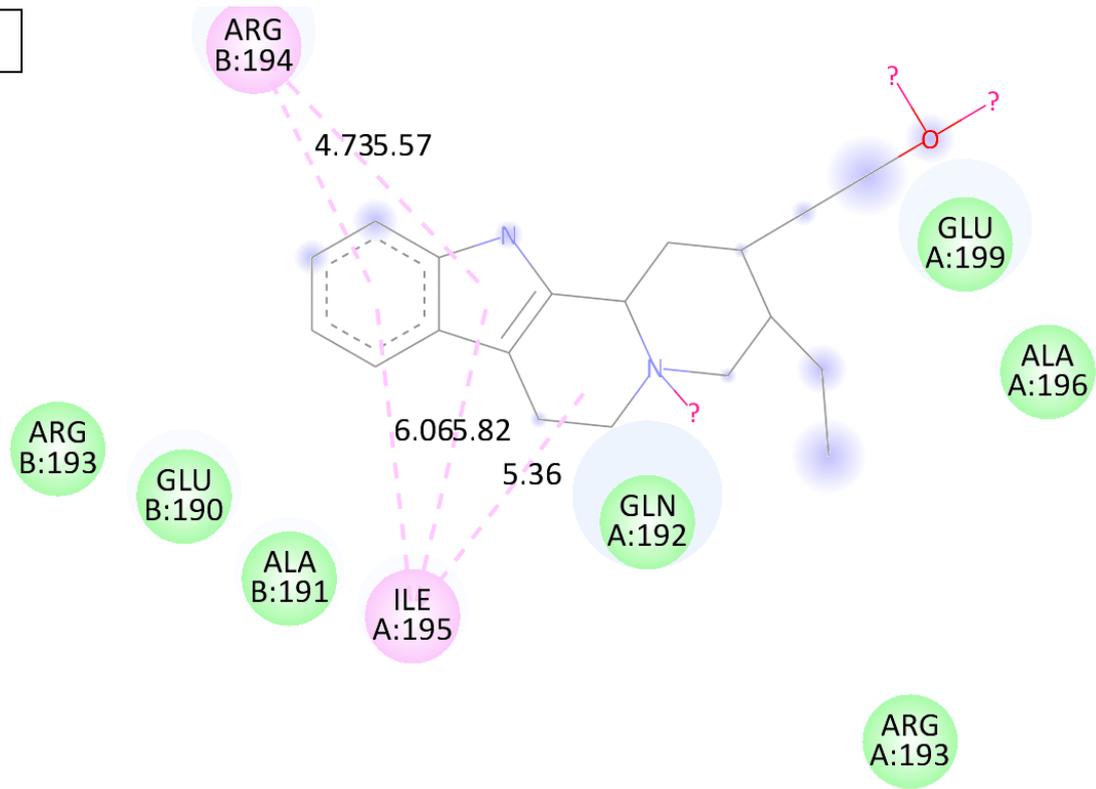


Figura 13 - Interações entre a Proteína 1 e ligantes. Legenda: A: Diidrocoringanteol; B: Corinanteol; C: Aspidospermina; D: Adenosina Difosfato (ADP).

Para a proteína 2, o diidrocorinanteol realizou 3 ligações do tipo alquil com a Arg194 (5.57 Å), e com a Ile195 (5.82 Å e 5.36 Å), duas Pi-alquil com a Arg194 (4.73 Å) e Ile195 (6.06 Å), e outras 7 interações de Van der Waals, para o corinanteol, realizou 1 ligação Pi-alquil com a Arg194 (4.73 Å), e 5 ligações do tipo alquil com a Ile195 (5.61 Å e 6.56 Å), Ala191 (7.33 Å) e Arg194 (5.61 Å), e outras 6 interações de Van der Waals, a Aspidospermina, realizou uma ligação Pi-alquil com a Arg194 (5.73 Å), e quatro ligações do tipo alquil com a Lys187 (5.22 Å e 4.75 Å), Ala191 (5.21 Å) e a Ile195 (5.19 Å), além de 6 interações de Van Der Waals, e por último, o Imidazol, realizou uma única ligação tipo Pi-alquil com a Ile195 (3.83 Å) e 5 interações de Van Der Waals (Figura 14).

O Imidazol apresenta uma única ligação com a Ile195, presente em todos os compostos que estudamos, e além de que, todos esses compostos apresentam outras ligações mais fortes com outros aminoácidos, que demonstram o porquê desses compostos todos apresentarem valores de afinidade maiores, comparado ao imidazol. Os cinetócoros são proteínas em forma de disco que se ligam ao cromossomo para conduzir à sua separação através da ligação aos microtúbulos, causando a migração dos cromossomos. Todos os compostos se ligam nos mesmos aminoácidos, e com ligações mais fortes, por isso, há maiores valores de GoldScore, devido sua ação nos microtúbulos, mudanças na atividade dessa proteína poderiam ser uma outra causa da perda da morfologia normal (Figura 14; LUDZIA et al., 2021).

