



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG. CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



**LETÍCIA DE ALMEIDA**

**Efeito Leishmanicida de Derivados Benzofenônicos e Estudo Comparativo do  
Potencial de Inibição Enzimática *in silico* e *in vitro*.**

Alfenas - MG  
2013



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG. CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



**Efeito Leishmanicida de Derivados Benzofenônicos e Estudo Comparativo do  
Potencial de Inibição Enzimática *in silico* e *in vitro*.**

Dissertação de Mestrado apresentado  
ao Programa de Pós Graduação em  
Ciências Farmacêuticas (PPGCF)  
como requisito parcial para obtenção  
do título de Mestre pela Universidade  
Federal de Alfenas. Orientador: Prof.  
Dr. Marcos José Marques

**LETÍCIA DE ALMEIDA**

Alfenas - MG

2013

**LETÍCIA DE ALMEIDA**

**Efeito Leishmanicida de Derivados Benzofenônicos e Estudo Comparativo do Potencial de Inibição Enzimática *in silico* e *in vitro*.**

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Prof. Dr. Marcos José Marques  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof<sup>a</sup>. Elaine Soares Coimbra  
Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Claudio Viegas Junior  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Alfenas - MG

2013

*Dedico este trabalho aos meus pais, Neusa e José Antonio,  
que sempre me apoiaram e me incentivaram.*

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;  
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.  
As facilidades nos impedem de caminhar.  
Mesmo as críticas nos auxiliam muito” (Chico Xavier)*

## **Agradecimentos**

*“A vida é fruto da decisão de cada momento. Talvez seja por isso, que a idéia de plantio seja tão reveladora sobre a arte de viver. Viver é plantar. É atitude de constante sementeira, de deixar cair na terra de nossa existência as mais diversas formas de sementes. Cada escolha, por menor que seja, é uma forma de semente que lançamos sobre o canteiro que somos. Um dia, tudo o que agora silenciosamente plantamos, ou deixamos plantar em nós, será planta que poderá ser vista de longe. O que não podemos perder de vista é que a vida não é real fora do cultivo.” A realização deste trabalho tornou-se possível graças às pessoas que cultivaram junto comigo este fruto que agora colho, pessoas a quem gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos:*

*À **Deus** por ser a força condutora de minha vida, por espalhar luz em mim e nos que me cercam, por me fortalecer nos momentos de angústia e nas dificuldades de modo que pudesse entender o sentido da vida e por ter traçado à mim caminhos que fizeram chegar até aqui;*

*Aos meus pais **Neusa e José Antonio** que sempre me dedicaram muito amor e me ajudaram a conquistar meus ideais apoiando-me;*

*Ao meu irmão **José Ricardo** pelo apoio tímido e discreto, e amor incondicional. Minha cunhada e sobrinhas por também me apoiarem;*

*Ao meu namorado **Rafael Marangoni** que apesar de geograficamente distante esteve sempre presente, apoiando-me e dando-me carinho além da compreensão;*

*Aos meus avós **Arinda e João** que entenderam minha ausência e ainda assim me cercaram com a ternura que os avós podem nos dar;*

*A todos meus **familiares** que diretamente ou indiretamente me apoiaram a continuar;*

*Ao **Prof. Dr. Marcos José Marques** pela preciosa orientação, pelos ensinamentos e conselhos dados, pela oportunidade e confiança depositada, por me entender mesmo quando as notícias não lhe agradaram e mais pela amizade conquistada;*

À **Karina Ferreira** minha fiel escudeira, amiga e quase irmã que encontrei nessa exper de trabalho, que sempre me ajudou nos ensaios biológicos e com quem aprendi muito;

Ao amigo de trabalho **Fábio Colombo** pelos ensinamentos e paciência;

Aos amigos do **Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos** da UNIFAL-MG, **Aline, Naira, Giulliano, Marcela, Diego, Julia, Carla, Carol, Ursuléia, Isael (agregado)**, além mais uma vez da **Karina e Fábio**, pelas ajudas constantes e amizades nos momentos de descontração;

A todos do **Laboratório de Parasitologia** da UNIFAL-MG por terem me acolhido com tanto carinho;

À **Nereyda Orsi e Ana** que cuidaram com zelo e carinho quando precisei de “colo”;

Ao grupo do **Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal** da UNIFAL-MG, em especial aos professores **Dr. Marcelo Henrique dos Santos e Dr. Claudio Viegas Jr.**, e às alunas **Claudia Mara Maciel Rezende e Francieli Ribeiro Pires**. Obrigada pela colaboração proporcionada e por cederem as moléculas que foram testadas;

Ao **Prof. Dr. Nelson José Freitas de Silveira** e sua aluna **Polianny Graziella Freitas** pela parceria e colaboração nos ensaios de docking molecular;

Ao **Laboratório de Biologia Celular de Parasitas** da Unifesp, em especial ao **Mario Augusto Izidoro** pelo auxílio e colaboração nos ensaios com proteases, além de ensinamentos nos momentos de conversa;

Aos amigos, **Rafael Geonmonond, Aline Pereira e Juliana** com os quais os dias de convívio colaboraram para o aprendizado, e à **Naama Negri** pela amizade e companheirismo até as altas horas de estudo;

À **Universidade Federal de Alfnas (UNIFAL-MG)** pela oportunidade;

*Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela colaboração na realização deste sonho;*

*A FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro e à UNIFAL-MG pela bolsa concedida;*

*A todos que direta ou indiretamente me apoiaram para a conclusão do mestrado, mais uma etapa de minha vida. Obrigada!*

## RESUMO

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e apresentam diversas manifestações clínicas, sendo consideradas uma doença tropical negligenciada. Encontram-se atualmente presentes em 88 países, afetando 12 milhões de pessoas, com dois milhões de novos casos por ano. O tratamento das leishmanioses é realizado até hoje pelos mesmos quimioterápicos usados na década de 40, apesar da persistência dos efeitos colaterais. Neste sentido, o objetivo do trabalho consistiu na avaliação da atividade de derivados de benzofenonas em *L. (L.) amazonensis*. Além de buscar entender possíveis mecanismos de ação, através da avaliação da dosagem de óxido nítrico e do potencial de inibição enzimática nos contextos *in silico* e *in vitro*. Foram testados três benzofenonas precursoras (CM-A, CM-B e CM-C) comercialmente disponíveis e nove derivados (LFQM-115, LFQM-116, LFQM-117, LFQM-118, LFQM-119, LFQM-120, LFQM-121, LFQM-122 e LFQM-123). Inicialmente os testes foram realizados em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, apesar de todos os derivados serem mais eficazes que seus precursores, os melhores resultados foram exibidos por LFQM-115, LFQM-118 e LFQM-123 ( $IC_{50-PRO} = 4,90; 5,05$  e  $5,94 \mu\text{g/mL}$ ; respectivamente). A toxicidade a macrófagos peritoniais murinos foi também avaliada, e constatou-se que os derivados LFQM-117, LFQM-120, LFQM-121, LFQM-122 e LFQM-123 foram os menos citotóxicos ( $CC_{50} = 140,06; 87,10; 116,20$  e  $>160,00 \mu\text{g/mL}$ ; respectivamente). A avaliação de atividade em formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* procedeu-se apenas com os derivados, sendo LFQM-120 o mais efetivo em formas intracelulares. O QlogP dos derivados de benzofenonas pode ser correlacionado com a atividade antipromastigota, bem como com a anti-amastigota. A partir de então, os derivados que mostraram melhor perfil de atividade em ambas as formas do parasito e em macrófagos murinos foram selecionados (LFQM-116, LFQM-117, LFQM-119, LFQM-120 e LFQM-121) para os demais ensaios. Foi realizada a dosagem da produção de óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Neste verificou-se que os derivados benzofenônicos LFQM-119 e LFQM-120 estimularam a produção de NO, porém apenas o derivado LFQM-120 induziram uma produção de NO equivalente ao produzido por LPS. Algumas enzimas importantes para tripanossomatídeos (cruzaína, oligopeptidase B, ornitina descarboxilase e tripanotiona redutase) e representantes de importantes famílias de enzimas (papaína e tripsina) foram usadas na análise por *docking* molecular. Algumas destas foram também utilizadas para a avaliação do potencial de inibição enzimática experimental (papaína, cruzaína, tripsina e oligopeptidase B), tendo o derivado LFQM-116 exibido valores de  $IC_{50} = 7,54; 8,44; 8,59$  e  $14,25 \mu\text{g/mL}$ ; respectivamente. Adicionalmente, é possível verificar a ação multi-alvo do derivado LFQM-120. Portanto, este trabalho mostrou a ação de derivados de benzofenonas em ambas as formas de *L. (L.) amazonensis*, descrevendo ainda o ganho na atividade biológica com as modificações estruturais feitas em seus precursores. Além de ajudar a entender possíveis mecanismos de ação de tais compostos e ainda possibilitar a seleção dos compostos mais efetivos *in vitro*, os quais poderão então ser utilizados em futuros testes *in vivo*.

**Palavras-chave:** *Leishmania*, atividade leishmanicida, benzofenonas, *docking* molecular, enzimas.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are caused by protozoa of the genus *Leishmania* and present diverse clinical manifestations being considered a neglected tropical disease. Are currently present in 88 countries affecting 12 million people with two million new cases per year. Treatment of leishmaniasis is held today by the same chemotherapy used in the 40s, despite the persistence of side effects. In this sense, the goal of the study was to evaluate the activity of benzophenone derivatives in *L. (L.) amazonensis*. Besides seeking to understand possible action mechanisms by evaluating the measurement of nitric oxide and the potential of enzyme inhibition in the contexts *in silico* and *in vitro*. Were tested three benzophenone precursors (CM-A, CM-B and CM-C) commercially available and nine derivatives (LFQM-115, LFQM-116, LFQM-117, LFQM-118, LFQM-119, LFQM-120-LFQM 121, LFQM-122 and LFQM-123). Initially tests were performed in promastigotes of *L. (L.) amazonensis*, although all derivatives being more effective than their precursors, the best results were exhibited by LFQM-115, LFQM-118 and LFQM-123 ( $IC_{50-PRO} = 4.90, 5.05$  and  $5.94 \mu\text{g/mL}$ , respectively). The toxicity to murine peritoneal macrophages was also evaluated, and it was found that derivatives LFQM-117, LFQM-120, LFQM-121, LFQM-122 and LFQM-123 were less cytotoxic ( $CC_{50} = 140.06, 87.10, 116.20$  and  $> 160.00 \mu\text{g/mL}$ , respectively). The assessment of activity in amastigotes of *L. (L.) amazonensis* proceeded only with derivatives, being LFQM-120 the most effective in intracellular forms. The QlogP of benzophenone derivatives can be correlated with antipromastigote activity, as well as anti-amastigote one. Since, derivatives that showed better activity profile in both forms of the parasite and in murine macrophages were selected (LFQM-116, LFQM-117, LFQM-119, LFQM -120 and LFQM-121) for the remaining tests. Was performed the dosage of nitric oxide (NO) in the culture supernatants of murine peritoneal macrophages infected with *L. (L.) amazonensis*. In this, it has been found that benzophenone derivatives LFQM-119 and LFQM-120 stimulated NO production, but only the derivative LFQM-120 induced a NO production equivalent to that produced by LPS. Some important enzymes in trypanosomatids (cruzain, oligopeptidase B, ornithine decarboxylase and trypanothione reductase) and representatives of major families of enzymes (papain and trypsin) were used in the analysis by molecular docking. Some of these were also used to assess the potential for experimental enzyme inhibition assay (papain, cruzain, trypsin and oligopeptidase B), the results exhibited by LFQM-116 were  $IC_{50} = 7.54, 8.44, 8.59$  and  $14.25 \mu\text{g/ml}$ , respectively. Additionally, it's possible to check the multi-target action of the derivative LFQM-120. Therefore, this work shows the action of benzophenone derivatives in both forms of *L. (L.) amazonensis*, also describing the gain in biological activity with structural changes made to their precursors. Besides helping to understand possible mechanisms of action of these compounds and also allow the selection of the most effective compounds *in vitro*, which may then be used in future *in vivo* tests.

**Keywords:** *Leishmania*, leishmanicidal activity, benzophenones, molecular docking, enzymes.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre manifestação clínica causada por espécies de <i>Leishmania</i> e sua distribuição geográfica destacando o subgênero pertencente.....	27
Tabela 2. Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses. ....	38
Tabela 3. Alvos enzimáticos potenciais para desenvolvimento de fármacos para leishmanioses.....	42
Tabela 4. Cisteíno proteases detectadas em <i>T. cruzi</i> de acordo com Projeto Genoma e banco de dados MEROPS. ....	45
Tabela 5. Serino proteases detectadas em <i>T. cruzi</i> de acordo com Projeto Genoma e banco de dados MEROPS. ....	50
Tabela 6. Código PDB das enzimas com suas respectivas resoluções e pontos de grid. ....	68
Tabela 7. Estrutura química das benzofenonas precursoras e seus derivados LFQM e atividade antipromastigota (IC <sub>50-PRO</sub> ).....	73
Tabela 8. Estrutura química das benzofenonas precursoras e seus derivados LFQM e atividade citotóxica (CC <sub>50</sub> ) a macrófagos peritoneais murinos. ....	74
Tabela 9. Estrutura química dos derivados LFQM e atividade antiamastigota (IC <sub>50-AMA</sub> ).....	76
Tabela 10. Atividade citotóxica (CC <sub>50</sub> ), atividade antiamastigota (IC <sub>50-AMA</sub> ) e fator de segurança (FS) dos derivados LFQM e Anfotericina B. ....	78
Tabela 11. Valores de IC <sub>50-PRO</sub> , e IC <sub>50-AMA</sub> correlacionados com logP calculado (QlogP) obtidos pelo software QikProp para os derivados LFQM. ....	79
Tabela 12. Resultados das interações hidrogênio entre papaína e derivados LFQM, obtidos com o docking molecular utilizando-se o AutoDock Vina.....	84
Tabela 13. Resultados das interações hidrogênio entre cruzaína e derivados LFQM, obtidos com o docking molecular utilizando-se o AutoDock Vina.....	85
Tabela 14. Resultados das interações hidrogênio entre tripsina e derivados LFQM, obtidos com o docking molecular utilizando-se o AutoDock Vina.....	86
Tabela 15. Resultados das interações hidrogênio entre oligopeptidase B e derivados LFQM, obtidos com o docking molecular utilizando-se o AutoDock Vina.....	88
Tabela 16. Resultados das interações hidrogênio entre ornitina descarboxilase e derivados LFQM, obtidos com o docking molecular utilizando-se o AutoDock Vina. ....	90
Tabela 17. Resultados das interações hidrogênio entre tripanotiona redutase e derivados LFQM, obtidos com o docking molecular utilizando-se o AutoDock Vina. ....	91

Tabela 18. Valores de IC <sub>50</sub> (µg/mL) para enzimas da família de cisteíno e serino proteases.....	93
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial de leishmaniose cutânea (a) e leishmaniose visceral (b) em 2009.....	23
Figura 2. Fotomicrografia das formas de <i>Leishmania</i> . .....	24
Figura 3. Ciclo da vida de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> . .....	26
Figura 4. Manifestações clínicas da leishmaniose. Em (A) leishmaniose cutânea difusa, (B) leishmaniose cutânea, (C) leishmaniose mucocutânea, (D) leishmaniose visceral e (E) leishmaniose dermal pós-cala-azar. ....	28
Figura 5. Representação esquemática da via de ativação de macrófagos e resultado da infecção. ....	33
Figura 6. Estrutura química de alguns fármacos leishmanicidas. (A) Paramomicina. (B) Estibogluconato de sódio. (C) Anfotericina B. (D) Miltefosina. ....	37
Figura 7. Clãs e famílias de proteases de <i>L. (L.) major</i> . A nomenclatura é baseada no banco de dados MEROPS. ....	43
Figura 8. Transporte, biossíntese, interconversão e utilização das poliaminas em <i>Leishmania</i> e em células do hospedeiro humano. ....	52
Figura 9. Via L-Arg e determinação do resultado da infecção. ....	54
Figura 10. Número de citações de alguns softwares de <i>docking</i> mais comuns analisados do <i>Web of Science</i> (2005). ....	59
Figura 11. Representação das benzofenonas de partida utilizadas nas reações de alquilação. ....	62
Figura 12. Representação esquemática das reações de alquilação propostas a partir de CM-A, CM-B e CM-C para obtenção dos derivados LFQM-115, LFQM-116, LFQM-117, LFQM-118, LFQM-119, LFQM-120, LFQM-121, LFQM-122 e LFQM-123. ....	63
Figura 13. Esquema geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA, mostrando o ponto de clivagem pelas proteases. ....	70
Figura 14. Macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> tratados com derivados na concentração máxima usada (40 µg/mL). ....	77
Figura 15. Correlação entre logP calculado (QLogP) e atividade antipromastigota (logIC <sub>50-PRO</sub> ). ....	80
Figura 16. Correlação entre logP calculado (QLogP) e atividade anti-amastigota (logIC <sub>50-AMA</sub> ). ....	81