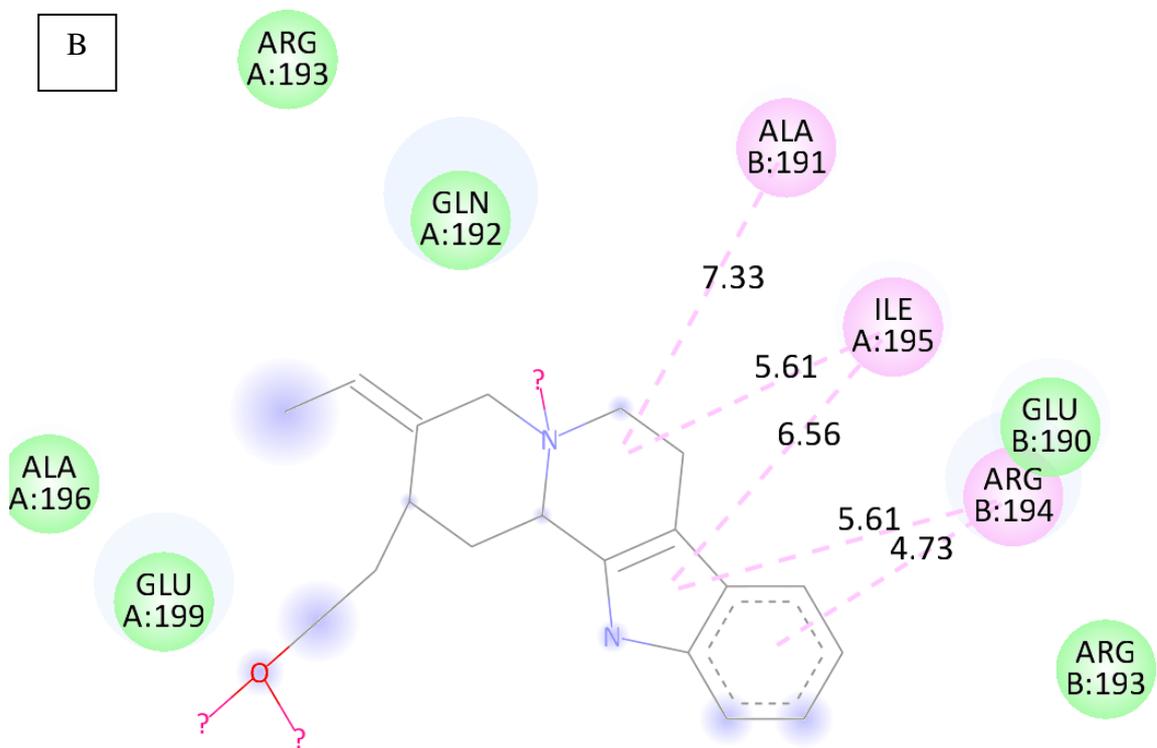
A



Interactions
van der Waals
Alkyl

Pi-Alkyl

B



Interactions
van der Waals
Alkyl

Pi-Alkyl

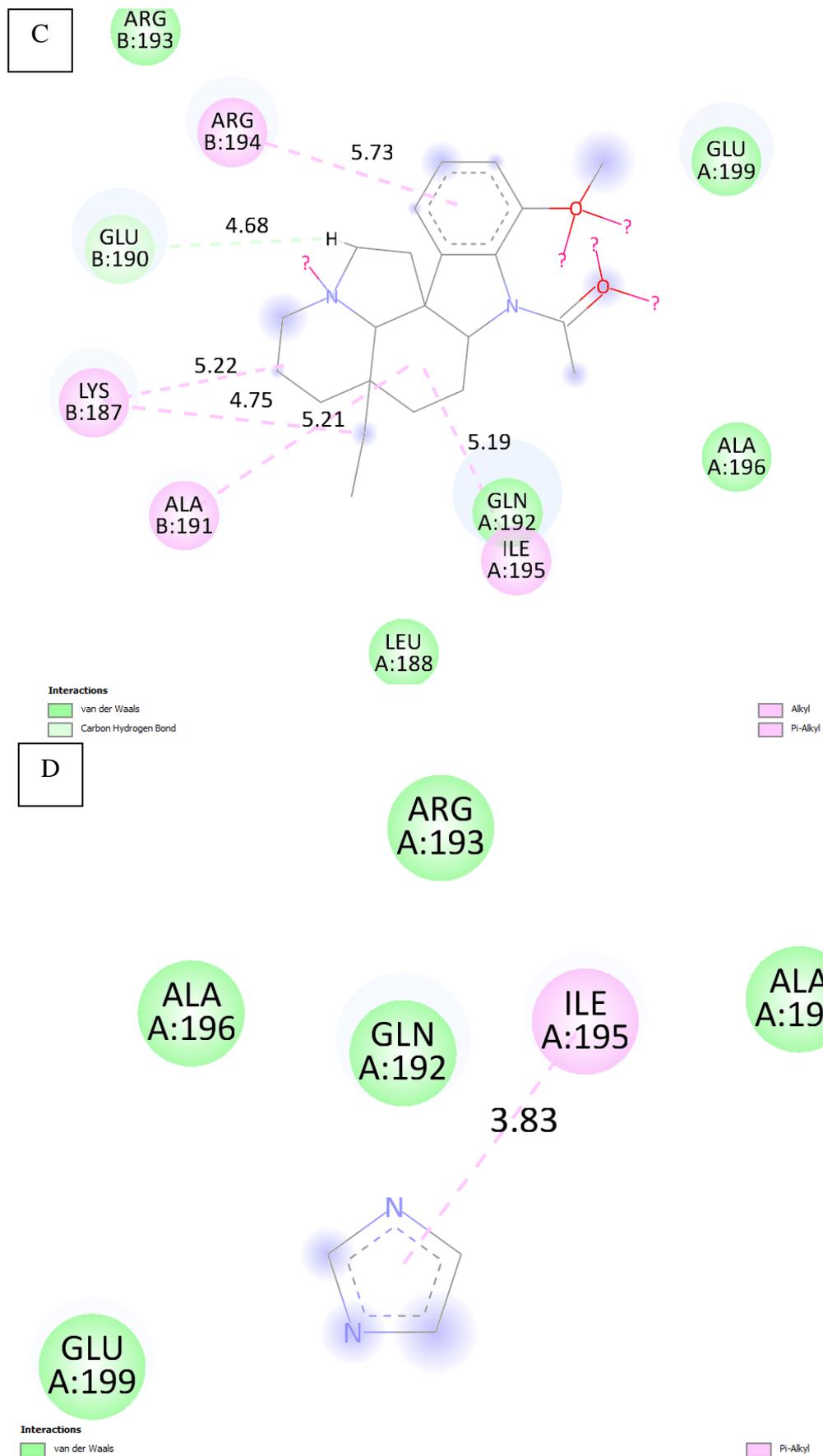


Figura 14 - Interações entre a Proteína 2 e ligantes. Legenda: A: Diidrocorinanteol; B: Corinanteol; C: Aspidospermina; D: Imidazol;

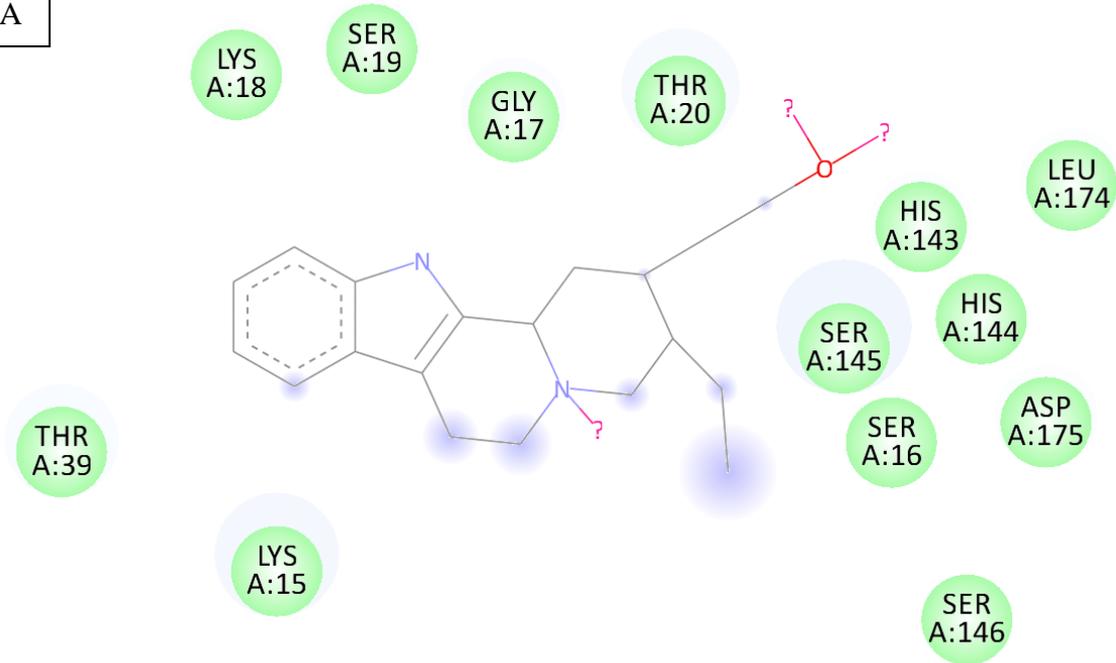
As interações que ocorrem na proteína 3, para o diidrocorinanteol, ocorrem apenas 13 interações de Van Der Waals, sem ocorrer nenhuma ligação, para o corinanteol, ocorreu uma ligação do tipo alquil com a Lys (5.18 Å) e uma do tipo Pi-alquil com a Leu174 (6.39 Å) e 11 interações de Van Der Waals, para a Aspidospermina, ocorreram 3 ligações do tipo alquil com a Lys18 (3.56 Å) e com a Lys15 (4.41 Å e 5.34 Å), e 9 interações de Van Der Waals, e por último, para o GDP, ocorrem 4 ligações convencionais de hidrogênios com a Ser19 (3.63 Å), Gly17 (3.92 Å), Lys15 (6.15 Å) e com a Thr20 (3.63 Å), além de 11 interações de Van der Waals (Figura 15).