Figura 17. Dosagem de NO avaliada pela concentração de nitritos ( $\mu\text{g/mL}$ ) nos sobrenadantes de culturas de células tratadas com derivados LFQM à 10 $\mu\text{g/mL}$ . Como contole positivo foi utilizado LPS à 10 $\mu\text{g/mL}$ .....	82
Figura 18. Interação papaína e LFQM-117. ....	84
Figura 19. Interação cruzaína e LFQM-116.....	85
Figura 20. Interação tripsina e LFQM-116.....	87
Figura 21. Interação tripsina e LFQM-117.....	87
Figura 22. Interação oligopeptidase B e LFQM-117.....	89
Figura 23. Interação ornitina descarboxilase e LFQM-117.....	92
Figura 24. Interação tripanotiona redutase e LFQM-117.....	92
Figura 25. Representação em porcentagem do estímulo de produção de óxido nítrico (NO) (barras azuis) versus representação em porcentagem do potencial de inibição enzimática médio considerando todas as enzimas ensaiadas (barras vermelhas) dos derivados LFQM.....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADME.....	absorção, distribuição, metabolismo e excreção
AdoMet.....	S-adenosilmetionina
AdoMetDC.....	S-adenosilmetionina descarboxilase
APC.....	Célula apresentadora de antígenos
ARG.....	Arginase
ATP.....	Adenosina trifosfato
CC <sub>50</sub> .....	Concentração citotóxica para 50% das células
Células NK.....	Células <i>Natural Killer</i>
CG-EM.....	Espectroscopia de massa-Cromatografia gasosa
CM-A.....	2,4-diidroxi-benzofenona
CM-B.....	4-hidroxi-benzofenona
CM-C.....	4,4'-diidroxi-benzofenona
CP.....	Cisteíno protease
dAdoMet.....	S-adenosilmetionina descarboxilada
DFMO.....	D,L,α-difluorometil ornitina
DMF.....	Dimetilformamida
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
DRX.....	Difração de Raios X
DTNs.....	Doenças Tropicais Negligenciadas
DTT.....	Ditiotreitól
EM.....	Espectrometria de Massas
FAD.....	Flavina Adenina Dinucleotídeo
fase log.....	Fase logarítmica
FS.....	Fator de Segurança
Glu.....	Glutamina
GR.....	Glutathione Redutase
GSH.....	Glutathione
IC <sub>50</sub> -PRO.....	Concentração Inibitória de 50% do crescimento celular de formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>
IC <sub>50</sub> -AMA.....	Concentração Inibitória de 50% do crescimento celular de formas amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>
IC <sub>50</sub> -PAP.....	Concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática da papaína
IC <sub>50</sub> -CRUZ.....	Concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática da cruzaína
IC <sub>50</sub> -TRIP.....	Concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática da tripsina
IC <sub>50</sub> -OPB.....	Concentração de inibidor necessária para inibir 50% da atividade enzimática da oligopeptidase B
IFN-γ.....	Interferon γ
Ig.....	Imunoglobulina
IgE.....	Imunoglobulina E
IgG.....	Imunoglobulina G

IL-10.....Interleucina 10  
 IL-12.....Interleucina 12  
 IL-13.....Interleucina 13  
 IL-2.....Interleucina 2  
 IL-4.....Interleucina 4  
 IL-6.....Interleucina 6  
 iNOS.....Óxido Nítrico Sintase induzível  
 IV.....Infravermelho  
 L-Arg.....L-arginina  
 LC.....Leishmaniose Cutânea  
 LCD.....Leishmaniose Cutânea Difusa  
 LDPC.....Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar  
 LFQM.....Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal  
 LFQM-115.....2-hidroxi-4-metoxi-benzofenona  
 LFQM-116.....2-hidroxi-4-butoxi-benzofenona  
 LFQM-117.....2-hidroxi-4-preniloxi-benzofenona  
 LFQM-118.....4-metoxi-benzofenona  
 LFQM-119.....4-butoxi-benzofenona  
 LFQM-120.....4-preniloxi-benzofenona  
 LFQM-121.....4,4'-dimetoxi-benzofenona  
 LFQM-122.....4,4'-dibutoxi-benzofenona  
 LFQM-123.....4,4'-dipreniloxi-benzofenona  
 LM.....Leishmaniose Mucocutânea  
 LogP.....Lipofilicidade Relativa  
 L-Orn.....L-ornitina  
 LPG.....Lipofosfoglicanos  
 LPS.....Lipopolissacarídeo  
 LV.....Leishmaniose Visceral  
 MAPK.....Proteína Quinase Mitógeno Ativada  
 MEROPS.....Banco de dados de peptidases  
 MHC II.....Complexo de Histocompatibilidade II  
 mRNA.....RNA mensageiro  
 MTT.....3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazólio  
 MØ ..... Macrófago  
 NADPH.....Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida Oxidase  
 NF-κB.....Fator Nuclear kappa B  
 nm.....nanômetros  
 NO.....Óxido Nítrico  
 NOS2.....Óxido Nítrico Sintase 2  
 ODC.....Ornitina Descarboxilase  
 OpB.....Oligopeptidase B  
 p.f. ....Ponto de Fusão  
 PDB.....*Protein Data Bank* – Banco de Dados de Proteínas  
 PKC.....Proteína Quinase C  
 QLogP.....Lipofilicidade Relativa Calculada pelo QuikProp  
 RMN de <sup>1</sup>H.....Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de <sup>13</sup> C.....	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RNOS.....	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS.....	Espécies Reativas de Oxigênio
Sb <sup>III</sup> .....	Antimonial Trivalente
Sb <sup>V</sup> .....	Antimonial Pentavalente
Ser.....	Serina
Spd.....	Espermidina
SpdS.....	Espermidina Sintase
SPs.....	Serino Proteases
T[S] <sub>2</sub> .....	Tripanotiona dissulfeto
T[SH] <sub>2</sub> .....	Tripanotiona ditiol reduzida
TGF-β.....	Fator de Transformação do Crescimento β
TNF-α.....	Fator de Necrose Tumoral α
TryR.....	Tripanotiona Redutase
TryS.....	Tripanotiona Sintase
UV.....	Ultravioleta
μg/mL.....	Concentração em microgramas por mililitros
μL.....	microlitros
μM.....	Concentração em micromolar
1CVZ.....	Código de identificação no PDB da papaína
1ME3.....	Código de identificação no PDB da cruzaína
1S5S.....	Código de identificação no PDB da tripsina
2XE4.....	Código de identificação no PDB da oligopeptidase B
1F3T.....	Código de identificação no PDB da ornitina descarboxilase
2JK6.....	Código de identificação no PDB da tripanotiona redutase
Δ <i>odc</i> .....	Camundongos com enzima ornitina descarboxilase ausente
ΔG.....	Variação de energia livre de Gibbs

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 Leishmanioses e <i>Leishmania</i> .....	21
2.2 Resposta Imune à Doença .....	31
2.3 Tratamentos .....	34
2.3.1 Antimoniais .....	34
2.3.2 Outros Tratamentos.....	35
2.4 Benzofenonas .....	39
2.5 Proteases .....	39
2.5.1 Cisteíno proteases (CPs) .....	42
2.5.1.1 Papaína .....	44
2.5.1.2 Cisteíno proteases de Tripanossomatídeos .....	44
2.5.2 Serino proteases (SPs) .....	48
2.5.2.1 Tripsina.....	48
2.5.2.2 Serino proteases de Tripanossomatídeos .....	49
2.5.3 Enzimas da biossíntese das poliaminas.....	51
2.5.3.1 Ornitina descarboxilase .....	54
2.5.3.2 Tripanotiona redutase.....	55
2.6 <i>Docking</i> Molecular .....	56
3 OBJETIVOS .....	60
3.1 Objetivos Gerais.....	60
3.2 Objetivos Específicos .....	60
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
4.1 Substâncias Testadas .....	62
4.2 Parasitos .....	63
4.3 Células de Mamíferos e Animais de Experimentação .....	64
4.4 Avaliação da Atividade Antipromastigota das Benzofenonas.....	64
4.5 Avaliação da Citotoxicidade a Macrófagos Peritoneais Murinos das Benzofenonas .....	65
4.6 Avaliação da Atividade Antiamastigota dos Derivados Benzofenônicos .....	66
4.7 Determinação do Fator de Segurança (FS).....	66
4.8 Avaliação da Lipofilicidade Relativa Octanol/Água (QlogP) .....	67
4.9 Dosagem de Óxido Nítrico .....	67
4.10 <i>Docking</i> Molecular .....	68

4.11 Avaliação da Inibição Enzimática de Proteases .....	69
4.12 Análise Estatística .....	71
5 RESULTADOS .....	72
5.1 Atividade Antipromastigota .....	72
5.2 Atividade Citotóxica .....	72
5.3 Atividade Antiamastigota .....	75
5.4 Determinação do Fator de Segurança (FS).....	78
5.5 Avaliação da Lipofilicidade Relativa Octanol/Água (QlogP) .....	79
5.6 Dosagem de Óxido Nítrico em Sobrenadantes de Culturas de Macrófagos Peritoneais Murinos.....	81
5.7 <i>Docking</i> Molecular .....	82
5.8 Avaliação da Inibição Enzimática .....	93
6 DISCUSSÃO .....	95
7 CONCLUSÕES .....	108
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	110
ANEXO 1 – Aprovação Comitê de Ética em Uso de Animais.....	123
ANEXO 2 – Artigo de Autoria Própria Submetido.....	124
ANEXO 3 – Artigo de Co-Autoria Submetido .....	147
ANEXO 4 – Artigo em Preparo para Submissão .....	156

## 1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um grupo de 17 doenças infecciosas que afetam mais de um bilhão de pessoas por todo o mundo (OMS), dentre as quais incluem dengue, doença do sono, doença de Chagas e leishmanioses (BALAÑA-FOUCE, 2012). Dentre as DTNs, as leishmanioses ainda permanecem como um dos maiores problemas de saúde pública no Mundo, inclusive no Brasil (WHO, 2010).

As várias espécies de *Leishmania* são conhecidas como os agentes causadores das leishmanioses em humanos. Estas ainda apresentam animais silvestres e domésticos como reservatórios da doença e o homem como hospedeiro. Além disso, a transmissão ao seu hospedeiro mamífero é feita através da picada da fêmea do mosquito infectado do gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus*. A maioria dos reservatórios são bem adaptados e desenvolvem infecções subclínicas. Uma importante exceção são os cães, os quais podem desenvolver uma doença generalizada e fatal (ASSCHE, 2011).

A doença consiste de quatro principais síndromes clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LM), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose visceral (LV) (TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINK, 2011). Este largo espectro de infecções em humanos causadas pelo protozoário *Leishmania* pode variar de uma úlcera crônica na pele, a doença erosiva da mucosa, destruição facial severa e risco de infecção sistêmica. Assim, pode-se dizer que a doença depende não somente da espécie do parasito envolvida na infecção, mas também da resposta imune do hospedeiro. Por exemplo, os linfócitos T são as células predominantes nas lesões de leishmaniose cutânea, enquanto que a leishmaniose visceral e a forma cutânea difusa estão associadas com resposta inadequada de células T contra antígenos do parasito. Sendo assim, pode-se verificar que a resposta imune do hospedeiro pode também contribuir nas manifestações clínicas da doença (HERNÁNDEZ-RUIZ; BECKER, 2006; CARVALHO, 2007).

Os antimoniais pentavalentes têm sido o fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses por mais de 70 anos. Estes compostos são altamente tóxicos, o tratamento é longo, e casos de resistência a estes têm sido relatados,

além de exibir efeitos colaterais desagradáveis e persistentes. Outros fármacos vêm sendo empregados em terapias de segunda escolha, os quais compreendem Anfotericina B e suas formulações lipossomais, miltefosina, paramomicina e a pentamidina (ALAVI-NAINI; FAZAELI; O'DEMPSEY, 2012), porém todos com alta toxicidade.

Vários autores têm descrito como uma das alternativas para novas terapias o estudo das proteases de protozoários, visto que, estas estão envolvidas no metabolismo celular ou na interação com o hospedeiro e comportam-se nesse caso como verdadeiros fatores de virulência. Um inibidor seletivo de proteases vitais para o parasito é uma das mais promissoras estratégias de desenvolvimento de novas terapias para o combate ao *Plasmodium*, *Leishmania* e *Trypanosoma* (ZUCCA; SAVOIA, 2011). Sendo assim, a busca por novos compostos que ajam como inibidores de enzimas do parasito podem ser atrativos ao desenvolvimento de novos fármacos com menos ou nenhum efeito colateral desagradável aos pacientes.

Dentre os compostos estudados, as benzofenonas têm apresentado, além de sua atividade leishmanicida, um potencial na inibição enzimática do parasito (LUQUE-ORTEGA, 2010). O *docking* molecular é uma estratégia que pode ser utilizada para prever a interação entre compostos (ligante) e proteases (biomacromolécula) de parasitos, por exemplo. Tal estratégia não exclui ou invalida ensaios enzimáticos experimentais, ao contrário pode ser realizado um estudo comparativo entre tais procedimentos.

Portanto, este trabalho visou avaliar novos derivados de benzofenonas quanto ao seu potencial leishmanicida, em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, além da sua atividade citotóxica a macrófagos peritoneais murinos. Analisar a quantidade de óxido de nítrico produzido por células em contato com os compostos em estudo. Além de avaliar a interação entre tais derivados e proteases (*docking* molecular), bem como realizar os ensaios experimentais de inibição enzimática.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Leishmanioses e *Leishmania*

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são consequência do subdesenvolvimento social. Estas são endêmicas em várias regiões geográficas importantes, afetando milhões de pessoas e determinando altos índices de morbidade e mortalidade (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). A organização internacional Médicos sem Fronteiras tem relatado através de seus projetos espalhados por diversos países, a falta de tratamento para as DTNs. Tal problema pode ser dimensionado em números, uma vez que, nos últimos 25 anos somente 1% dos fármacos desenvolvidos foi voltado para o tratamento de alguma doença negligenciada (DIAS, 2009). No Brasil, as DTNs com alto nível de prevalência e ocorrência são malária, doença de Chagas, leishmanioses, esquistossomose, dengue e filariose linfática (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

De acordo com classificação das DTNs pela Organização Mundial de Saúde, baseando-se na emergência, controle e disponibilidade de fármacos, as leishmanioses foram agrupadas entre as doenças que não estão sob controle e são emergentes. Mudanças ambientais tais como desmatamento, urbanização e migração de pessoas para regiões endêmicas, têm sido apontadas como prejudiciais ao controle das leishmanioses de maneira que a doença permanece se espalhando. (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

Este complexo de doenças é considerado um dos maiores problemas mundiais de saúde pública (WHO, 2007). Estima-se que leishmanioses ocupem o segundo lugar em mortalidade e quarto lugar em morbidade entre as doenças tropicais (WHO, 2010). Apesar das epidemias rurais a doença está aparentemente surgindo em áreas urbanas. A expansão da doença e o aumento acentuado em prevalência devem-se à migração em larga escala de pessoas das áreas rurais para os subúrbios das grandes cidades, resultando em assentamentos densamente povoados onde o parasito encontra um grande número de hospedeiros susceptíveis (KEDZIERSKI, 2011).

Willian Leishman e Charles Donovan foram os primeiros a demonstrar separadamente, mas simultaneamente, em 1903 o protozoário parasito no baço de pacientes sofrendo de uma doença descrita como parecida com malária, a qual ficou conhecida como leishmaniose visceral. O agente causador da doença foi posteriormente denominado *Leishmania donovani* (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

Estimativas indicam que a doença possui uma prevalência de 12 milhões de pessoas infectadas atualmente no mundo e 1,6 milhões de novos casos anualmente, dos quais cerca de 500 000 são de leishmaniose visceral e 1,1 milhões de novos casos são de leishmaniose cutânea ou mucocutânea. Dentre os casos de leishmaniose visceral cerca de 90% ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão, enquanto que, 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita, Sudão e Síria. Por outro lado, estima-se que a maioria (90%) dos casos da forma mucocutânea ocorram prevalentemente no Brasil, Peru e Bolívia (WHO, 2010; ASSCHE, 2011; KEDZIERSKI, 2011). Apesar das leishmanioses serem principalmente encontradas no sudeste da Ásia, no leste de África e Brasil, infecções humanas têm ocorrido em 16 países da Europa, incluindo França, Itália, Grécia, Espanha e Portugal (COLOTTI; ILARI, 2011) (Figura 1).

As leishmanioses estão difundidas em 22 países no Novo Mundo e em 66 países no Velho Mundo, e são estimadas por causarem 70 mil mortes por ano, uma taxa que é ultrapassada somente pela malária dentre as doenças parasitárias (COLOTTI; ILARI, 2011). Dos 1,6 milhões de casos estimados apenas cerca de 600 mil são relatados, uma vez que a notificação é compulsória em apenas 33 dos 88 países afetados pela doença. (WHO, 2010; ASSCHE, 2011).

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por diferentes espécies de protozoários parasitos, os quais são unicelulares nucleados e pertencentes ao Reino Protista, Sub-Reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, uma vez que estes organismos locomovem-se por meio de flagelos ou cílios. Além disso, pertencem à classe Zoomastigophora, a qual compreende seres incapazes de produzir seu próprio alimento (heterotróficos) (REY, 2001). Pertencem à ordem Kinetoplastida, apresentando uma organela típica denominada cinetoplasto; família

Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* compreendendo várias espécies distintas (REY, 2001; KEDZIERSKI, 2011).

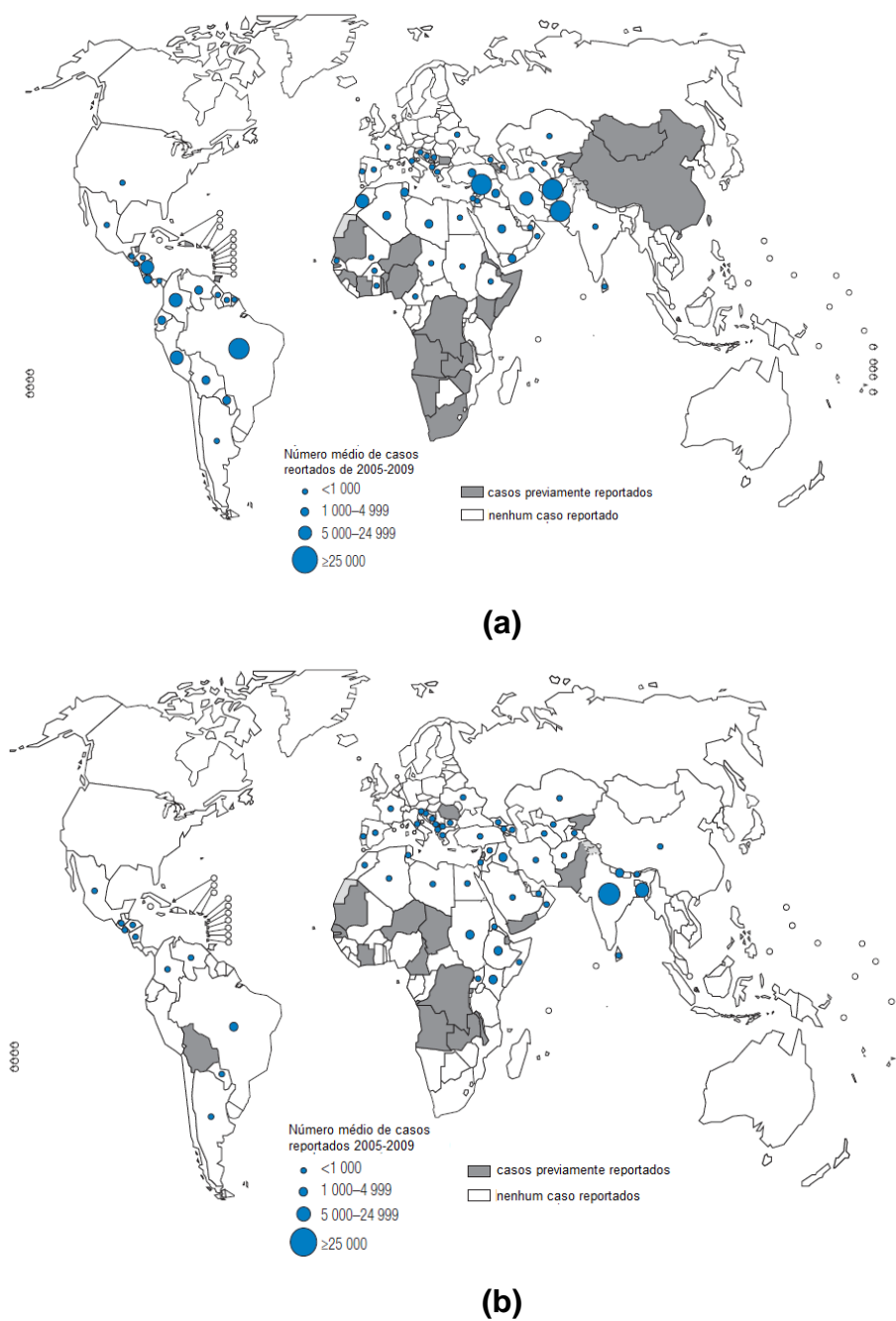


Figura 1. Distribuição mundial de leishmaniose cutânea (a) e leishmaniose visceral (b) em 2009.

Fonte: Adaptado de WHO, 2010.

Estes parasitos apresentam-se durante seu ciclo evolutivo sob duas formas, uma extracelular e outra intracelular. A forma móvel de *Leishmania*, flagelada e extracelular, é chamada promastigotas (Figura 2 a). Estas são encontradas dentro do inseto e desenvolvem-se através de vários e distintos estágios morfológicos de diferenciação para, finalmente, tornarem-se promastigotas metacíclicas infecciosas, que são transmitidas durante a picada do inseto (SILVA-LÓPEZ, 2010). A posição do cinetoplasto é outra característica marcante das promastigotas, estando localizado anteriormente à porção livre do flagelo, que tem o mesmo comprimento do corpo. As formas amastigotas (Figura 2 b) não possuem um flagelo exteriorizado e são parasitos intracelulares obrigatórios, preferencialmente do sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros vertebrados, onde se dividem por divisão binária simples. Em microscopia óptica, as amastigotas são corpos ovais ou arredondados e seu cinetoplasto localiza-se adjacente ao núcleo e ao flagelo, onde é encontrado o DNA mitocondrial (KAYE; SCOTT, 2011; MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011).

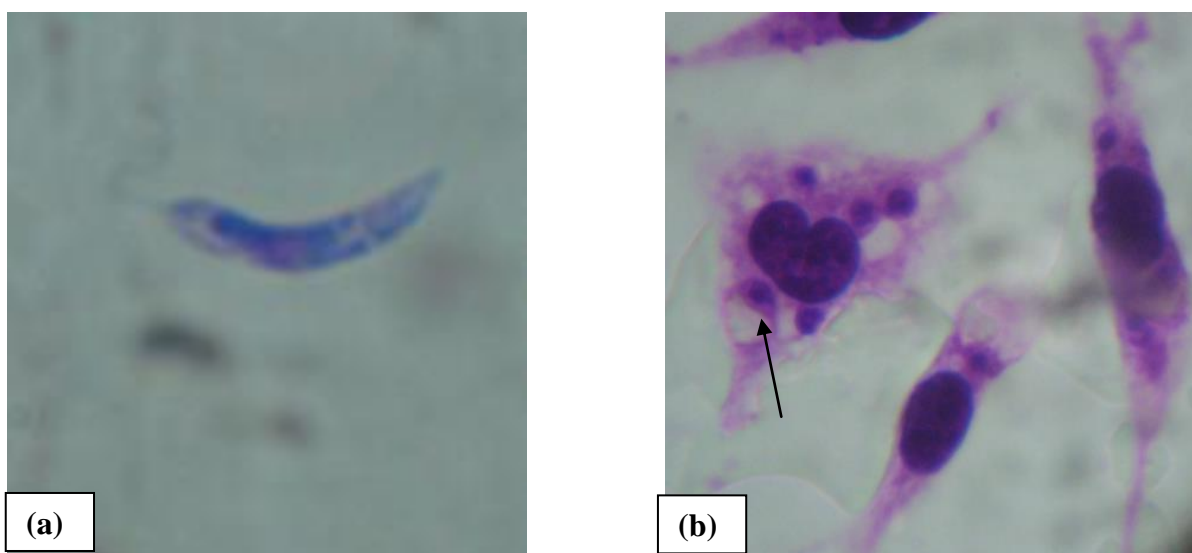


Figura 2. Fotomicrografia das formas de *Leishmania*. Em **(a)** promastigota de *L. (L.) amazonensis* e **(b)** macrófago infectado com a forma amastigota de *L. (L.) amazonensis*. Aumento 100x.

Fonte: Do autor.

Os vetores da doença são insetos do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo, os quais representam o elo entre os reservatórios (animais silvestres como roedores, animais domésticos como cães) e o hospedeiro humano (ROCHA, 2005; COLOTTI; ILARI, 2011). Muitos dos reservatórios da doença são bem adaptados e desenvolvem infecções moderadas ou subclínicas, que podem persistir por anos. Uma importante exceção são os cães, os quais podem desenvolver uma doença generalizada e fatal (ASSCHE, 2011).

O hospedeiro invertebrado torna-se infectado quando a fêmea do vetor pica um vertebrado infectado durante o repasto sanguíneo e, juntamente com o sangue, ingere macrófagos parasitados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SILVA-LÓPEZ, 2010). Durante o trajeto pelo trato digestivo, os macrófagos se rompem liberando as amastigotas que se transformam em promastigotas, as quais se dividem intensamente e transformam-se em promastigotas metacíclicas sem a capacidade de divisão binária, migrando então para a probóscida do inseto. A partir de então, o inseto quando pica, regurgita os parasitos para o interior da pele do hospedeiro vertebrado, inoculando-os no local da picada, ocorrendo assim a transmissão (KEDZIERSKI, 2011). Na saliva do inseto há uma gama de moléculas farmacologicamente ativas que podem modular a resposta imune e inflamatória do hospedeiro, facilitando o estabelecimento da infecção (BETHONY, 2011). Desse modo, as formas infectantes do parasito, as promastigotas, interagem com as células do sistema fagocítico mononuclear, e sob a forma amastigota, passam a se multiplicar no interior de macrófagos. Depois da multiplicação, as amastigotas lisam as células do hospedeiro, reinfectam outros macrófagos e então retornam ao vetor invertebrado durante outro repasto sanguíneo (ROCHA, 2005; TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINCK, 2011) (Figura 3).

Desta forma a doença depende de uma interação complexa entre o patógeno protozoário, vetores artrópodes, influência ambiental na distribuição do vetor, reservatório animal da infecção e populações humanas susceptíveis (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011).

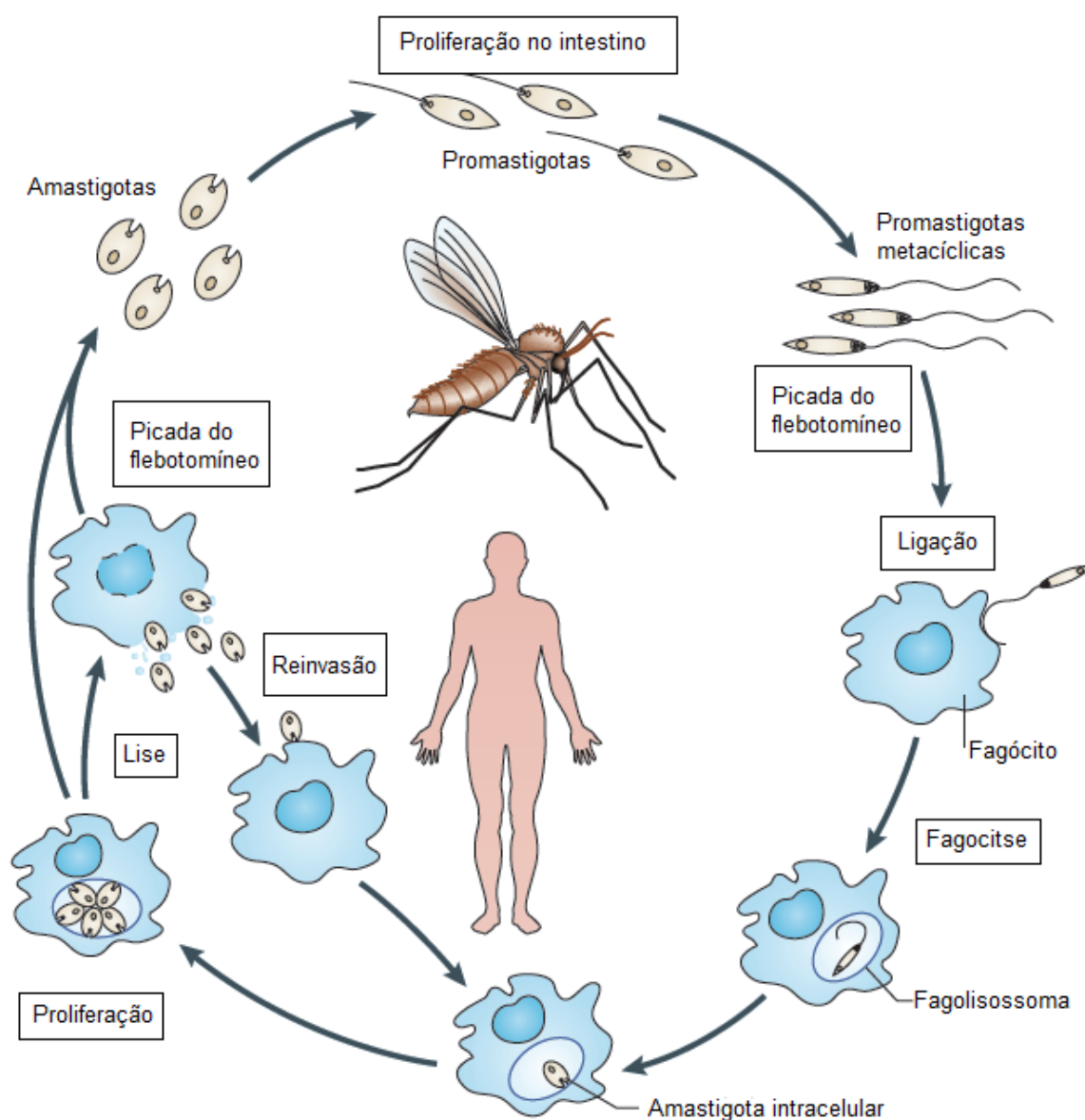


Figura 3. Ciclo da vida de parasitos do gênero *Leishmania*.  
 Fonte: Adaptado de KAYE; SCOTT, 2011.

O desenvolvimento diferenciado dos parasitos em seus hospedeiros invertebrados naturais foi a base para a divisão do gênero em dois grupos por Lainson e Shaw, sendo assim o subgênero *Viannia* e *Leishmania* (SILVA-LÓPEZ, 2010). Os dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia* foram separados de acordo com a habilidade de desenvolvimento do parasito no intestino anterior (*Supr pylaria*) e no intestino posterior (*Peri pylaria*) do flebotomíneo, respectivamente (ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012). As espécies pertencentes ao subgênero

*Viannia* estão distribuídas apenas no Novo Mundo, enquanto que as espécies do subgênero *Leishmania* distribuídas no Novo Mundo e Velho Mundo (SILVA-LÓPEZ, 2010) e além disso, podem ser correlacionadas com a síndrome clínica causada (Tabela 1).

Tabela 1. Relação entre manifestação clínica causada por espécies de *Leishmania* e sua distribuição geográfica destacando o subgênero pertencente.

Forma Clínica	Distribuição Geográfica	Subgênero	Espécies
Leishmaniose cutânea	Velho Mundo	<i>Leishmania</i>	<i>L. (L.) major</i>
	Novo Mundo		<i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) aethiopica</i> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) venezuelensis</i>
Leishmaniose mucocutânea	Novo Mundo	<i>Viannia</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
			<i>L. (V.) colombiensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i> <i>L. (V.) peruviana</i> <i>L. (V.) lainsoni</i> <i>L. (V.) naiffi</i> <i>L. (V.) shawi</i> <i>L. (V.) lindenbergi</i>
Leishmaniose visceral	Velho Mundo	<i>Leishmania</i>	<i>L. (L.) donovani</i>
	Novo Mundo		<i>L. (L.) infantum</i> <i>L. (L.) chagasi</i>

Fonte: Adaptado de FRÉZARD; DEMICHELI, 2010.

A *L. (L.) amazonensis* é membro do complexo *Leishmania mexicana* e agente etiológico de amplo espectro de leishmanioses nos países da América do Sul (SOONG, 2012). No Brasil, a infecção por *L. (L.) amazonensis* pode causar duas manifestações clínicas distintas de leishmaniose cutânea: uma forma cutânea mais localizada ou a forma difusa (FRANÇA-COSTA, 2012). Porém, relata-se que esta espécie possa causar um amplo espectro de leishmanioses, uma vez que foi isolada de pacientes com LC, LCD, LM e até mesmo LV (de SOUZA, 2011). Dentre as

espécies de protozoários do complexo *L. (L.) mexicana*, apenas *L. (L.) amazonensis* é capaz de formar grandes vacúolos parasitóforos, e estes imensos vacúolos servem como escudo, “diluído” os efeitos leishmanicidas do óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células infectadas (FRANÇA-COSTA, 2012).

As diferentes manifestações clínicas causadas pela infecção do protozoário do gênero *Leishmania* (Figura 4) incluem a leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose visceral e leishmaniose dérmica pós-calazar (SANTOS, 2009; LUQUE-ORTEGA, 2010).

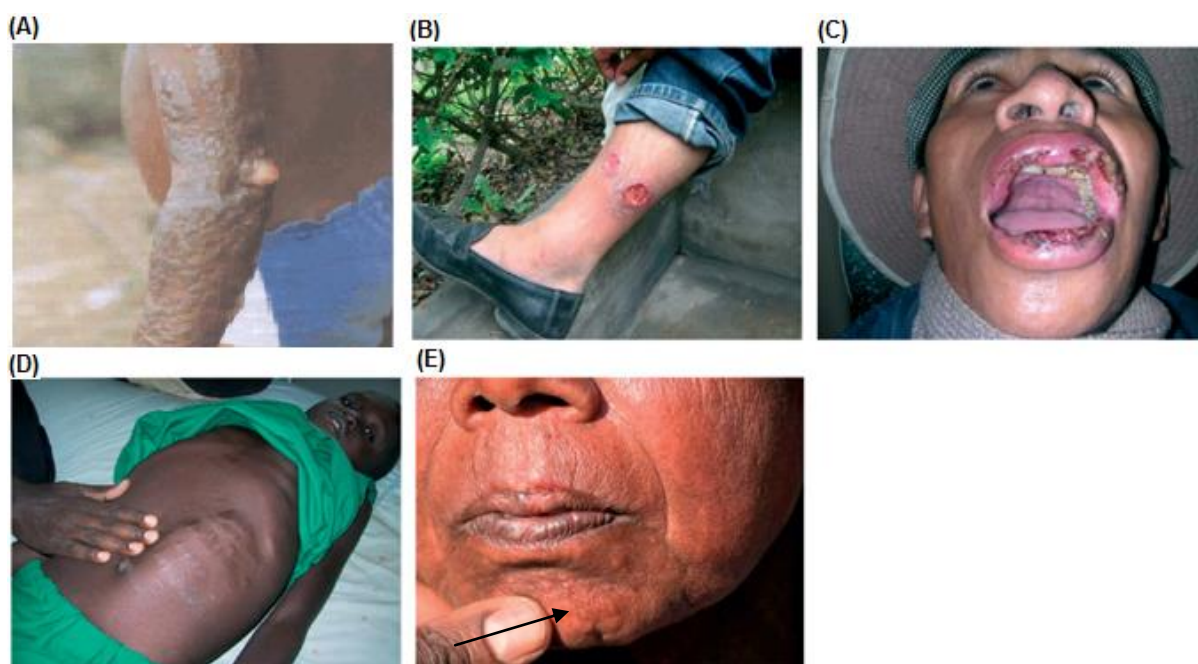


Figura 4. Manifestações clínicas da leishmaniose. Em (A) leishmaniose cutânea difusa, (B) leishmaniose cutânea, (C) leishmaniose mucocutânea, (D) leishmaniose visceral e (E) leishmaniose dérmica pós-calazar.

Fonte: (A) NEVES, 2004. (B) à (E) Adaptado de CHAPPUIS, 2007.