O corinanteol e a aspidospermina possuem valores de afinidade maiores que o GDP, e isso ocorre principalmente pelos diferentes tipos de ligações presentes, enquanto que o GDP apresenta apenas ligações convencionais de hidrogênio, os dois compostos testes formam ligações do tipo alquil para a aspidospermina, enquanto que o corinanteol forma ligações do tipo alquil e pi-alquil, que são mais estáveis e mais fortes.

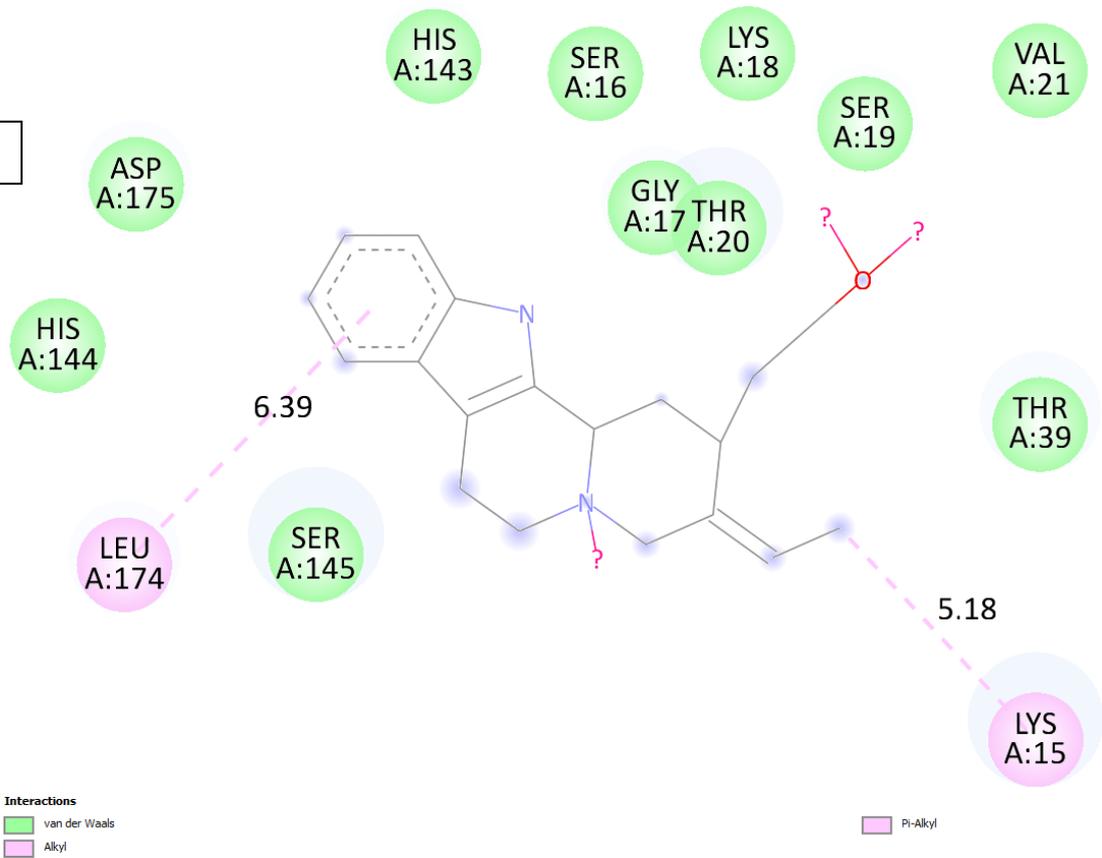
Desse modo, o transportador intraflagelar se liga à guanosina, de modo que, essa preferência do pelo GDP ao invés do GTP, torna esse transportador mais presente no citoplasma. Outros transportadores celulares já foram identificados, e cada transportador pode trazer uma presença diferente dependendo do organismo, como por exemplo, o Transportador Intraflagellar 25 (IFT25) e o Transportador Intraflagellar 27 (IFT27) não são necessários para a formação de cílios traqueais em ratos, porém são vitais para a formação do flagelo espermático (EGUETHER et al., 2014; ZHANG et al., 2017a; WACHTER et al., 2019).

Assim sendo, como os compostos em estudo apresentam uma afinidade maior que o GDP, pode, teoricamente, impedir uma boa formação do flagelo devido possíveis alterações flagelares, contraditoriamente, o diidrocorinanteol foi o único que não apresentou ligações a não ser interações de van der Waals, e as alterações flagelares visualizadas no presente estudo ocorreram no diidrocorinanteol, o que pode inferir que o método que causa seus danos flagelares são diferentes do que estudamos.

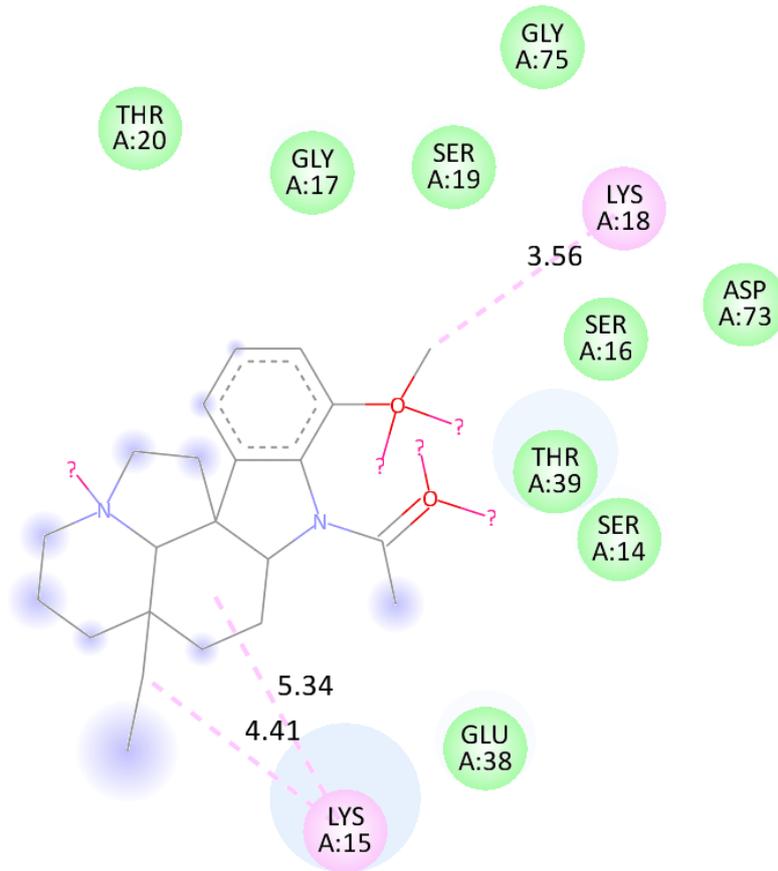
A



B



C



D

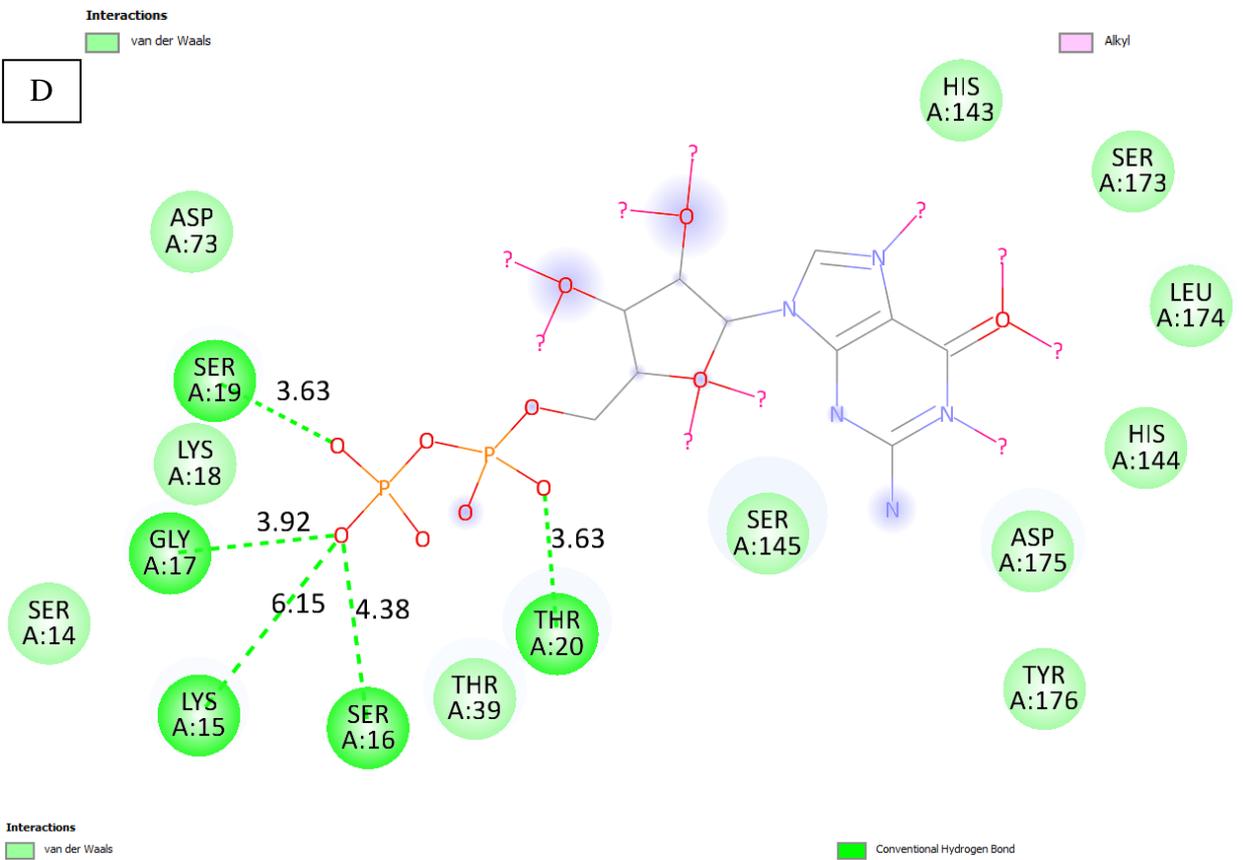


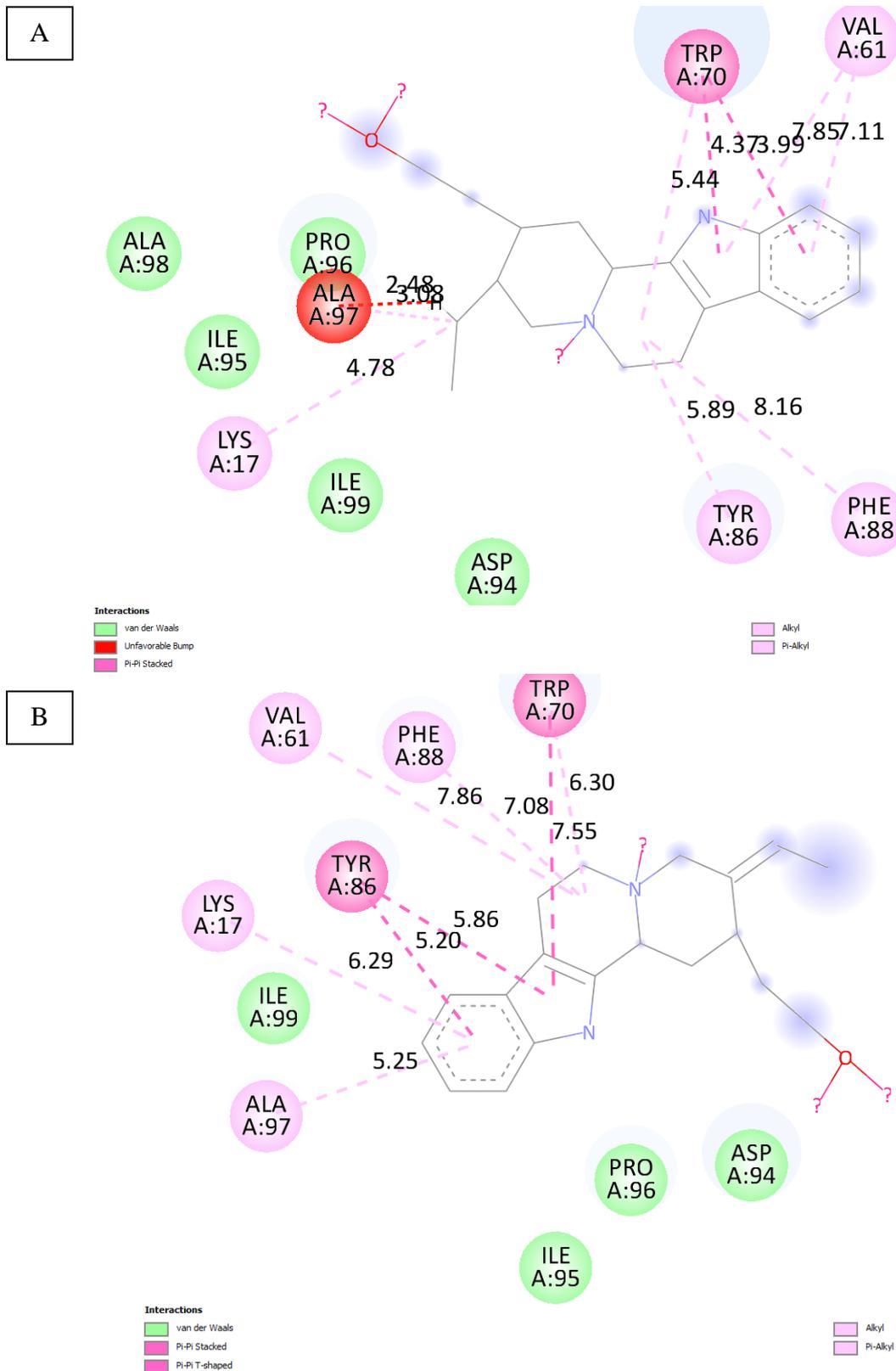
Figura 15 - Interações entre a Proteína 3 e ligantes. Legendas: A: Diidrocorinanteol; B: Corinanteol; C: Aspidoespermina; D: GDP;