A forma cutânea da doença é responsável por mais de 50% dos novos casos de leishmanioses, sendo que, a maioria destes (90%) ocorre no Afeganistão, Oriente Médio e América do Sul (KEDZIERSKI, 2011). Na LC o parasito está confinado à pele, e após um período de incubação (de 1 a 12 semanas) uma pápula

indolor ou uma pústula desenvolve-se no sítio da picada do inseto. A pápula cresce e se transforma em uma úlcera com uma crosta aderente de exsudado seco (GONZÁLEZ, 2009).

As lesões de pele variam de 0,5 a 3 cm de diâmetro, podendo ser únicas ou múltiplas na pele, geralmente no rosto, braços e pernas (WHO, 2007). Elas são geralmente desfigurantes e não-fatais, sendo causadas principalmente por *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica* no Velho Mundo ou *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamanensis* e *L. (V.) guyanensis* no Novo Mundo (ASSCHE, 2011).

Na forma cutânea há uma forte resposta de células T, com citocinas do tipo Th1, como IFN- $\gamma$  e IL-12, e uma alta frequência de células B (REIS, 2006).

A forma cutânea difusa, geralmente, apresenta lesões nodulares persistentes, no corpo inteiro (WHO, 2007). A LC pode evoluir para LCD iniciando-se tipicamente como pápulas localizadas e não ulceradas, ocorrendo a disseminação de amastigotas e produção de nódulos cutâneos na face e extremidades (SILVA-LÓPEZ, 2010).

Indivíduos com leishmaniose cutânea difusa apresentam múltiplos nódulos e falham em produzir uma resposta imune mediada por células durante a infecção, sendo incapazes de controlar a multiplicação parasitária e a progressão da doença em consequência da falta da expressão de mRNA para IFN- $\gamma$  e da baixa expressão para IL-2. Apresentam ainda elevada produção de anticorpos específicos contra *Leishmania*. Esses pacientes não apresentam cura, são altamente resistentes à quimioterapia e exibem uma resposta do tipo Th2, com elevados níveis de IL-4 (REIS, 2006).

A leishmaniose mucocutânea é uma forma crônica de leishmaniose. Cerca de 90% dos casos de LM ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru. Espécies do parasito como, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamanensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* podem espalhar por membranas mucosas (GONZÁLEZ, 2009; ASSCHE, 2011). O desenvolvimento tardio de lesões metastáticas e destruição de membranas mucosas - especialmente nariz, boca e garganta – é o que caracteriza a leishmaniose mucocutânea. Estas lesões metastáticas podem causar danos graves e desfiguração (KEDZIERSKI, 2011). A leishmaniose mucocutânea é caracterizada

por lesões destrutivas das mucosas, principalmente boca e nariz, não ocorrendo cura espontânea (ASSCHE, 2011).

A LM está relacionada à uma resposta elevada por células T específicas, tanto Th1 como Th2, sendo direcionada para uma resposta do tipo Th1 que é mais forte quando comparada com lesões cutâneas localizadas. A resposta exacerbada do tipo Th1 está associada a uma crônica e severa destruição tecidual, em razão de uma forte resposta inflamatória, e à escassez de parasitos nas lesões. Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  são produzidas, além de IL-4. Essa resposta é fracamente regulada por IL-10 e TGF- $\beta$ , encontradas em níveis diminuídos, mostrando que uma resposta inadequada do tipo Th1, considerada protetora na maioria das formas dessa doença, pode levar a uma imunopatogênese exacerbada (REIS, 2006).

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é a forma mais severa e síndrome frequentemente fatal (KEDZIERSKI, 2011). Ela afeta aproximadamente 500 mil pessoas em todo mundo e apresenta uma taxa de mortalidade de 59 mil mortes/ano (TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINCK, 2011).

Esta infecção disseminada é causada pelas espécies do complexo *L. (L.) donovani*, os quais são parasitos intracelulares de macrófagos de órgãos linfóides tais como baço, linfonodos, medula óssea e fígado (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). No leste da África e Índia, LV é causada pelo complexo *L. (L.) donovani*; pela *L. (L.) infantum* no Europa, Norte da África e América Latina e por *L. (L.) chagasi* no Brasil (TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINCK, 2011). A doença humana é letal se não tratada no início, os primeiros sintomas das anormalidades clínico-patológicas incluem: mal-estar, anemia, caqueixa, hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia e supressão progressiva da resposta imune celular (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011).

Há dois tipos de LV, dependendo das características de transmissão. Uma delas é a forma zoonótica, com cães como reservatórios principais, a qual ocorre na bacia do Mediterrâneo, China, Oriente Médio e América do Sul. A forma antroponótica, com transmissão homem-homem sem o reservatório animal, é prevalente no leste da África, Bangladesh, Índia e Nepal (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

Lesões crônicas na pele podem surgir após o tratamento efetivo da LV, essas erupções crônicas caracterizam a conhecida leishmaniose dermal pós-calazar (LDPC) (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). A LDPC, a qual é considerada uma manifestação cutânea da LV, frequentemente aparece de 2 a 7 anos após o tratamento da forma visceral. Estudos sugerem que o tratamento com antimoniais e LDPC estejam intrinsecamente relacionados (CROFT, 2008). Este agravamento da doença é considerado como um sinal de reconstituição imune contra o parasito, com redescoberta da imunidade mediada por células. Ela inicia-se com máculas eritematosas e pápulas ao redor de áreas perinasais e frequentemente progride para placas e nódulos, subseqüentemente espalhando-se para ombros, tronco e extremidades (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

## **2.2 Resposta Imune à Doença**

Após sua entrada no hospedeiro mamífero, as promastigotas metacíclicas de *Leishmania* precisam estabelecer “residência” em macrófagos sem desencadear suas defesas microbicidas. Alguns autores sugerem que neutrófilos possam agir como “cavalos de tróia” para ajudar promastigotas a alcançarem este objetivo (SOONG, 2012). Estudos comprovam que promastigotas foram rapidamente fagocitadas por tais células, as quais começam a secretar quimiocinas tipo IL-8 essenciais para a migração de mais neutrófilos para o sítio de infecção. Neutrófilos infectados são induzidos a sofrer apoptose, e então expressam em sua superfície fosfatidilserina e tornam-se o alvo fagocítico de macrófagos (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; KAYE; SCOTT, 2011). Como neutrófilos apoptóticos são fagocitados através de vias que não desencadeiam respostas de defesa de macrófagos, suas cargas de promastigotas são, portanto, eficientemente e seguramente lançadas em fagossomos de macrófagos (KAYE; SCOTT, 2011). Antes de sofrer apoptose, neutrófilos ainda secretam diferentes citocinas, que afetam a ativação e diferenciação de células T (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

Embora os parasitos sejam rapidamente encontrados em neutrófilos, as melhores evidências de replicação e sobrevivência por longo prazo dos protozoários

ocorrem em fagócitos mononucleares. Dentro das primeiras horas de infecção células dendríticas (CDs) também participam do processo de fagocitose de protozoários, e essa “captura” envolve um mecanismo de extensão de pseudópodes. Macrófagos são rapidamente infectados e tornam-se a população celular infectada dominante depois de 24 horas (KAYE; SCOTT, 2011). A ativação de macrófagos é o principal mecanismo para eliminar o parasito *Leishmania*, presumivelmente por metabólitos tóxicos de oxigênio. Macrófagos ativados produzem diferentes citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18, IL-12 e IFN- $\gamma$  (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

Infecções parasitárias podem levar a uma resposta imunológica específica por parte do hospedeiro, caracterizada pelo aumento de células T CD4<sup>+</sup> e um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (REIS, 2006). Células T CD4<sup>+</sup> são críticas para o controle de infecções do parasito *Leishmania*, devido à sua habilidade de produzir IFN- $\gamma$ , o qual ativa macrófagos e CDs, levando à morte do parasito. O papel das células T CD8<sup>+</sup> está relacionado à resistência à reinfecção (KAYE; SCOTT, 2011).

O resultado da infecção está associado à via de ativação de macrófagos. A IL-12 é um pré-requisito para resposta imune Th1 na maioria das doenças parasitárias. Outra citocina pró-inflamatória que ajuda a evocar uma resposta imune Th1 é IL-18 (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). Além disso, IL-12 atua ativando células natural killer (NK) para produzir IFN- $\gamma$ . Este por sua vez, interage com macrófagos que liberam TNF- $\alpha$ , o qual atua sinergicamente em combinação com IL-12 e IFN- $\gamma$  na indução da expressão de iNOS (óxido nítrico sintase induzível) por macrófagos. Esta enzima catalisa a oxidação de nitrogênio guanidino de L-arginina para produzir óxido nítrico (NO) via NOS2, o qual mata o parasito (BALAÑA-FOUCE, 2012; HORTA, 2012) (Figura 5).

Por outro lado, os macrófagos ativados por linfócitos Th2 promovem uma via alternativa através de quimiocinas anti-inflamatórias, tais como TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10 e IL-13 e tornam-se permissivos ao desenvolvimento do parasito ativando a biossíntese das poliaminas via arginase I (BALAÑA-FOUCE, 2012). Arginase compete com iNOS pelo mesmo substrato, e também inibe a habilidade de produzir NO (HORTA, 2012) (Figura 5).

Embora nas infecções causadas por agentes intracelulares uma resposta imune desviada para o polo Th2 seja maléfica para o hospedeiro, pois aumenta a suscetibilidade às infecções e permite a multiplicação e disseminação do parasito; o

conceito de que uma potente resposta Th1 seja protetora deve ser visto com cautela. Em várias doenças causadas por protozoários, existem evidências de que a resposta imune exacerbada está envolvida no dano tecidual (MACHADO, 2004; PEREIRA, 2011).

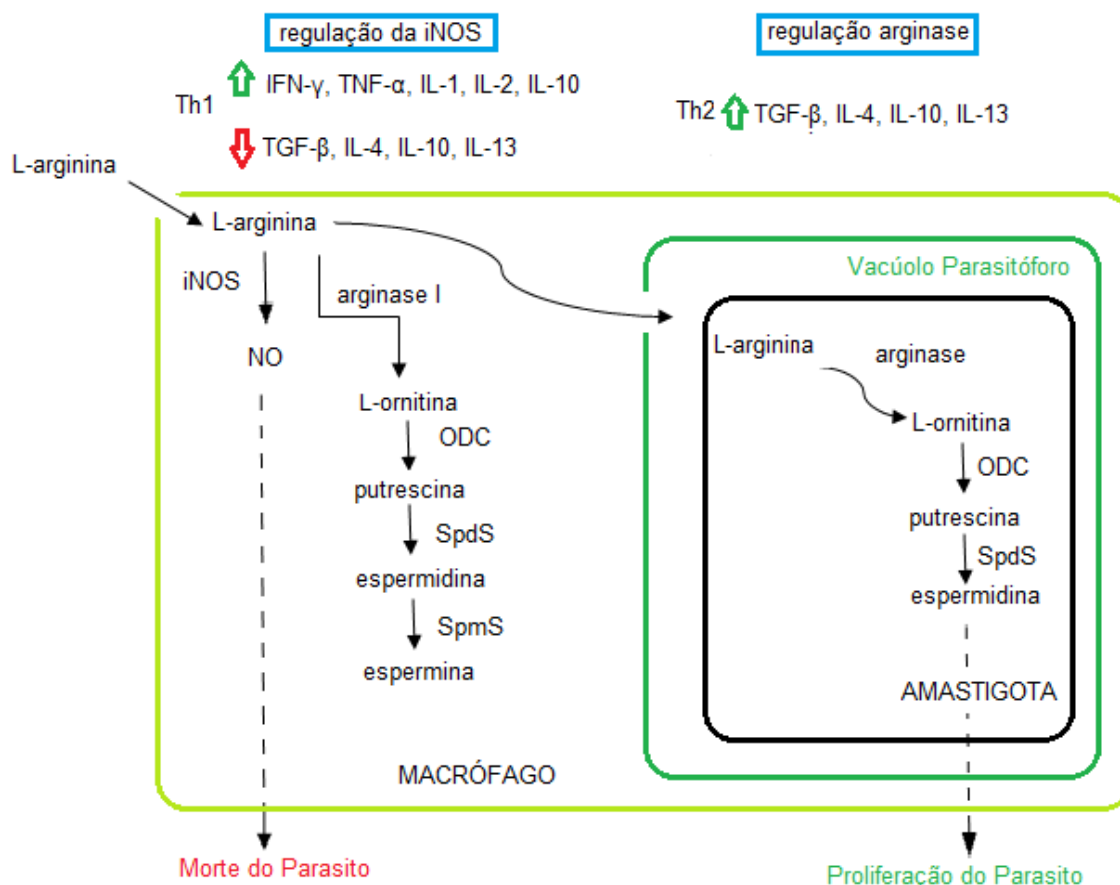


Figura 5. Representação esquemática da via de ativação de macrófagos e resultado da infecção. ARG: arginase; ODC: ornitina descarboxilase; SpdS: espermidina sintase; SpmS: espermina sintase; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; NO: óxido nítrico.

Fonte: Adaptado de BALAÑA-FOUCE, 2012.

O protozoário *Leishmania* é capaz de alterar a sinalização de suas células alvo para sua própria vantagem. O parasito alcança isso pelo emprego de estratégias para inibir proteínas que tenham um papel positivo na ativação de células imunes ou pela ativação de moléculas conhecidas por terem papéis chave

na regulação negativa de sinalização e função de células imunes (ASSCHE, 2011). A apresentação de antígenos através de MHC classe II é prejudicada em macrófagos infectados com *Leishmania*, uma vez que formas amastigotas de *Leishmania* são internalizadas, estas degradam moléculas de MHC classe II associadas com o vacúolo parasitóforo e conseqüentemente prejudicam a apresentação de antígenos (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

Além disso, tem-se observado que este protozoário pode interferir com a transdução do sinal do hospedeiro de uma maneira que a função efetora do macrófago seja prejudicada, o que por sua vez facilita a sobrevivência do parasito. Vias de sinalização dentro da célula são finamente reguladas pela fosforilação de proteínas, e os níveis de fosforilação de proteínas celulares são controlados pela atividade de proteínas quinases e fosfatases (SHADAB; ALI, 2011).

Por exemplo, a sinalização de proteína quinase C (PKC) é conhecida por ter papel na regulação das funções de ativação de macrófagos, incluindo a produção de NO e estresse oxidativo. O parasito possui uma das maneiras de subversão desta, devido à capacidade de bloqueio da atividade da PKC por lipofosfoglicanos (LPG) da superfície do protozoário. As proteínas quinases mitógeno ativadas (MAPKs) são conhecidas pelo seu papel na ativação de vários fatores de transcrição. Do mesmo modo, o protozoário *Leishmania* desenvolveu táticas para render vários membros inativos de MAPK na resposta à entrada do parasito no macrófago ou ativando estímulos para prosseguir a infecção (SHIO, 2012).

## **2.3 Tratamentos**

### **2.3.1 Antimoniais**

Os antimoniais pentavalentes estibogluconato de sódio (Figura 6) e antimoniato de meglumina têm sido usados na terapia das leishmanioses por mais de 70 anos em vários países (TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINK, 2011). Para o tratamento de todas as formas de leishmaniose humana estes permanecem como

fármacos de primeira escolha na América do Sul, Norte da África, Turquia, Bangladesh e Nepal (FRÉZARD; DEMICHELI, 2010). Em regiões epidêmicas de alta prevalência e alta incidência da Índia e Bihar tem-se constatado resistência a estes fármacos, além de altos níveis de ineficiência (SEIFERT, 2011). O tratamento com antimoniais requer administração parenteral, causando dores locais e efeitos colaterais sistêmicos, sendo assim necessário cuidadoso acompanhamento médico. Os efeitos colaterais tóxicos, como náusea, vômito, fraqueza e mialgia, cólica abdominal, arritmia cardíaca e pancreatite corroboram na dificuldade do tratamento (FRÉZARD; DEMICHELI, 2010; ASSCHE, 2011).

O antimoniato pentavalente ( $Sb^V$ ) é considerado pró-fármaco, o qual é convertido a antiomoniato trivalente ( $Sb^{III}$ ), uma forma ativa do fármaco (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Porém, o sítio de redução (macrófago, amastigota ou ambos) e mecanismo (enzimático ou não-enzimático) permanecem obscuros (SEIFERT, 2011). Estudos indicam que os tióis podem atuar como agente redutor desta conversão (FRÉZARD; DEMICHELI, 2010). Sendo assim, a atividade pode ser parcialmente explicada pela interação dos antimoniais com o sistema antioxidante do parasito, sendo também conhecidos por inibirem a enzima tripanotiona redutase (ASSCHE, 2011; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

Alguns autores mencionam que ambas as formas de antimoniato matam o parasito pela fragmentação de DNA, sugerindo o papel de apoptose e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

### 2.3.2 Outros Tratamentos

Outros tratamentos para leishmanioses vêm sendo empregados com uso de fármacos de segunda escolha, dentre os quais podemos citar Anfotericina B e suas formulações lipídicas, miltefosina, paramomicina e pentamidina (Tabela 2) (CROFT; OLLIARO, 2011).

A Anfotericina B é um antifúngico que tem sido utilizado para tratamento das leishmanioses. Foi descoberto em 1956 a partir de uma bactéria do gênero *Streptomyces* (ALAVI-NAINI; FAZAELI; O'DEMPSEY, 2012). Este antifúngico

poliênico é amplamente utilizado em regiões da Índia, onde a resistência aos antimonais é comum. A Anfotericina B (Figura 6) exibe alta afinidade pelo ergosterol, o qual é predominante na membrana celular de fungos e *Leishmania* (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012), esta interação com a membrana do parasito leva à formação de canais transmembrânicos de Anfotericina B e poros aquosos, o aumento da permeabilidade da membrana celular e promove o influxo de íons para o parasito, levando-o a morte (ASSCHE, 2011; SEIFERT, 2011). Porém, os efeitos colaterais também existem e incluem: febre, tromboflebite, miocardite, nefrotoxicidade e perda de eletrólitos (KAPPAGODA; SINGH; BLACKBURN, 2011; TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINK, 2011). Além disso, há necessidade de hospitalização e constante monitoramento dos pacientes (SEIFERT, 2011).

Anfotericina B cristalina é insolúvel em água e várias formulações vêm sendo preparadas, as quais mostraram melhor eficácia e menor toxicidade em fungos e vêm sendo exploradas para o tratamento das leishmanioses (SEIFERT, 2011; TIUMAN, 2011). Anfotericina B deoxicolato (Fungizone<sup>®</sup>), uma formulação micelar é altamente efetiva, e vem sendo usada como tratamento de primeira escolha em regiões com alta incidência de insensibilidade aos antimonais e de segunda escolha em outros locais (SEIFERT, 2011). Formulações lipídicas deste fármaco vêm sendo preparadas. A formulação lipossomal unilamelar (AmBisome<sup>®</sup>), complexo lipídico (Abelcet<sup>®</sup>) e dispersão coloidal (Amphocil<sup>TM</sup>) vêm sendo avaliados, revelando o AmBisome como o mais promissor na redução de lesões causadas por *L. (L.) major* (TIUMAN, 2011). A Anfotericina B lipossomal, que apresenta um aumento na eficácia e minimização da toxicidade, é ainda eficaz na difusão tecidual mantendo níveis estáveis em sangue, macrófagos e tecidos (SEIFERT, 2011).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) foi desenvolvida como um agente antineoplásico oral e tem sido aplicada no tratamento da leishmaniose (Figura 6). Até o momento, é o primeiro e único fármaco administrado oralmente para o tratamento das leishmanioses. Porém, o seu longo tempo de meia vida (aproximadamente 150h) pode facilitar a emergência de resistência (ASSCHE, 2011). A miltefosina alcançou o mercado e está registrada para o tratamento de LV na Alemanha e Índia e da LC na Colômbia (SEIFERT, 2011). Efeitos adversos incluem: náusea, vômito, vertigem, diarreia, insuficiência renal e teratogenicidade (KAPPAGODA; SINGH; BLACKBURN, 2011). Porém o principal órgão alvo dos

efeitos colaterais é o trato gastrointestinal, uma vez que sintomas gastrointestinais são reconhecidos como um dos efeitos colaterais mais comuns (SEIFERT, 2011). Embora, o modo de ação da miltefosina não esteja claro, acredita-se que ela reduza os componentes lipídicos na membrana de promastigotas e aumente a quantidade de fosfatidiletanolamina, sugerindo uma inibição parcial da fosfatidiletanolamina-N-metiltransferase que leva à diminuição da proliferação do parasito (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

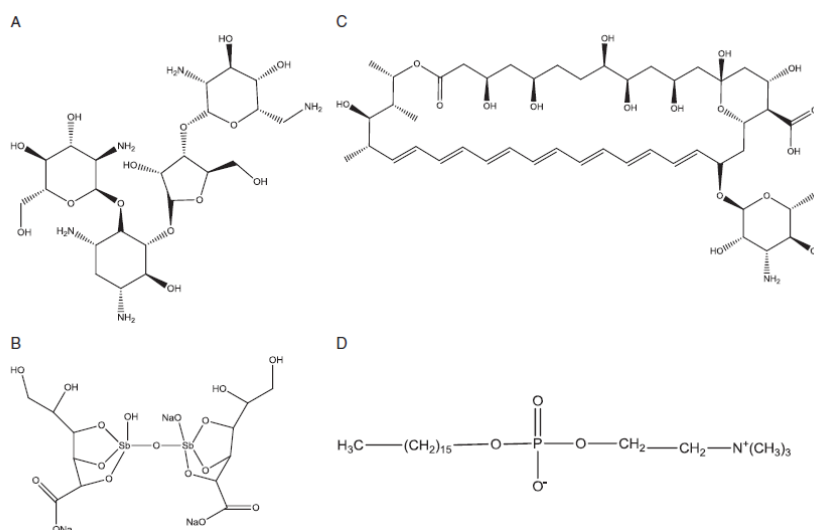


Figura 6. Estrutura química de alguns fármacos leishmanicidas. (A) Paramomicina. (B) Estibogluconato de sódio. (C) Anfotericina B. (D) Miltefosina.

Fonte: ASSCHE, 2011.

Por sua vez, a paramomicina (Figura 6) tem atividade bactericida e leishmanicida e quimicamente é um antibiótico aminoglicosídico (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Ambas as formas cutânea e visceral podem ser tratadas com este antibiótico, mas a baixa absorção oral tem levado ao desenvolvimento de formulações tópicas e parenterais, para leishmaniose cutânea e visceral, respectivamente (TIUMAN, 2011). Para a LC, a administração parenteral não é muito eficiente, ao contrário da formulação tópica com cloreto de metilbenzetônio. Acredita-se que o mecanismo de ação deste fármaco ocorra devido à disfunção respiratória e despolarização da membrana mitocondrial (ASSCHE, 2011).

Tabela 2. Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.

Fármaco	Propriedades e Administração	Comentários
Estibogluconato de sódio (Pentostam) e Antimoniato de meglumina (Glucantime)	Complexos organometálicos em formas poliméricas. Pentostam contém cerca de 33% e Glucantime cerca de 28% de antimônio pentavalente. Intravenoso ou intramuscular.	Para LC e LV. Há resistência ao fármaco na Índia. Resposta variável em diferentes espécies que causam LC.
Anfotericina B (Fungizone)	Antibiótico polieno, produto da fermentação de <i>Streptomyces nodus</i> . Intravenoso.	Para LC, LV e formas complexas de LC.
Anfotericina B lipossomal (AmBisome)	Lipossoma unilamelar. Intravenoso.	Usada para formas complexas, como PKDL e LM.
Miltefosina	Hexadecilfosfocolina. Oral	Primeiro fármaco oral para LV e efetivo contra algumas espécies de LC.
Paramomicina	Aminoglicosídeo produto da fermentação de <i>Streptomyces rimosus</i> . Intramuscular para LV e tópico para LC.	Formulação tópica com cloreto de metilbenzilmetônio disponível para LC.
Pentamidina	Diamina, como sal isotionato. Intramuscular.	Para formas de LC na América do Sul, somente.

FONTE: Adaptado de CROFT; OLLIARO, 2011.

## 2.4 Benzofenonas

As benzofenonas são cetonas aromáticas que pertencem a uma importante classe de compostos que, quando substituídos apresentam muitas atividades biológicas (MARVEL; SPERRY, 1941).

Além disso, benzofenonas naturais, nemorosona a guttiferona A, têm revelado interessantes propriedades biológicas do ponto de vista farmacológico, sendo descritas por muitos autores atividades *in vitro* de benzofenonas. Essa classe de compostos tem mostrado atividade em importantes patógenos humanos, como por exemplo, a atividade exibida por benzofenonas polipreniladas isoladas de plantas (família Clusiaceae) em *Staphylococcus aureus* e *Plasmodium falciparum* (MONZOTE, 2011). Também tem sido descrita a ação de benzofenonas em *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas, como potenciais inibidores da farnesiltransferase (ESTEVA, 2005).

A ação dessa classe de compostos sobre o protozoário *Leishmania* vem também sendo descrita. Benzofenonas polipreniladas naturais extraídas dos frutos de *Garcinia brasiliensis*, como a fukugetina, como exibiram atividade em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, além de uma promissora atividade inibitória de proteases do parasito (PEREIRA, 2010). Outro grupo distinto de pesquisadores relatou a atividade de sais bisfosfônio derivados de benzofenonas sobre o parasito *Leishmania*. Estes compostos comprometeram o complexo II da cadeia respiratória do protozoário, afetando, por exemplo, os níveis de ATP citoplasmáticos (LUQUE-ORTEGA, 2010).

Baseado nestes estudos propõe-se novos derivados de benzofenonas visando à ação destes sobre parasitos do gênero *Leishmania*.

## 2.5 Proteases

A alta toxicidade causada pelos agentes terapêuticos, atualmente disponíveis para o tratamento de infecções causadas por tripanossomatídeos, faz

com que estes sejam considerados abaixo do ideal (SANTOS, 2011). Assim sendo, a identificação de novos alvos para o desenvolvimento de fármacos mais efetivos e menos tóxicos para o tratamento destas infecções faz-se necessária.

A perpetuação de parasitos dentro de seus hospedeiros está intrinsecamente relacionadas à produção de moléculas, que ativam mecanismos de sobrevivência. Portanto, tais moléculas podem ser os potenciais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças parasitárias (MICHELS; AVILÁN, 2011). Dentre as várias moléculas têm-se as proteases, as quais são essenciais no ciclo de vida e patogenia dos agentes causadores de leishmanioses e doença de Chagas, por exemplo (SADIJ; McKERROW, 2002; GAZANION, 2011).

Proteases são enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas, resultando na liberação de peptídeos de tamanhos variáveis ou aminoácidos livres. Os substratos das proteases ligam-se em um sulco ou fenda, onde a hidrólise da ligação peptídica ocorre (SANTOS, 2011).

Estas enzimas estão envolvidas em diversos mecanismos de adaptação para a sobrevivência do parasito no hospedeiro. Incluindo a modulação do sistema imune do hospedeiro, invasão e destruição de tecidos, disseminação do parasito e aquisição de nutrientes essenciais que assegurem a sobrevivência e proliferação para manter a infecção (COOMBS; MOTTRAM, 1997; SADIJ; MCKERROW, 2002; APARICIO, 2004).

O comitê de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUB) classifica as proteases em dois grupos principais, as exopeptidases e endopeptidases, dependendo do sítio de ação dessas enzimas. As exopeptidases, que são peptidases relativamente maiores (>100 kDa), iniciam o processo de degradação a partir das extremidades amino (N) ou carboxi-terminal (C) das proteínas, produzindo pequenos peptídeos ou mesmo aminoácidos. As endopeptidases, são peptidases relativamente pequenas (~25-30 kDa) e clivam a proteína alvo na sua parte interna, longe das extremidades amino e carboxi-terminal, gerando dessa forma, peptídeos maiores (WEIDLICH, 2012).

As proteases, ou também conhecidas como peptidases, são divididas em sete classes (ou grupos) principais, de acordo com seu mecanismo de ação e os resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico, como as aspartil-, serino-,

cisteíno-, treonino-, glutamyl-, treonino-, metalo-peptidase, além de outras enzimas com mecanismo ainda desconhecido. (RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2006).

Com base nas suas sequências de aminoácidos, as proteases são ainda classificadas em clãs e famílias diferentes (Figura 7) (RAWLINGS; BARRET, 1993). Sendo assim, um clã é um grupo de família de proteínas que dividem um mesmo ancestral comum (BARRETT; RAWLINGS, 1994).

Sabe-se que proteases de parasitos desempenham funções na fisiologia dos mesmos, bem como na patologia por eles causada. Estas enzimas participam de processos tais como: a invasão do hospedeiro, escape ao sistema imune do hospedeiro, na diferenciação do parasito, no metabolismo de proteínas ou peptídeos biologicamente ativos, bem como na resistência do parasito aos tratamentos (DIAS, 2009).

Algumas modificações que ocorrem durante o ciclo de vida dos protozoários podem estar condicionadas à presença de proteases. Isto porque uma característica marcante do ciclo de vida dos protozoários parasitos é o profundo remodelamento morfológico que eles sofrem durante o seu desenvolvimento nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Algumas das mudanças mais marcantes ocorrem quando os parasitos deslocam-se de um meio extracelular para um meio intracelular. Todas estas mudanças morfológicas envolvem a reestruturação de organelas, como flagelos e cinetoplastos, e o rearranjo do citoesqueleto para acomodar as variações de forma (GONZALES, 1999).

A importância da proteólise intracelular em protozoários do gênero *Leishmania* foi demonstrada em estudos com a espécie *L. (L.) mexicana*. Robertson (1999) observou a inibição do crescimento *in vitro* de promastigotas e amastigotas após tratamento com inibidores de proteases. Durante seu desenvolvimento no hospedeiro, os protozoários *Leishmania* sp. e *T. cruzi* liberam antígenos em seu ambiente, especialmente proteínas que têm sido consideradas como fatores de virulência (CHANG, 2003; APARÍCIO, 2004). Sendo enzimas do parasito podem ser potencialmente exploradas como alvos para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento das leishmanioses (Tabela 3). Portanto um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a capacidade inibitória sobre proteases como possível alvo terapêutico das substâncias testadas neste estudo.

Tabela 3. Alvos enzimáticos potenciais para desenvolvimento de fármacos para leishmanioses.

Alvo ou Classe metabólica	Enzimas
Proteases	Cisteíno proteases Serino proteases Metaloproteases Treonino proteases
Proteases do metabolismo dependente de grupos tióis	Tripanotiona redutase Tripanotiona sintetase Triparedoxina peroxidase

Fonte: Adaptado de SILVA, 2009.

### 2.5.1 Cisteíno proteases (CPs)

As cisteíno proteases apresentam um resíduo de cisteína no centro ativo da enzima. A catálise ocorre via um intermediário tiol-éster, que é facilitada pelos resíduos adjacentes de histidina e ácido aspártico. São exemplos de cisteíno proteases a papaína, a cruzaína, as catepsinas e as calpaínas. As principais funções fisiológicas destas enzimas estão relacionadas ao metabolismo de proteínas, além de estarem envolvidas em várias patologias (SEGUNDO, 1993), estando notoriamente presentes em protozoários dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* (ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012). Portanto as cisteíno proteases podem ser exploradas como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos (ASSIS, 2012).

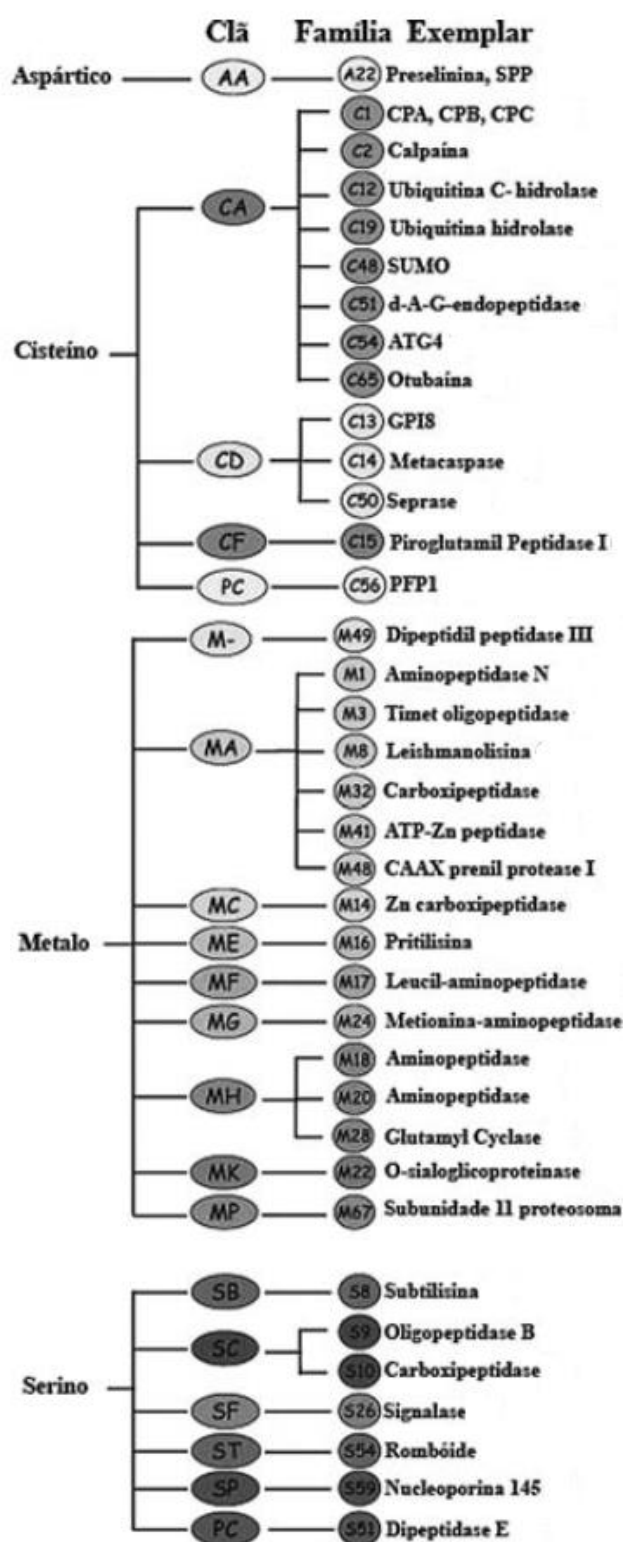


Figura 7. Clãs e famílias de proteases de *L. (L.) major*. A nomenclatura é baseada no banco de dados MEROPS.

Fonte: Adaptado de SILVA-LÓPEZ, 2010.

### 2.5.1.1 Papaína

A papaína é uma cisteíno-protease com cadeia polipeptídica única com 212 aminoácidos e três pontes de enxofre, isolada do mamão papaya – *Carica papaya* (SILVA-LOPEZ, 210). A estrutura da papaína apresenta dois domínios separados por uma fenda, onde se encontra o sítio ativo e, cataliticamente importantes são os resíduos de cisteína (na posição 25 – Cys25), histidina (na posição 159 – His159) e asparagina (na posição 175 - Asn175) (RAWLINGS, 2006; UYGUN, 2012).

Esta é uma das proteases de plantas mais exploradas e vem sendo usada em panificação, para obtenção de carnes tenras, tratamento de úlceras e edemas, anti-encolhimento de lãs, isolamento de células, além de propriedades anti-inflamatórias, antibacteriana e antioxidantes (LI, 2010; SILVA, 2010; UYGUN, 2012).

Estudos revelam que antes do advento de anti-helmínticos sintéticos, alguns extratos de plantas (incluindo extratos de *Carica papaya*, *Ficus galabra* e *Ananas comosus*) foram usados por décadas para o tratamento de infecções helmínticas. Recentemente tem-se constatado que a efetividade de tais extratos era devido à presença de cisteíno proteases que eram capazes de causar danos na cutícula de parasitos nematóides (HUET, 2006).