Para as interações que ocorrem na proteína 4, o diidrocorinanteol realizou 2 ligações Pi-Pi em forma de T com o Trp70 (4.37 Å e 3.99 Å), uma ligação Pi-alquil com a Val61 (7.11 Å), e seis ligações do tipo alquil, com a Val61 (7.85 Å), Trp70 (5.44 Å), Phe88 (8.16 Å), Tyr86 (5.89 Å), Lys17 (4.78 Å) e com a Ala97 (3.78 Å), e uma interação desfavorável também com a Ala97 (2.48 Å), além de 5 interações de Van der Waals, já com o corinanteol, ocorreram 3 ligações do tipo Pi-Pi em forma de T com a Trp70 (7.55 Å) Tyr86 (5.20 Å e 5.86 Å), 2 ligações Pi-alquil com a Lys17 (6.29 Å) e Ala97 (5.25 Å) e 2 ligações alquil, com a Val61 (7.86 Å) e com a Phe88 (7.08 Å), além de 4 interações de Van der Waals. Já a Aspidospermina, realizou 5 ligações do tipo Pi-alquil com a Phe88 (6.97 Å), Tyr86 (5.47 Å) e com o Trp70 (6.66 Å, 4.89 Å e 6.40 Å), uma do tipo Amida em forma de T com a Trp70 (5.87 Å), e 6 interações de Van der Waals, e por fim, o GDP, realizou duas ligações Pi-Sigma com a Phe88 (4.79 Å) e Phe63 (4.52 Å), uma pi-alquil com a Phe88 (6.95 Å), três do tipo alquil com a Pro96 (5.21 Å), Tyr86 (5.79 Å) e Val61 (5.82 Å), duas convencionais de Hidrogênio com a Ala97 (4.60 Å e 3.94 Å), e por último, 5 interações de Van Der Waals (Figura 16).

O colar da bolsa flagelar é uma estrutura específica do citoesqueleto dos Cinetoplastídeos, presente no pescoço da bolsa flagelar, responsável pela manutenção das atividades relacionadas ao flagelo, tanto na *Leishmania* quanto no *Trypanossoma* (ISCH et al., 2021), e a proteína BILBO2, são proteínas indispensáveis para o desenvolvimento da bolsa flagelar, de modo que caso a proteína seja inibida ou modificada, a biogênese do colar e da bolsa flagelar é feita erroneamente (BONHIVERS et al., 2008), essa inibição pode ser o mecanismo de ação dos compostos em estudo, devido a presença de alterações flagelares, como flagelo duplos, curtos e não existentes.

Os resíduos Phe63, Phe88 e Trp70 são os principais envolvidos na interação com o FPC4, demonstrado experimentalmente e com os nossos estudos (ISCH et al., 2021), dito isso, o ligante FCP4 apresenta o maior valor de GoldScore, comparado aos compostos estudados, isso pode ser causado devido tamanho da molécula, permitindo outros tipos de interação, e sua natureza peptídica. Desse modo, apenas o FCP4 se liga no aminoácido Phe63, e a dupla ligação com a Phe88, o que pode ter causado os maiores valores de afinidade, em contrapartida, os compostos de estudo se ligam ao Trp70 através de ligações alquil e pi-alquil, e na Phe88 também por pi-

alquil e alquil, de modo que justifica seus valores próximos ao do ligante, além disso, há uma ligação desfavorável que causa instabilidade no diidrocorinanteol (Figura 16).



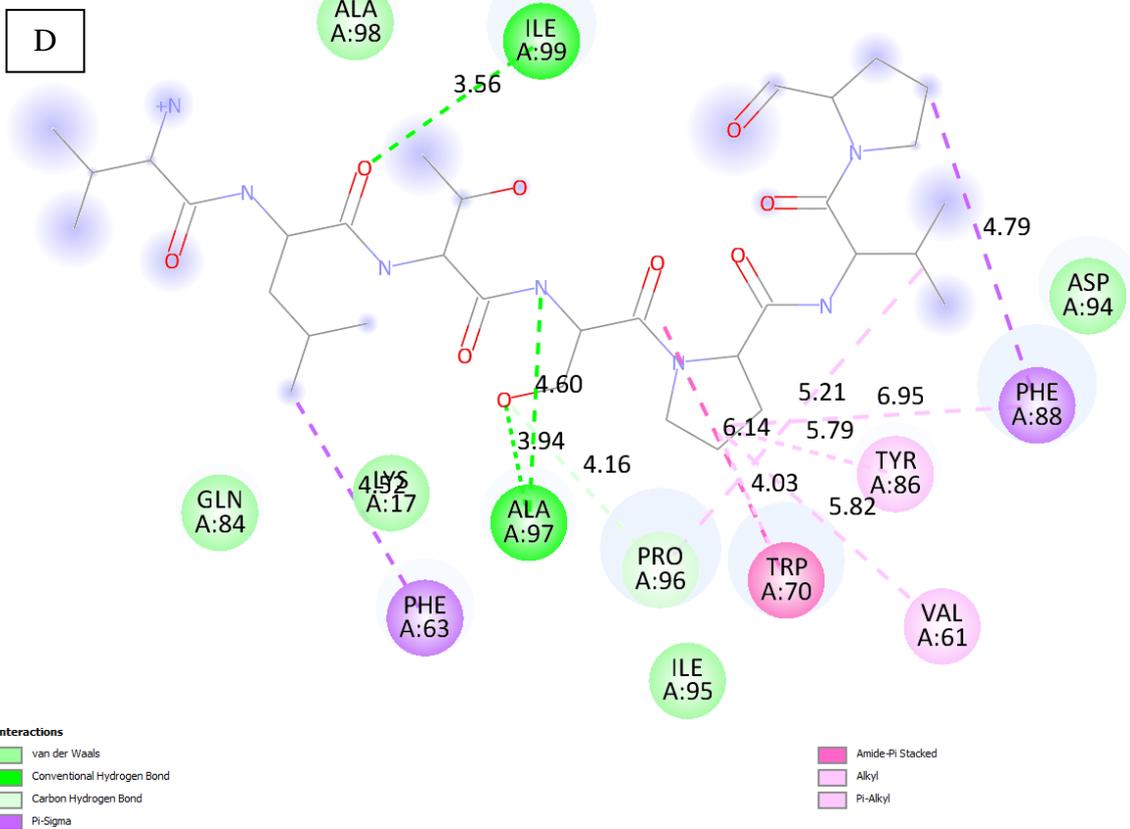
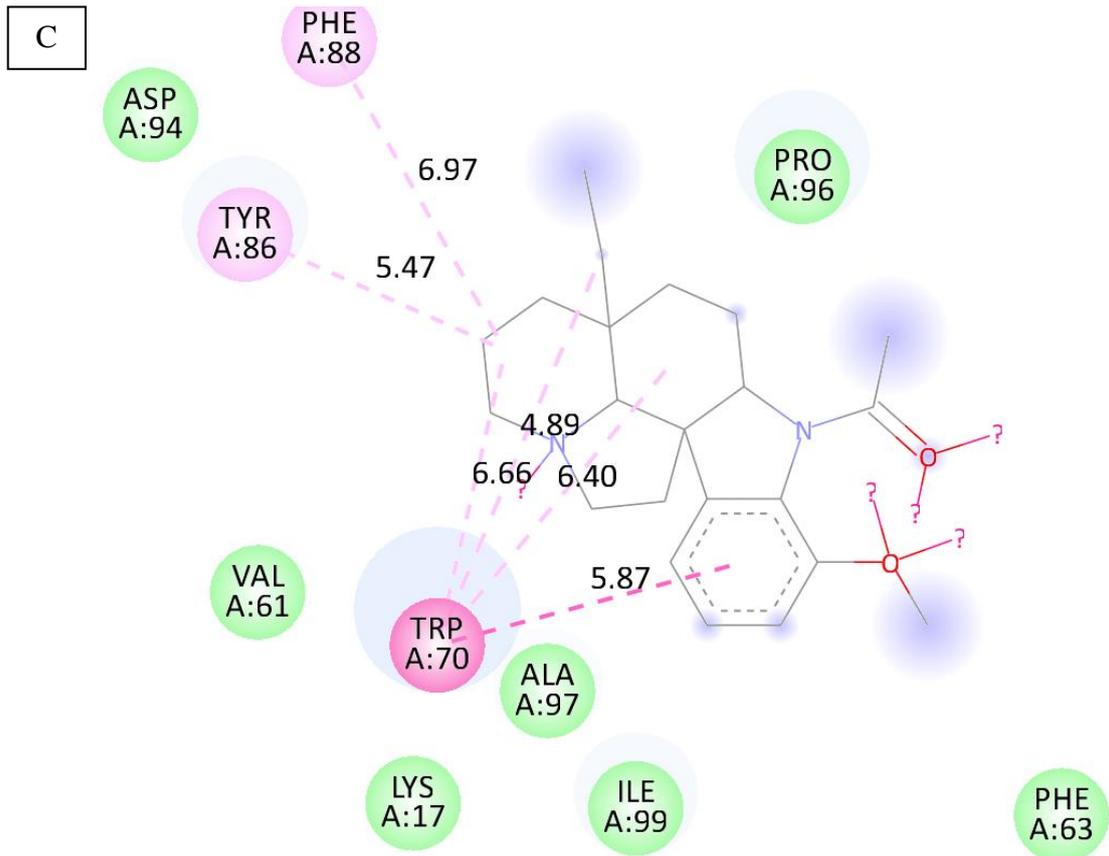


Figura 16 - Interações entre a Proteína 4 e ligantes. Legendas: A: Dihidrocorinanteol; B: Corinanteol; C: Aspidospermina; D: FCP4;

Com base nisso, possivelmente, os compostos podem ocupar o local de ligação do FCP4, por serem menores e interagirem com aminoácidos importantes para essa ligação, ocupando o espaço onde esse composto se ligaria (Não totalmente devido a presença de outras interações que não ocorrem) mas o suficiente para causar a inibição parcial da BILBO, o que pode levar as alterações flagelares, principalmente na bolsa flagelar. Os resultados deste trabalho são uma tentativa de entender quais os mecanismos por trás dos danos causados pela *A. nitidum* contra a *Leishmania spp*, os achados deste estudo são muito promissores apesar de não serem conclusivos, estudos mais complexos como de Western Blott e proteômicas serão de vital importância para elucidar de maneira comprobatória a capacidade inibitória destes alcalóides nessas proteínas.

6 CONCLUSÃO

A atividade antileishmania de *A. nitidum* está relacionada aos alcaloides, causando alterações de citoesqueleto e flagelo. Quando se avalia qual alcaloide de *A. nitidum* é o mais promissor como antileishmania, observa-se que apenas o 10 não parece ter propriedades físico-químicas adequadas, nos aspectos farmacocinéticos existem variações significativas e os alcaloides com os piores perfis de toxicidade são 2, 3, 7 e 10. Deste modo, foram selecionados o diidrocorinanteol, corinanteol e aspidoespermina para os estudos de docagem, sendo que o corinanteol foi a molécula mais promissora podendo agir tanto no citoesqueleto quanto no flagelo. O diidrocorinanteol age tanto no flagelo quanto no citoesqueleto, com interações mais frágeis, e de menor estabilidade. Com isso, são necessários estudos mais aprofundados, como western Blott, para a comprovação biológica da atividade nessas proteínas.