### 2.5.1.2 Cisteíno proteases de Tripanossomatídeos

As peptidases mais frequentemente relatadas e melhor caracterizadas em parasitos da família Trypanosomatidae, como *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi*, são as cisteíno proteases (CPs).

A maioria das CPs de tripanossomatídeos pertence ao clã CA ou CD e dentro desse primeiro clã distribuem-se entre a família C1 (semelhantes à papaína) ou entre a família C2 (semelhantes às calpaínas) principalmente (SILVA-LOPEZ, 2010; ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012; DOROUD, 2011) (Tabela 4).

Tabela 4. Cisteíno proteases detectadas em *T. cruzi* de acordo com Projeto Genoma e banco de dados MEROPS.

Clã	Família	Tipo de protease	Experimentalmente caracterizada
CA	C1	Tipo papaína	Catepsina B, Cruzaína
	C2	Tipo calpaína	
	C12, 19, 65	Enzimas deubiquitinantes	
	C54	Autofaginas	Atg4
CD	C13	GPI Transaminase	
	C14	Metacaspase	TcMCA3, TcMCA5
	C50	Separase	

Fonte: Adaptado de ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012.

A maioria dos estudos em CPs do protozoário *Leishmania* é centrada em algumas enzimas, denominadas CPA, CPB e CPC, todas as quais são similares à papaína e pertencem ao mesmo grupo de cisteíno proteases (designado Clã CA, família C1) (PEREIRA, 2011). As CPs designadas CPA e CPB são ambas catepsinas tipo L, enquanto que CPC é uma catepsina tipo B (GONTIJO, 2012). A CPA é codificada por um gene cópia única e tem sido descrita em *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum*. A CPC é citada em *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) major*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi*, a qual é também codificada por um gene cópia única. Já a CPB, a qual é codificada por genes que ocorrem em multicópias e arranjo em tandem, é descrita em *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana*. Além disso, uma extensão C-terminal não usual de 100 aminoácidos, que é frequentemente glicosilada, é uma característica da CPB que pode distingui-la da demais CPs na superfamília papaína (REBELLO, 2009).

Estudos com *L. (L.) major* evidenciam que a CPA é expressa em altos níveis no estágio amastigota e promastigota na fase estacionária. Enquanto que, a CPB está presente em grau máximo no estágio de desenvolvimento amastigota (DOROUD, 2011). De fato, espécies de *Leishmania* expressam altos níveis de cisteíno proteases, as quais são encontradas em grandes quantidades em organelas

lisossomais, chamadas megasomas (McKERROW, 2006). Os megasomas são corpúsculos arredondados, onde estão localizadas várias enzimas e são abundantes nas formas amastigotas. Nas formas promastigotas, as CPs parecem estar localizadas na superfície da membrana externa. O papel potencial dessas moléculas em induzir resposta de células T em leishmanioses não está bem elucidado, mas sabe-se recentemente que a região C-terminal contém potentes epítomos de células T (ALVES, 2004).

Embora o papel do domínio C-terminal não esteja muito bem entendido, ele pode aumentar a eficiência catalítica das CPs, e também pode ser a principal parte imunogênica destas em humanos naturalmente infectados. Estudos mostram que uma vez o domínio C-terminal não está presente, o sistema imune é capaz de montar uma forte e mais eficiente resposta que confere aumento da proteção pela redução da carga parasitária (CAZORLA, 2010). O fragmento da extensão C-terminal não é crucial para a atividade enzimática e tráfego intracelular, embora ele seja altamente imunogênico e responsável pela evasão imune e tem, portanto um papel no desvio da resposta imune do hospedeiro (DOROUD, 2011).

Estudos mostram ainda que, proteases CPB podem suprimir IL-12 em outras células apresentadoras de antígenos (APCs) (tais como células dendríticas) ou até mesmo modular outras citocinas indutoras de resposta Th1 (McKERROW, 2006). De fato há evidências, de que CPB de *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* tenha um papel no balanço da resposta Th1/Th2 pela clivagem de moléculas do complexo de histocompatibilidade tipo II (MHC II) nos vacúolos parasitóforos do parasito, clivando IL-2 e receptores de IgE, induzindo a expressão de IL-4 e inibindo a produção de IL-12 em macrófagos e células dendríticas e pela clivagem do NF- $\kappa$ B. Tais dados corroboraram com o potencial da CPB como uma indutora de resposta imune Th2 e uma inibidora de respostas Th1 do hospedeiro e imunidade protetora (CAMERON, 2004; MATOS GUEDES, 2010; PEREIRA, 2011).

A CP melhor caracterizada em *T. cruzi* é a cruzipaína, também conhecida como cruzaína ou GP57/51, foi pela primeira vez descrita em extratos livres de células de epimastigotas por Itow e Camargo. Cruzaína é uma endopeptidase capaz de digerir proteínas, tais como caseína, soroalbumina bovina e denaturar hemoglobina (CAZZULO, 2002). Ela consiste de uma molécula catalítica, com alta identidade de sequência com algumas catepsinas e uma longa extensão C-terminal

de 130 aminoácidos (ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012). Essa CP, identificada como um alvo terapêutico em meados da década de 90, apresenta a tríade catalítica característica (Cys25, His159 e Asn175) das enzimas da superfamília da papaína (SCHARFSTEIN, 2007). Estudos de análise de sequência e perfil do substrato identificam a cruzaina como uma catepsina tipo L (KERR, 2009). Ela apresenta um domínio catalítico com alta homologia às enzimas pertencentes à família da papaína e um domínio C-terminal que, em contraste a outras enzimas deste tipo, é retida na proteína madura (CAZORLA, 2010).

A principal cisteína protease de *T. cruzi*, cruzaina, mostrou ser crucial para todos os estágios do ciclo de vida do parasito e tem um importante papel na diferenciação, invasão celular, multiplicação intracelular e evasão imune (ROGERS, 2012). Ao considerarmos o estágio do protozoário encontrado no inseto, pode-se dizer que a cruzaina tem um papel no remodelamento celular durante a transformação de epimastigota de *T. cruzi* para tripomastigota metacíclica (SCHARFSTEIN, 2007). No intestino do inseto vetor esta enzima tem um papel proeminente na nutrição do parasito, participando nos processos de invasão de células mamíferas pelo parasito; além de fornecer um mecanismo pelo qual o protozoário pode escapar da resposta imune do hospedeiro, pela digestão da “dobradiça” de todas as subclasses de IgG de humanos (BEAILIEU, 2010; ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012). Scharfstein e colaboradores verificaram que além de gerar peptídeos que estimulam a internalização de tripomastigotas por células cardiovasculares, a atividade enzimática da cruzaina é essencial para o desenvolvimento e diferenciação de amastigotas intracelulares. A cruzaina pode ainda gerar peptídeos pró-inflamatórios nos sítios de infecção, alertando as células “sentinelas” do sistema imune inato sobre a presença de tripomastigotas no tecido intersticial (SCHARFSTEIN, 2007). Porém, estudos recentes sugerem que mecanismos anti-apoptóticos de miocardiócitos infectados com *T. cruzi in vitro* sejam mediados pela cruzaina (DOYLE, 2011).

## 2.5.2 Serino proteases (SPs)

As serino proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de serina no sítio ativo da enzima, acompanhado de um resíduo de ácido aspártico e outro de histidina formando uma tríade catalítica. A tripsina, a quimiotripsina, a elastase, as calicreínas e as oligopeptidases B e C são exemplos de serino proteases (POWERS, 2002; MUNDAY, 2011). Pesquisas sobre os efeitos de inibidores de serino proteases na sobrevivência de *Leishmania* têm mostrado que estes reduzem a viabilidade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, sugerindo que as serino proteases possam ser utilizadas como potenciais alvos para o desenvolvimento de novos candidatos à fármacos (SILVA-LOPEZ, 2007).

As serino proteases (SPs) estão envolvidas numa grande diversidade de processos fisiológicos essenciais para a sobrevivência de todos os organismos vivos e em parasitos, de modo especial, estão envolvidas na degradação do tecido conjuntivo do hospedeiro, para facilitar sua invasão e disseminação; assimilação de aminoácidos, com consequente síntese de proteínas, peptídeos ou outros produtos derivados de aminoácidos; remodelagem do parasito durante a transição de um estágio morfológico para outro e ativação de enzimas ou de outras moléculas biologicamente ativas (SILVA-LÓPEZ, 2010).

### 2.5.2.1 Tripsina

Enzimas da família de serino proteases, como a tripsina, estão difundidas no reino animal (BORGES-VELOSO, 2012). A tripsina é uma das serino protease mais estudada e melhor caracterizada, por isso, é uma das enzimas melhor compreendidas em termos estruturais, de sua especificidade e do seu mecanismo catalítico. Em virtude disso, a tripsina é uma enzima utilizada como modelo experimental para estudos de caracterização de outras serino proteases. Seu sítio catalítico propriamente dito, que é constituído da tríade catalítica His57, Ser195 e Asp102 (GONTIJO, 2005). Ela é uma protease pancreática com alta afinidade por

cadeias possivelmente carregadas de arginina e lisina, além de poder ativar outras proteases. De todas as endopeptidases digestivas, a tripsina tem a especificidade pelo substrato mais pronunciada (ANIRUDHAN; REJEENA, 2012; WEIDLICH, 2012).

A atividade da tripsina no lúmen do intestino de um inseto tem papéis essenciais na oogênese, imunidade, metamorfose, modulação do desenvolvimento embrionário e nutrição (BORGES-VELOSO, 2012; WEIDLICH, 2012). Além disso, tem-se demonstrado que a expansão de genes de serino proteases tipo tripsina em mosquitos coincide com o desenvolvimento do traço hematófago. De fato, SPs são as mais abundantes no intestino do mosquito, onde eles fornecem suprimento contínuo de aminoácidos essenciais e energia, a partir de alimentos, para o desenvolvimento. Além disso, enzimas tipo tripsina secretadas no lúmen do intestino têm sido implicadas no processo de estabelecimento do patógeno em vários insetos vetores (BORGES-VELOSO, 2012). Em vertebrados, em contraste, dois órgãos completamente diferentes estão envolvidos na secreção de tripsina, a mucosa intestinal e o pâncreas (WEIDLICH, 2012).

### **2.5.2.2 Serino proteases de Tripanossomatídeos**

As 45 famílias de serino proteases estão agrupadas em 13 clãs (Tabela 5) como, por exemplo, o clã SB agrupa famílias que possuem origens comuns com a subtilisina, o clã SC com a carboxipeptidase C, o clã E com a peptidase A d-ala-d-ala de *Escherichia coli* e o clã SF com o repressor do LexA (SILVA-LÓPEZ, 2010).

A oligopeptidase B (OpB) é uma serino protease pertencente à família da proliloligopeptidase (clã SC e família S9), a qual tríade catalítica é composta por resíduos de Ser, Asp e His (McLUSKEY, 2010; MUNDAY, 2011). Esta enzima difere das serino peptidases clássicas (tripsina e subtilisina) em que ela tem uma especificidade de substrato restrita e tipicamente hidrolisa somente pequenos oligopeptídeos (não mais que 30 aminoácidos). Conseqüentemente, ela cliva peptídeos biologicamente ativos, mas não grandes proteínas estruturadas (McLUSKEY, 2010).

Tabela 5. Serino proteases detectadas em *T. cruzi* de acordo com Projeto Genoma e banco de dados MEROPS.

Clã	Família	Tipo de protease	Experimentalmente caracterizada
SB	S8	Subtilisina	
SC	S9	Prolil oligopeptidase	OpB, Tc80, TcSCP
	S10	Carboxipeptidase Y	
	S33	Prolil aminopeptidase	
SF	S26	Peptidase sinal I	

Fonte: Adaptado de ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012.

A OpB é uma peptidase alcalina com uma massa molecular de 120 kDa e apresenta uma atividade de carboxipeptidase altamente específica, a qual requer a presença de pelo menos dois resíduos básicos no C-terminal do substrato (ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012). A peptidase codificada consiste de uma simples cadeia de aproximadamente 700 resíduos de aminoácidos (COETZER; GOLDRING; HUSON, 2008).

A OpB é restrita em ocorrência, sendo aparentemente presente somente em bactérias, plantas e tripanossomatídeos, como protozoários *Leishmania* e *Trypanosoma* (MUNDAY, 2011). Os genes que codificam a OpB são encontrados em cópia única e são expressos em todos os estágios do ciclo de vida de *L. (L.) amazonensis* e *T. cruzi* (COETZER; GOLDRING; HUSON, 2008).

Vários membros da família da proliloligopeptidase têm sido identificados em *Leishmania*, incluindo proteases tipo oligopeptidase B (MUNDAY, 2011). Esta serino protease é expressa tanto em promastigotas, quanto em amastigotas de *Leishmania spp.* e são encontradas na bolsa flagelar, em vesículas da via endocítica/exocítica, nos megassomas, na superfície celular e na membrana de organelas (SILVA-LÓPEZ, 2010).

Em *Trypanosoma cruzi*, a atividade proteolítica da OpB é requerida para uma sinalização de cálcio, que regula a invasão da célula hospedeira pelo parasito.

A enzima consegue isso por meio da geração de um ligante que interage na sinalização ativa na superfície da célula hospedeira, mobilizando cálcio intracelular e promovendo a invasão pelo tripanossoma (McLUSKEY, 2010).

Estudos mostraram que algumas enzimas da família prolil oligopeptidase compartilham uma estrutura tridimensional similar contendo um domínio catalítico com folha  $\alpha/\beta$  hidrolase e um domínio  $\beta$ -hélice (ISMAIL, 2009). A protease não exhibe a formação de pró-enzima (e também não há evidências de sequência sinal) e é então traduzida diretamente como uma enzima ativa (COETZER; GOLDRING; HUSON, 2008).

Dado que o gene da OpB está ausente em vertebrados, um inibidor da OpB altamente seletivo, o qual é capaz de distinguir esta peptidase de outras serino peptidases de humanos poderia potencialmente ser empregado como fármaco leishmanicida (ISMAIL, 2009).

### **2.5.3 Enzimas da biossíntese das poliaminas**

Evidências indicam uma correlação entre os níveis de poliaminas em células e o rápido crescimento durante a proliferação e diferenciação celular (MANSOUR, 2002). Uma via a qual tem estimulado considerável interesse entre os cientistas para o tratamento de doenças parasitárias é a biossíntese de poliaminas, cátions alifáticos que desempenham um papel vital em processos-chaves tais como crescimento, diferenciação e síntese macromolecular (OLENYIK; GILRO; ULLMAN, 2011).

Enzimas da biossíntese das poliaminas exibem características estruturais que são significativamente diferentes entre parasitos e hospedeiros humanos. Vale ressaltar que, algumas enzimas as quais usam poliaminas como substratos são exclusivas de parasitos despertando ainda mais o interesse sobre estas (HEBY; PERSSON; RENTALA, 2007) (Figura 8).

Em mamíferos L-arginina (L-Arg), precursor das poliaminas, é um aminoácido semi-essencial, podendo ser sintetizado a partir de prolina ou glutamato, via ornitina ou citrulina. Entretanto células mamíferas podem também importar L-Arg

desde que sua síntese endógena não seja suficiente para alimentar vias, que o usa como uma molécula precursora (COLOTTI; ILARI, 2011).

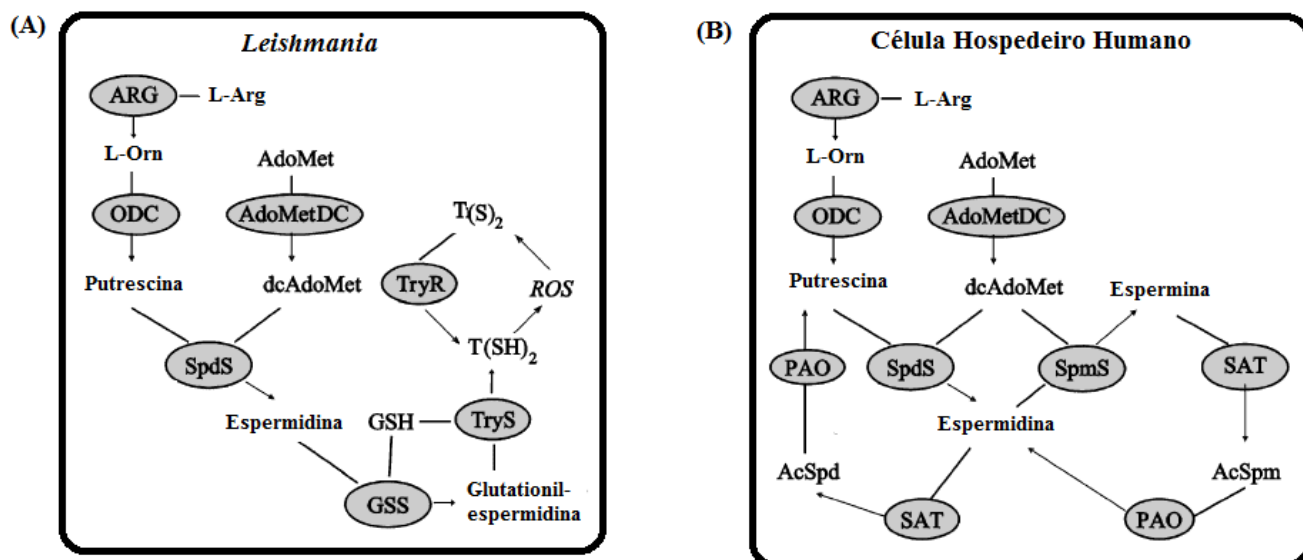


Figura 8. Transporte, biossíntese, interconversão e utilização das poliaminas em *Leishmania* e em células do hospedeiro humano. (A) Em *Leishmania*, a ODC e AdoMetDC tem longo tempo de meia-vida, e SpmS é ausente. Esses organismos conjugam espermidina e glutatona, usando duas enzimas (GSS e TryS) para formar tripanotona, a qual está envolvida na defesa contra estresse químico e oxidante. (B) Em células humanas, as descarboxilases (ODC e AdoMetDC) são altamente reguladas e tem curtos tempos de meia-vida, enquanto que as sintases (SpdS e SpmS) são constitutivamente expressas. SAT e PAO fornecem uma via para conversão de espermina, espermidina para putrescina via intermediárias acetilados (AcSpm e AcSpd). AcSpd: espermidina acetilada; AcSpm: espermina acetilada; AdoMet: S-adenosilmetionina; AdoMetDC: S-adenosilmetionina descarboxilase; ARG: arginase; dcAdoMet: S-adenosilmetionina descarboxilada; GSH: glutatona; GSS: glutationil-espermidina sintase; ODC: ornitina descarboxilase; PAO: poliamina oxidase; Put: putrescina; ROS: espécies reativas de oxigênio; SAT: espermina/espermidina N1-acetiltransferase, Spd: espermidina; Spm: espermina; TryR: tripanotona redutase; TryS: tripanotona sintetase; T(SH)<sub>2</sub>: tripanotona; T(S)<sub>2</sub>: tripanotona dissulfeto

Fonte: Adaptado de HEBY; PERSSON; RENTALA, 2007.