REFERÊNCIAS

- AJAY; BEMIS, G. W.; MURCKO, M. A. Designing Libraries with CNS Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 4942–4951, 2 dez. 1999.
- AMES, B. N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 31, n. 6, p. 347–363, dez. 1975.
- AÑEZ, R. B. S. **Análise morfoanatômica das folhas e casca de *Aspidosperma nitidum* Benth e *Aspidosperma marcgravianum* Woodson (Apocynaceae) com abordagem farmacognóstica e etnofarmacológica**. Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2009.
- ANNAMALA, M. K.; INAMPUDI, K. K.; GURUPRASAD, L. Docking of phosphonate and trehalose analog inhibitors into *M. tuberculosis* mycolyltransferase Ag85C: Comparison of the two scoring fitness functions GoldScore and ChemScore, in the GOLD software. **Bioinformatics**, v. 1, n. 9, p. 339–350, 2 jan. 2007.
- ANTOINE, J.-C. et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 392–401, out. 1998.
- ARNDT, R. R. et al. Alkaloid studies- LVIII: The alkaloids of six *Aspidosperma* species. **Phytochemistry**, v. 6, p. 1653–1658, 1967.
- BANERJEE, P. et al. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W257–W263, 2 jul. 2018.
- BENFENATI, E.; MANGANARO, A.; GINI, G. VEGA-QSAR: AI inside a platform for predictive toxicology. **Chemistry Central Journal**, v. 1107, p. 21–28, 2013.
- BONHIVERS, M. et al. Biogenesis of the Trypanosome Endo-Exocytotic Organelle Is Cytoskeleton Mediated. **PLoS Biology**, v. 6, n. 5, p. e105, 6 maio 2008.
- BRANDÃO, D. L. do N. et al. Anti-malarial activity and toxicity of *Aspidosperma nitidum* Benth: a plant used in traditional medicine in the Brazilian Amazon. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e5059108817, 5 out. 2020.
- BRÍGIDO, H. P. C. et al. Atividade antimicrobiana de *Aspidosperma nitidum* benth (apocynaceae). **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 10, p. e4123, 15 out. 2020.
- BRÍGIDO, H. P. C. **Toxicidade e atividade antileishmania in vivo de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. Arg. (Apocynaceae)**. 2021. Universidade Federal do Pará, Belém, 2021.
- BRÍGIDO, H. P. C. et al. Evaluation of acute and subacute toxicity of ethanolic extract and fraction of alkaloids from bark of *Aspidosperma nitidum* in mice. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 18283, 14 set. 2021.
- BRINDHA, J.; BALAMURALI, M. M.; CHANDA, K. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 12 mar. 2021.

BROGI, S. et al. Editorial: In silico Methods for Drug Design and Discovery. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 7 ago. 2020.

CARNIELLI, J. B. T. et al. Natural Resistance of *Leishmania infantum* to Miltefosine Contributes to the Low Efficacy in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 789–794, 2 out. 2019.

CASSANO, A. et al. CAESAR models for developmental toxicity. **Chemistry Central Journal**, v. 4, n. S1, p. S4, 29 jul. 2010.

CDC. **Leishmaniasis: Life Cycle.**

CERAVOLO, I. P. et al. *Aspidosperma pyriformium*, a medicinal plant from the Brazilian caatinga, displays a high antiplasmodial activity and low cytotoxicity. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 436, 26 dez. 2018.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 3 jul. 2019.

CHEN, M. et al. Molecular basis of laccase bound to lignin: insight from comparative studies on the interaction of *Trametes versicolor* laccase with various lignin model compounds. **RSC Advances**, v. 5, n. 65, p. 52307–52313, 2015.

COATTI, G. C. et al. Cytotoxicity, genotoxicity and mechanism of action (via gene expression analysis) of the indole alkaloid aspidospermine (antiparasitic) extracted from *Aspidosperma polyneuron* in HepG2 cells. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 1161–1170, 17 ago. 2016.

COINTE, L. P. **Árvores e Plantas Úteis (Indígenas e Aclimadas)**. 2. ed. [s.l: s.n.]v. 251

DA SILVA E SILVA, J. V. et al. Flavopereirine—An Alkaloid Derived from *Geissospermum vellosii*—Presents Leishmanicidal Activity In Vitro. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 785, 21 fev. 2019.

DE MACEDO-SILVA, S. T. et al. In Vitro Activity of the Antifungal Azoles Itraconazole and Posaconazole against *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e83247, 23 dez. 2013.

DEL VITO, L. A.; PETENATTI, E. M. ; PETENATTI, M. E. Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina) primera parte: plantas nativas. **Multequina** , v. 6, p. 49–66, 1997.

DRWAL, M. N. et al. ProTox: a web server for the *in silico* prediction of rodent oral toxicity. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. W53–W58, 1 jul. 2014.

EGUETHER, T. et al. IFT27 Links the BBSome to IFT for Maintenance of the Ciliary Signaling Compartment. **Developmental Cell**, v. 31, n. 3, p. 279–290, nov. 2014.

ERTL, P. Polar Surface Area. Em: [s.l: s.n.]p. 111–126.

ESTRELLA, E. Plantas medicinales amazónicas: realidad y perspectivas. Em: TRATADO DE COOPERACIÓN AMAZONICA (TCA), Lima. **Anais...** Lima: Ediciones TCA, 1995.

FERREIRA, G. G.; BRANDÃO, D. L. do N.; DOLABELA, M. F. Predição do comportamento farmacocinético, toxicidade e de atividades biológicas de alcaloides

isolados de *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, p. e27991211056, 24 dez. 2020.

FRAGOSO, V. et al. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 3, p. 559–566, abr. 2008.

FUJITA, T.; WINKLER, D. A. Understanding the Roles of the “Two QSARs”. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 2, p. 269–274, 22 fev. 2016.

GADELHA, A. P. R.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; DE SOUZA, W. Assembly of the *Leishmania amazonensis* flagellum during cell differentiation. **Journal of Structural Biology**, v. 184, n. 2, p. 280–292, nov. 2013.

GALVIS-OVALLOS, F. et al. LEISHMANIOSES NO BRASIL: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, DESAFIOS E PERSPECTIVAS. Em: **Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Protozoários**. [s.l.] Stricto Sensus Editora, 2020. p. 227–255.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Modelagem Molecular de Fármacos. **Revista Processos Químicos**, v. 2, n. 4, p. 24–36, 1 jul. 2008.

HALLIDAY, C. et al. Trypanosomatid Flagellar Pocket from Structure to Function. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 4, p. 317–329, abr. 2021.

ISCH, C. et al. Structural and functional studies of the first tripartite protein complex at the *Trypanosoma brucei* flagellar pocket collar. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 8, p. e1009329, 2 ago. 2021.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. **Journal of Molecular Biology**, v. 245, n. 1, p. 43–53, jan. 1995.

JOSEPH, P. et al. Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1. **Circulation Research**, v. 121, n. 6, p. 677–694, set. 2017.

KAPETAS, A. J. et al. Evidence-Based Guidelines for Drug Interaction Studies: Model-Informed Time Course of Intestinal and Hepatic CYP3A4 Inhibition by Clarithromycin. **The AAPS Journal**, v. 23, n. 5, p. 104, 31 set. 2021.

KATHURIA, H. et al. Enhancement of Skin Delivery of Drugs Using Proposome Depends on Drug Lipophilicity. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1457, 13 set. 2021.

KOTILA, T. et al. Structural basis of rapid actin dynamics in the evolutionarily divergent *Leishmania* parasite. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 3442, 15 jun. 2022.

LAINSON, R.; SHAW, J. Evolution, classification and geographical distribution. Em: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. 1p. 1–120.

LANZA, J. S. et al. Recent advances in amphotericin B delivery strategies for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 10, p. 1063–1079, 3 out. 2019.

LAZAR, L. T. Y.; ABASS, K. S. Morphology, life cycle, pathogenesis and virulence factors of genus *Leishmania*: a review. **Plant Archives**, v. 20, n. 2, p. 4057–4060, 2020.

LEITE, R. **Elucidação estrutural por RMN de alcaloides indólicos dos extratos de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. Arg. e *Aspidosperma pyriforme* Mart. (Apocynaceae)**. 2016. Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2016.

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

LUDZIA, P. et al. Structural characterization of KKT4, an unconventional microtubule-binding kinetochore protein. **Structure**, v. 29, n. 9, p. 1014–1028.e8, set. 2021.

MARCONDES-FERREIRA, N. W. ***Aspidosperma* Mart., nom. cons. (Apocynaceae): estudos taxonômicos**. 1988. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

MARQUES ADADE, C. Contributions of Ultrastructural Studies to the Cell Biology of Trypanosomatids: Targets for Anti-Parasitic Drugs. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, n. 1, p. 178–187, 15 mar. 2010.

MARQUES, M. F. S. et al. Indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 963–967, fev. 1996.

MARTINS, T. M. **Estudo farmacognóstico, fitoquímico e atividades biológicas de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Mull. Arg.** 2012. Universidade Federal do Pará., Belém, 2012.

MATOS, F. J. de A. **Introdução à fitoquímica experimental (3ª edição)**. 3. ed. Ceará: Editora da Universidade Federal do Ceará, 2009.

MCULE. **PROPERTY CALCULATOR**. Disponível em: <<https://mcule.com/>>. Acesso em: 15 out. 2023.

MILLIKEN, W.; ALBERT, B. The use of medicinal plants by the Yanomami Indians of Brazil, Part II. **Economic Botany**, v. 51, n. 3, p. 264–278, jul. 1997.

MOOLGAVKAR, S. H.; KNUDSON, A. G. Mutation and Cancer: A Model for Human Carcinogenesis2. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 66, n. 6, p. 1037–1052, 1 jun. 1981.

MURATOV, E. N. et al. QSAR without borders. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 11, p. 3525–3564, 2020.

NASCIMENTO, M. S. do. **Investigação fitoquímica e das atividades antioxidante e antiparasitária do extrato e frações de *Aspidosperma excelsum* Benth.** 2013. Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

NATIONS, U. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://digitallibrary.un.org/record/660120>>. Acesso em: 16 out. 2023.

NETO, L. R. de S. et al. In silico Strategies to Support Fragment-to-Lead Optimization in Drug Discovery. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 18 fev. 2020.

NGURE, P. et al. In vitro antileishmanial activity of extracts of *Warburgia ugandensis* (Canellaceae), a Kenyan medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 2, p. 61–66, fev. 2009.

- OLIVEIRA, B.; DUTHIE, M.; PEREIRA, V. Vaccines for leishmaniasis and the implications of their development for American tegumentary leishmaniasis. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 16, n. 4, p. 919–930, 2 abr. 2020.
- OLIVEIRA, S. S. et al. Overcoming multi-resistant leishmania treatment by nanoencapsulation of potent antimicrobials. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 96, n. 8, p. 2123–2140, 24 ago. 2021.
- OLIVEIRA, V. B. et al. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 92–99, 2009.
- PEREIRA, M. de M. et al. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 970–983, ago. 2007.
- PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 4 set. 2019.
- QUEIROZ, C. M. **Avaliação da atividade in vitro de novos compostos heterocíclicos frente às formas promastigotas e amastigotas de Leishmania infantum**. 2019. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.
- RIBEIRO, J. M. C. Vector salivation and parasite transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 82, n. suppl 3, p. 1–3, 1987.
- SALES, M. **Estudo fitoquímico de *Aspidosperma nitidum* (Benth)**. 2019. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.
- SANTOS-TRINDADE, R. C. **Caracterização farmacognóstica e farmacobotânica das folhas de *Aspidosperma excelsum* Benth. (Apocynaceae)**. 2014. Universidade Federal Rural da Amazônia, Manaus, 2014.
- SARMIENTO-SALINAS, F. L. et al. Reactive oxygen species: Role in carcinogenesis, cancer cell signaling and tumor progression. **Life Sciences**, v. 284, p. 119942, nov. 2021.
- SOUZA, W. de; CARVALHO, T. M. U. de; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1–18, 2010.
- SRIVASTAVA, S. et al. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 49, 31 dez. 2017.
- SUNDAR, S. et al. Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 1104–1107, out. 2000.
- TEIXEIRA, D. E. et al. **Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 2013.
- TOGO, M. V. et al. TIRESIA: An eXplainable Artificial Intelligence Platform for Predicting Developmental Toxicity. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 63, n. 1, p. 56–66, 9 jan. 2023.
- TOMCHINSKY, B. et al. Ethnobotanical study of antimalarial plants in the middle region of the Negro River, Amazonas, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 3, p. 203–212, jul. 2017.

- ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464–480, 20 abr. 2018.
- VEIGA, A. S. S. **Atividade antileishmania de plantas da Amazônia**. 2013. Dissertação de Mestrado (Pós graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.
- VEIGA, A. do S. S. da et al. Atividade leishmanicida de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. Arg. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e50210212646, 26 fev. 2021.
- VEIGA, A. do S. S. da et al. Activity of alkaloids from *Aspidosperma nitidum* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 8662, 23 maio 2022.
- VIJAYAKUMAR, S.; DAS, P. Recent progress in drug targets and inhibitors towards combating leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 181, p. 95–104, maio 2018.
- WACHTER, S. et al. Binding of IFT22 to the intraflagellar transport complex is essential for flagellum assembly. **The EMBO Journal**, v. 38, n. 9, 2 maio 2019.
- WANG, W. et al. <sc>TS</sc> -Chemscore, a Target-Specific Scoring Function, Significantly Improves the Performance of Scoring in Virtual Screening. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, n. 1, p. 1–8, 8 jul. 2015.
- WENIGER, B. et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. 2–3, p. 193–200, dez. 2001.
- WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 647–662, fev. 2011.
- WHO. **Global leishmaniasis surveillance: 2021, assessing the impact of the COVID-19**. [s.l.: s.n.].
- YAZDANIAN, M. et al. Correlating partitioning and caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 9, p. 1490–1494, 1998.
- YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man – fact or myth. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 6, p. 763–766, 1997.
- ZHANG, Y. et al. Intraflagellar transporter protein (IFT27), an IFT25 binding partner, is essential for male fertility and spermiogenesis in mice. **Developmental Biology**, v. 432, n. 1, p. 125–139, dez. 2017a.
- ZHANG, Y.-N. et al. The Blood-Brain Barrier Permeability of Six Indole Alkaloids from *Uncariae Ramulus Cum Uncis* in the MDCK-pHaMDR Cell Monolayer Model. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1944, 10 nov. 2017b.
- ZHAO, Y.-L. et al. Genotoxicity and Safety Pharmacology Studies of Indole Alkaloids Extract from Leaves of *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 10, n. 3, p. 119–129, 30 jun. 2020.