Em particular, L-Arg é essencial para a eficiente ativação de função de células T. Em macrófagos L-Arg pode ser catabolizado em duas diferentes vias, dependendo da expressão de duas moléculas induzíveis, óxido nítrico sintase 2

(NOS2) e ARG, as quais são competitivamente controladas por citocinas Th1 e Th2 (Figura 9). A via L-Arg usada por essas enzimas pode determinar o resultado da infecção, uma vez que macrófagos podem matar o parasito ou promover seu crescimento (BALAÑA-FOUCE, 2012).

A ativação de macrófagos com citocinas Th1, tais como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , as quais desencadeiam a ativação de vias metabólicas L-Arg necessárias para a produção de NO. Citocinas Th1 induzem NOS2, que oxidam L-Arg à L-citrulina e NO, um metabólito responsável pela morte do parasito. A produção de NO é facilitada pelo aumento da captura de L-Arg e pela inibição de enzimas do hospedeiro que levam L-Arg à L-ornitina e biossíntese de poliaminas (COLOTTI; ILARI, 2011).

Citocinas Th2 determinam a indução de ARG do hospedeiro, a qual converte L-Arg em uréia e L-ornitina, rendendo um catabolismo de uréia, prolina, glutamato, creatina e poliaminas, tecido-específico e estímulo-dependente. As poliaminas são essenciais para o crescimento do parasito. A atividade ARG priva NOS2 de substrato, diminuindo a síntese de NO e fornecendo poliaminas, as quais podem aumentar a proliferação dos parasitos. As respostas imunológicas do tipo Th2 amplamente promovem crescimento de amastigotas, pelo menos em parte, devido ao aumento da disponibilidade de nutrientes essenciais (COLOTTI; ILARI, 2011).

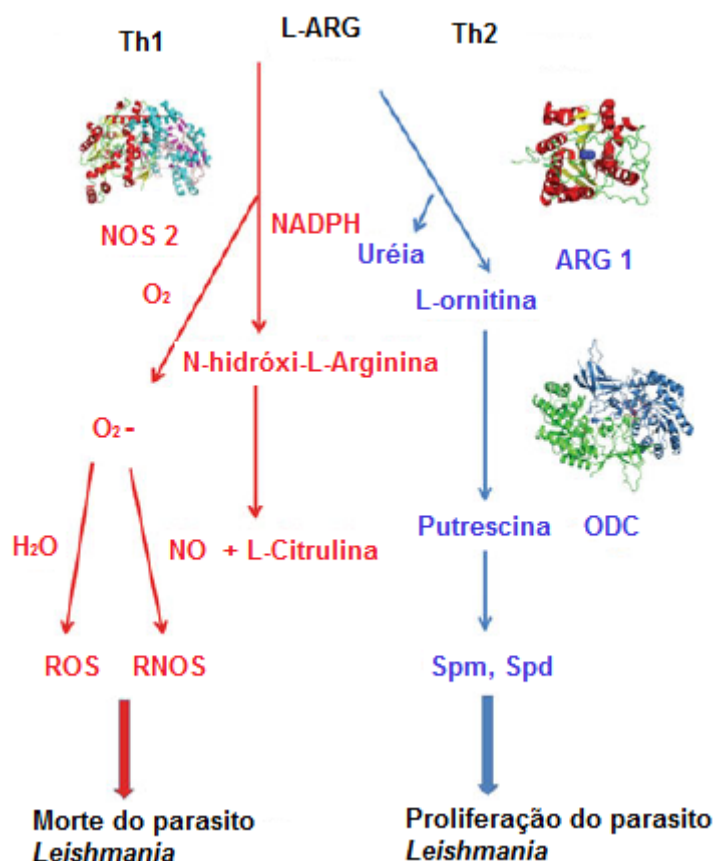


Figura 9. Via L-Arg e determinação do resultado da infecção.  
Fonte: Adaptado de COLOTTI; ILARI, 2011.

### 2.5.3.1 Ornitina descarboxilase

A ornitina descarboxilase (ODC) é uma enzima que está presente na biossíntese das poliaminas, e catalisa a descarboxilação de L-ornitina à putrescina. Estudos utilizando *Leishmania knockout* para ODC ( $\Delta odc$ ), rendendo um parasito auxotrófico para poliaminas (ou seja, organismos com dependência nutricional de poliaminas), revelaram que a habilidade de *L. (L.) donovani* em sustentar a infecção em camundongos Balb/c foi profundamente prejudicada. Além disso, mostram que a carga parasitária no fígado e baço foi reduzida quando comparada à carga parasitária dos mesmos órgãos de camundongos infectados com *L. (L.) donovani* tipo selvagem (BOITZ, 2009).

É plausível que a ODC possa ter uma função essencial adicional em amastigotas, a qual não está relacionada ao seu conhecido papel metabólico e que a avirulência de linhagens  $\Delta odc$  é devido à perda dessa função essencial adicional (OLENYIK; GILRO; ULLMAN, 2011).

O uso de D,L- $\alpha$ -Difluorometilornitina (DFMO), um inibidor suicida da ODC, no tratamento da tripanossomíase Africana causada por *Trypanosoma brucei gambiense*, um protozoário parasito filogeneticamente relacionado à *Leishmania*, corrobora com a importância da enzima mencionada para o parasito, uma vez que tem mostrado uma notável eficácia terapêutica (BOITZ, 2009). Sendo assim, esta enzima tem mostrado ser um interessante alvo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses.

### 2.5.3.2 Tripanotiona redutase

Protozoários parasitos, como *Leishmania*, têm um metabolismo tiol para enfrentar o estresse oxidativo inteiramente diferente de seu inseto vetor e hospedeiros mamíferos, o qual é baseado no sistema tripanotiona/tripanotiona redutase (TryR) (SHUKLA; PATRA; DUBEY, 2011 a).

A TryR é uma flavoenzima oxidoredutase NADPH-dependente. Esta é uma enzima chave no metabolismo tiol, cuja função é converter tripanotiona dissulfeto ( $T[S]_2$ ) em tripanotiona ditiol reduzida ( $T[SH]_2$ ) (HAMILTON, 2005; OLIN-SANDOVAL; MORENO-SÁNCHEZ; SAAVEDRA, 2010). Em suma, esta enzima é uma oxirredutase FAD dependente que utiliza NADPH como doador de elétrons, e contém sítios de ligação para FAD, NADPH, além do sítio de ligação do substrato (RODRIGUES, 2012).

Por todo seu ciclo de vida, o protozoário *Leishmania* é exposto a uma variedade de espécies reativas de oxigênio. A defesa antioxidante é particularmente importante para amastigotas, pois elas sobrevivem a uma explosão oxidativa gerada pelos macrófagos do hospedeiro, os quais produzem grandes quantidades de NO para eliminar células invasoras (BOCEDI, 2010; SWENERTON, 2010).

A TryR presente em *Leishmania* está envolvida na defesa do parasito contra o estresse químico e oxidante, ou seja, ela ajuda na luta contra várias espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pelo metabolismo aeróbico e por macrófagos do hospedeiro (McCONVILLE; NADERER, 2011; SUKLA, 2011). Em humanos esse papel é assumido pela glutathione redutase (GR), que é responsável pela catálise da glutathione. Nos parasitos a tripanotione serve como substituto para muitas das funções metabólicas e antioxidantes atribuídas à glutathione em células de mamíferos (GALARRETA, 2008). Quando comparada a GSH, pode-se dizer que T[SH]<sub>2</sub> intercepta NO como um complexo de ferro dinitrosil com 600 vezes mais afinidade. Além disso, o complexo de ferro dinitrosil tripanotione dependente não provoca nenhum efeito deletério na atividade enzimática do parasito, enquanto que o análogo, complexo de ferro dinitrosil com glutathione, severamente reduz a atividade da GR. Esses resultados indicam que T[SH]<sub>2</sub> é muito mais eficientemente protetora contra NO do que GSH (ASSCHE, 2011). A GR possui homologia com a TryR, mas o alto grau de especificidade mostrado por ambas enzimas pelos seus respectivos substratos encoraja o desenvolvimento de candidatos à fármacos seletivos para TryR (SPINKS, 2009).

## 2.6 *Docking* Molecular

Nas últimas décadas, com o avanço da biologia molecular e a crescente explosão de dados moleculares disponíveis oriundos de projetos Genomas e Proteomas, uma grande atenção tem sido devotada à utilização e ao desenvolvimento de métodos computacionais para a solução de problemas da biologia molecular (MAGALHÃES, 2006). O *screening* virtual tem se tornado uma ferramenta aceita na descoberta de fármacos, e tem sido aplicado com sucesso no estágio de descoberta de compostos líderes. (ZHANG, 2008). Dessa maneira, a análise por *docking* molecular pode ser uma ferramenta muito útil no processo de descoberta de fármacos (PIERRI; PARISI; PORCELLI, 2010).

O planejamento de fármacos antiparasitários se baseia, especialmente, na investigação de vias bioquímicas do parasito e, quando apropriado, na comparação dessas com a do hospedeiro, com o objetivo de identificar possíveis alvos para modulação seletiva por moléculas pequenas (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

O *docking* molecular é um procedimento computacional que tenta prever ligações não covalentes de macromoléculas ou, mais frequentemente, de uma biomacromolécula (enzima/receptor) e uma molécula pequena (ligante). O objetivo é prever as conformações de ligação e a afinidade de ligação (TROTT; OLSON, 2010). Essas duas moléculas são mantidas juntas devido a forças atrativas que atuam entre elas e também devido a uma combinação das formas geométricas das duas moléculas (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003). Sendo assim, o método de *docking* pode ser utilizado para prever a configuração e afinidade de ligação de um ligante por uma biomacromolécula específica (LILL, 2011).

Kang et al definem *docking* molecular como uma metodologia cujo objetivo é encontrar os modos de ligação de menor energia de um ligante baseado no “mecanismo chave-fechadura”, dentro do sítio ativo da biomacromolécula, cuja estrutura é conhecida (KANG, 2009). Entretanto, atualmente este mecanismo não é amplamente aceito, pois as moléculas que compõem um sistema químico complexo não podem ser consideradas rígidas: vibrações moleculares, torções em ângulos de ligação precisam ser incluídas para uma representação realística do sistema.

A análise por *docking* molecular é basicamente um procedimento de amostragem computacional em que, várias conformações docadas são exploradas para tentar prever uma potencial conformação correta, que pode ser experimentalmente confirmada (PIERRI; PARISI; PORCELLI, 2010). Sendo assim, o problema que o *docking* molecular tenta resolver, dadas as coordenadas atômicas de duas moléculas, é a predição do seu modo correto de associação (dos SANTOS, 2010).

Os três elementos chave no *docking* são a representação das estruturas, a procura no espaço conformacional e o *ranking* dos possíveis complexos. Sendo assim, pode-se envolver tratamento estático ou dinâmico da estrutura da proteína, podendo esta ser rígida ou flexível (dos SANTOS, 2010). O ligante também pode ser considerado um corpo rígido, sem liberdade de girar os ângulos de torção (*docking*

rígido), ou o ele pode girar seus ângulos de torção (*docking* flexível) (de AZEVEDO, 2009). O algoritmo deve procurar um ambiente de energia potencial para encontrar o mínimo global de energia. Em *docking* rígido isso significa que o algoritmo explora diferentes posições para o ligante no sítio ativo do receptor usando os graus de liberdade translacional e rotacional. No *docking* de ligantes flexíveis adiciona-se a exploração dos graus de liberdade torcionais do ligante à este processo (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003).

Portanto, o *docking* molecular pode ser classificado em três níveis baseados no grau de aproximação de flexibilidade: (1) *docking* de corpo rígido, no qual tanto a proteína quanto o ligante são considerados como dois corpos sólidos rígidos. (2) *Docking* semi-flexível, ou *docking* rígido-flexível: esse modelo é assimétrico no qual uma das moléculas, geralmente o ligante, é considerado flexível, enquanto a outra é considerada rígida. (3) *Docking* flexível: nesse modelo, ambas as moléculas são consideradas flexíveis, entretanto a flexibilidade de uma das moléculas (ou de ambas) geralmente é limitada ou simplificada devido ao alto custo computacional exigido (HALPERIN, 2002).

Em todo o processo de *docking*, muitas orientações e conformações do ligante são geradas no sítio de ligação da proteína. A energia livre de ligação de cada complexo é subsequentemente estimada usando uma função *score*, a qual auxilia no processo de triagem de ligantes (LILL, 2011).

O número de softwares de *docking* é alto e vem crescendo. AutoDock, GOLD, FlexX são os mais populares, seguidos por DOCK e ICM (Figura 10). A boa precisão e alta versatilidade exibida pelo AutoDock têm promovido o uso do mesmo, o que explica o alto número de citações (SOUSA; FERNANDES; RAMOS, 2006). Porém o AutoDock Vina vem mostrando vantagens sobre o AutoDock. O “Vina” é um dos mais amplamente softwares de *docking* utilizados, liberado em 2009, e usa uma função *score* empírica que avalia a afinidade de ligação entre as moléculas e emprega otimizador global de pesquisa local, alcançando uma melhora significativa em velocidade e maior exatidão da predição do modo de ligação comparado com seu predecessor AutoDock (HANDOKO, 2012).

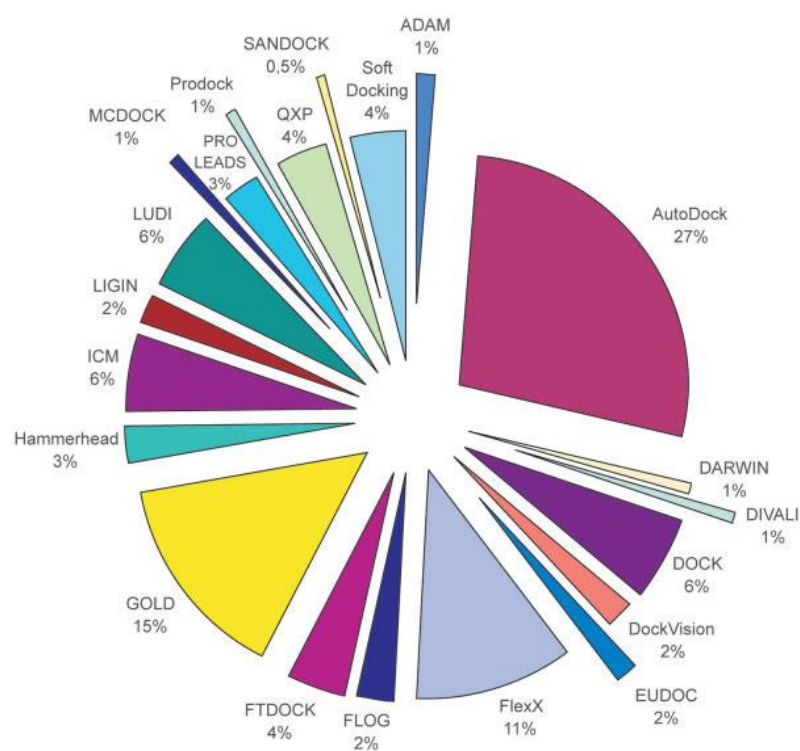


Figura 10. Número de citações de alguns softwares de docking mais comuns analisados do Web of Science (2005).

Fonte: SOUSA; FERNANDES; RAMOS, 2006

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos Gerais

Avaliar a ação *in vitro* de derivados de benzofenonas em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, além de sua ação citotóxica a macrófagos peritoneais murinos. Adicionalmente, busca-se entender possíveis mecanismos de ação, através da avaliação da dosagem de óxido nítrico e do potencial de inibição enzimática nos contextos *in silico* e *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a atividade leishmanicida dos derivados (LFQM-115, LFQM-116, LFQM-117, LFQM-118, LFQM-119, LFQM-120, LFQM-121, LFQM-122 e LFQM-123) e seus precursores (CM-A, CM-B e CM-C) em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*;

2. Avaliar o potencial citotóxico dos derivados benzofenônicos (LFQM-115, LFQM-116, LFQM-117, LFQM-118, LFQM-119, LFQM-120, LFQM-121, LFQM-122 e LFQM-123) e seus precursores (CM-A, CM-B e CM-C) a macrófagos peritoneais murinos;

3. Avaliar a atividade leishmanicida dos derivados (LFQM-115, LFQM-116, LFQM-117, LFQM-118, LFQM-119, LFQM-120, LFQM-121, LFQM-122 e LFQM-123) em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*;

4. Analisar os níveis de óxido nítrico produzidos em sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. (L.) amazonensis* e em contato com as substâncias testadas (LFQM-116, LFQM-117, LFQM-119, LFQM-120 e LFQM-121);

5. Analisar por *docking* molecular a predição da ligação proteína-ligante entre cisteíno proteases (papaína e cruzaina), serino proteases (tripsina e

oligopeptidase B), enzimas da biossíntese das poliaminas (ornitina descarboxilase e tripanotiona redutase) e benzofenonas como os ligantes (LFQM-116, LFQM-117, LFQM-119, LFQM-120 e LFQM-121);

6. Avaliar os compostos LFQM-116, LFQM-117, LFQM-119, LFQM-120 e LFQM-121 em relação a sua capacidade de inibir proteases (papaína, cruzaína, tripsina e oligopeptidase B).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Substâncias Testadas

Os derivados de benzofenonas (LFQM-115 à LFQM-123) foram obtidos através de reações de alquilação a partir das benzofenonas comerciais (Figura 11) 2,4-diidroxibenzofenona (CM-A), 4-hidroxibenzofenona (CM-B) e 4,4'-diidroxibenzofenona (CM-C) (SIGMA®) (Figura 12). As reações foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da UNIFAL-MG, sendo tais compostos gentilmente cedidos para a realização dos ensaios biológicos.

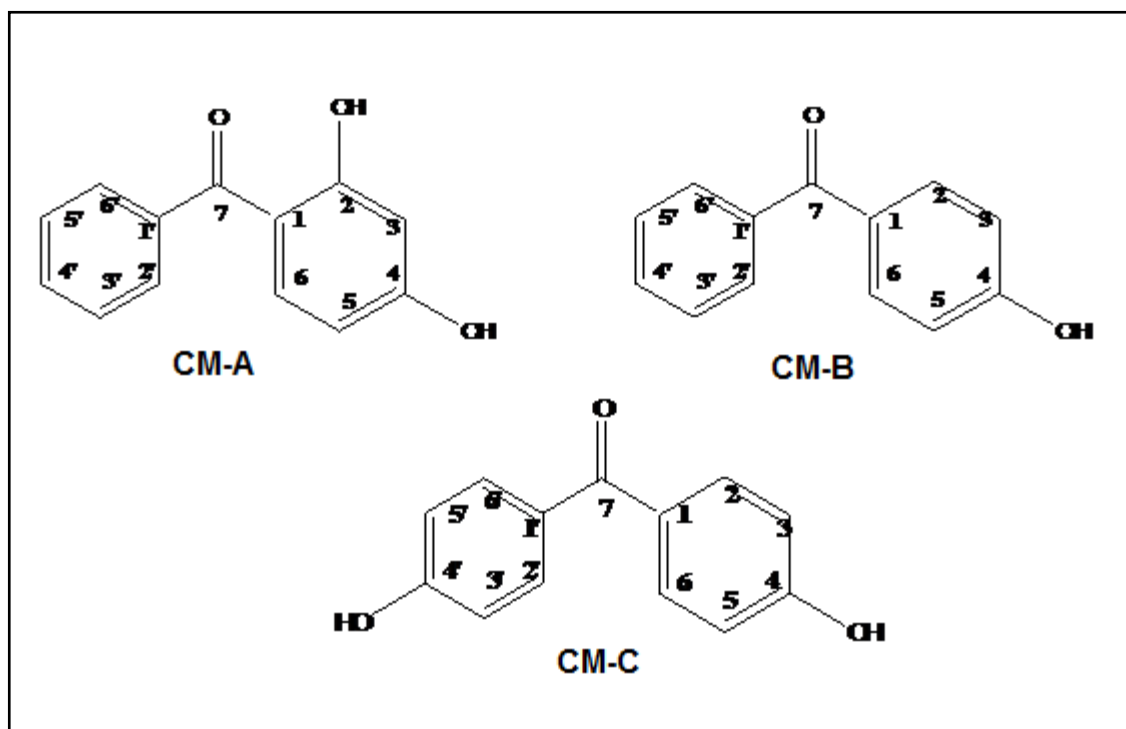


Figura 11. Representação das benzofenonas de partida utilizadas nas reações de alquilação.

Fonte: MACIEL-REZENDE, 2012.

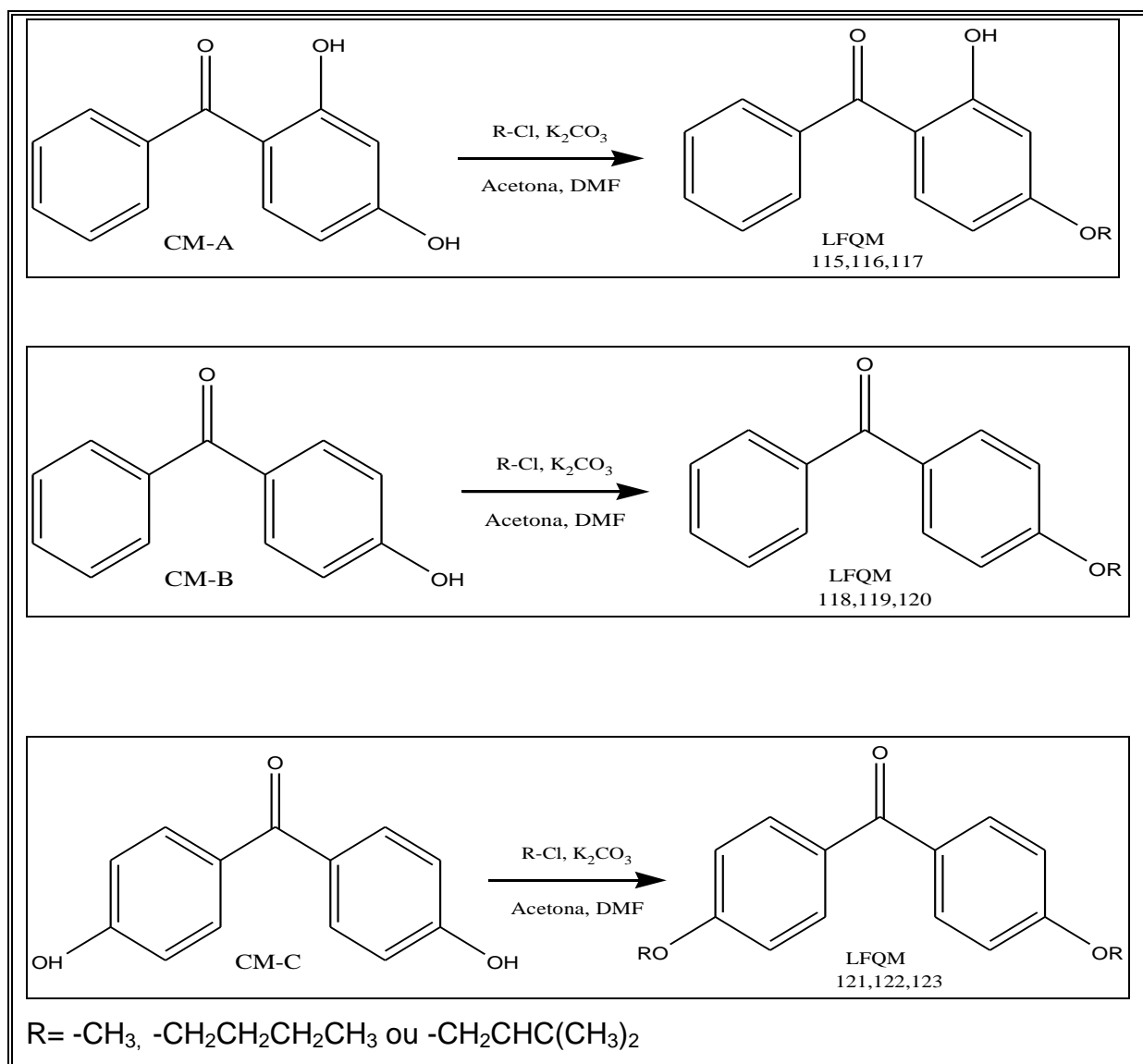


Figura 12. Representação esquemática das reações de alquilação propostas a partir de CM-A, CM-B e CM-C para obtenção dos derivados LFQM-115, LFQM-116, LFQM-117, LFQM-118, LFQM-119, LFQM-120, LFQM-121, LFQM-122 e LFQM-123.

Fonte: MACIEL-REZENDE, 2012.

## 4.2 Parasitos

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269) foram cultivadas em meio Schneider (SIGMA®) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina (10000 UI/mL)/estreptamicina (10,0 mg/mL), a 24°C em estufa BOD.

### 4.3 Células de Mamíferos e Animais de Experimentação

Camundongos Swiss foram obtidos do biotério de Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Camundongos Swiss fêmeas foram utilizados para obtenção de macrófagos peritoneais murinos. O uso de animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais conforme n.º registro 351/2011 (Anexo 1).

Macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal dos animais por meio de lavagem com solução salina (PBS). Macrófagos foram cultivados em meio RPMI-1640 (SIGMA®), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina (10000 UI/mL)/estreptamicina (10,0 mg/mL) e foram mantidos à temperatura de 37°C em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.4 Avaliação da Atividade Antipromastigota das Benzofenonas

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram mantidas em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa a 25°C. Os testes procederam-se transferindo promastigotas à razão de  $1 \times 10^6$  células/mL para placas de 24 poços, onde então foram adicionadas as benzofenonas (CM-A, CM-B, CM-C e LFQM-116 à LFQM-123) solubilizadas em DMSO (SIGMA®). As concentrações (no poço) utilizadas foram 0,10; 1,00; 5,00; 10,00; 20,00 e 40,00 µg/mL. O DMSO foi usado como controle e Anfotericina B (SIGMA®) foi utilizada como medicamento de referência. Após 72 horas de incubação, os protozoários foram contados em câmara de Neubauer, os ensaios realizados em triplicata e em três ocasiões diferentes. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle. As concentrações de inibição de 50% do crescimento (IC<sub>50-PRO</sub>) de promastigotas foram determinadas por análise de regressão dos dados obtidos (PEREIRA, 2010).

#### 4.5 Avaliação da Citotoxicidade a Macrófagos Peritoneais Murinos das Benzofenonas

Para avaliação da citotoxicidade, foram utilizados macrófagos peritoneais murinos mantidos em meio RPMI-1640 a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, dispostos em placas de 24 poços na razão de 8x10<sup>5</sup> células/poço. Adicionaram-se as substâncias (CM-A, CM-B, CM-C e LFQM-116 à LFQM-123) a serem avaliadas, sendo as concentrações (no poço) utilizadas: 1,00; 5,00; 10,00; 20,00; 40,00; 80,00 e 160,00 µg/mL. Após adição destas os macrófagos foram incubados por 72 horas. Após este período adicionou-se 50 µL de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo) a cada poço. Foi necessária nova incubação por 4 horas, para que então as células pudessem ser lisadas com DMSO e avaliadas em espectrofotômetro a 570 nm (Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550). A densidade óptica obtida foi então convertida à porcentagem de inibição usando a equação (1), para que então por análise de regressão dos dados pudesse ser determinada a concentração citotóxica a 50% dos macrófagos (CC<sub>50</sub>) (PEREIRA, 2010).

Equação (1):

$$\%inibição = \left( \frac{DO_{controle} - DO_{benzofenona}}{DO_{controle}} \right) \times 100$$

DMSO foi usado como controle e a Anfotericina B foi utilizada como medicamento de referência. Os ensaios foram realizados em triplicata e em três ocasiões diferentes.

#### 4.6 Avaliação da Atividade Antiamastigota dos Derivados Benzofenônicos

Para avaliação da atividade leishmanicida em amastigotas, foram utilizados macrófagos peritoneais murinos, mantidos em meio RPMI-1640 a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em placas de 24 poços. Após 24h, estas células foram infectadas com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na fase estacionária de crescimento na razão de 10:1. No dia seguinte à infecção, a cada poço foram adicionados os derivados (LFQM-116 à LFQM-123) em várias concentrações (0,10; 1,00; 5,00; 10,00; 20,00 e 40,00 µg/mL – concentração no poço) e incubados por 72 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, quando então foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa (MERCK®) a 10% para posterior análise por microscopia óptica. A porcentagem de células infectadas foi levada em consideração para a ilustração dos resultados, uma vez que estes expressos como a concentração inibitória de 50% da taxa de infecção (IC<sub>50-AMA</sub>). O fármaco de referência utilizado neste ensaio foi Anfotericina B (PEREIRA, 2010). Os ensaios foram realizados em triplicata e em três ocasiões diferentes.

Para avaliar o efeito dos compostos sobre as formas intracelulares de *Leishmania* parâmetros como número de amastigotas/macrófago e número de macrófagos infectados também foram analisados.

#### 4.7 Determinação do Fator de Segurança (FS)

O fator de segurança (FS) é a razão entre CC<sub>50</sub> e IC<sub>50-AMA</sub>. Portanto, para determinação do mesmo utilizou-se equação (2), onde CC<sub>50</sub> representa a concentração citotóxica para 50% das células avaliadas no teste de citotoxicidade e IC<sub>50-AMA</sub> representa a concentração inibitória para 50% das células avaliadas no teste de atividade dos compostos, em formas amastigotas, considerando-se a mesma substância (PEREIRA, 2010).

Equação (2):

$$FS = \frac{CC_{50}}{IC_{50}}$$

#### 4.8 Avaliação da Lipofilicidade Relativa Octanol/Água (QlogP)

Valores de lipofilicidade foram estimados através da determinação teórica do QlogP (octanol/água) usando o programa QikProp. Este software calcula os valores de QlogP a partir de equações de regressão utilizando os dados experimentais e os descritores moleculares físicos (contagem de ligação de hidrogênio, tipos de átomos e cargas, conta de rotor, etc) através de simulações mecânicas estatísticas de Monte Carlo.

#### 4.9 Dosagem de Óxido Nítrico

Os sobrenadantes da cultura de macrófagos (MØ) peritoniais de camundongos, infectados com *L. (L.) amazonensis* e em contato com as substâncias testadas (LFQM-116, LFQM-117, LFQM-119, LFQM-120 e LFQM-121), foram coletados após 48 horas e a produção de NO foi determinada pelo reagente de Griess. A avaliação das concentrações de NO foi realizada pela medida de nitritos ( $\text{NO}^{-2}$ ) em sobrenadantes de cultura (BENJAMI; VALLACE, 1994; MOSHAGE, 1995; MOSHAGE, 1998). Foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes de cultura e 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess em placas de 96 poços, em duplicata e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir foi determinada a absorbância a 540 nm em leitor de ELISA (GREEN, 1982). Os resultados expressos em  $\mu\text{M}$  foram determinados após a extrapolação de valores obtidos de uma curva padrão realizada com nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) nas concentrações de 0,78 a 100  $\mu\text{M}$  para cada placa. O reagente de Griess foi preparado na hora do uso, homogeneizando partes iguais da solução A - sulfanilamida 1% em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2,5% (MERCK®) e da solução B - naftilenodiamina 0,1% em água bidestilada (GREEN, 1982).

Nesse ensaio foi utilizado como controle negativo apenas macrófagos, dos quais não se esperava um aumento na produção de NO. O controle positivo utilizado foi macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* com a adição de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de

lipopolissacarídeo (LPS). Adicionalmente macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* foram também utilizados como controle. Os ensaios foram realizados em triplicata e em três ocasiões diferentes.

#### 4.10 Docking Molecular

As estruturas cristalinas das enzimas apresentados na Tabela 6 foram obtidas do banco de dados PDB (*Protein Data Bank*) (BERMAN, 2000) como molde para o *docking* molecular com as cinco estruturas de benzofenonas (LFQM-116, LFQM-117, LFQM-119, LFQM-120 e LFQM-121). Dentre as estruturas cristalográficas que contêm moléculas de água e/ou ligantes foram removidas das conformações para a realização das simulações de *docking*. As estruturas químicas das benzofenonas foram construídas pelo programa Chemskech 10.0 da ACDLabs (Acd/Chemskech) e cálculos *ab initio* foram realizados com programa Siesta 3.1 (SOLER, 2002) para otimização da geometria e minimização da energia das estruturas.

Tabela 6. Código PDB das enzimas com suas respectivas resoluções e pontos de grid.

Enzima	Código PDB	Resolução (Å)	Pontos de <i>grid</i> (Å)
Papaína	1CVZ <sup>[1]</sup>	1,70	22 x 28 x 26
Cruzaína	1ME3 <sup>[2]</sup>	1,20	18 x 18 x 18
Tripsina	1S5S <sup>[3]</sup>	1,40	16 x 14 x 12
Oligopeptidase B	2XE4 <sup>[4]</sup>	1,65	40 x 40 x 40
Ornitina Descarboxilase	1F3T <sup>[5]</sup>	2,00	24 x 24 x 24
Tripanotiona redutase	2JK6 <sup>[6]</sup>	2,95	22 x 28 x 26

[1] TSUGE, 1999.

[2] HUANG; BRINEN; ELLMAN, 2003.

[3] TRANSUE, 2004.

[4] McLUSKEY, 2010.

[5] JACKSON, 2000.

[6] BAIOTTO, 2009.

Para as simulações de *docking* rígido-flexível as estruturas químicas das enzimas e ligantes foram preparadas com a ferramenta AutoDockTools. As enzimas foram primeiramente modificadas por meio da adição de hidrogênios polares e os ligantes foram liberados com liberdade de giro para os ângulos de torção a fim de manter a flexibilidade das moléculas. Além disso, os mapas de *grid* da energia de interação para os receptores foram definidos com 1,0 Å de espaçamento de *grid* os pontos de *grid* formando uma caixa (Tabela 6) nos sítios de interação dos receptores. Com as moléculas preparadas, os processos de docking foram realizados pelo programa AutoDock Vina (TROTTE; OLSON, 2010). Os melhores resultados de cada cálculo de *docking* foram agrupados com base na raiz de desvio médio quadrado (RMSD – *Root Mean Square Deviation*) e na conformação de menor energia de interação calculada a partir da função *score* contida no algoritmo do programa AutoDock Vina.

#### 4.11 Avaliação da Inibição Enzimática de Proteases

Os derivados benzofenônicos (LFQM-116, LFQM-117, LFQM-119, LFQM-120 e LFQM-121), com concentrações variando de 1 a 200 µM, foram incubados durante aproximadamente 1 minuto com tripsina (tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) contendo 10 mM CaCl<sub>2</sub>) e com oligopeptidase B de *T. cruzi* (tampão Tris-HCl a 50 mM (pH 8,0) contendo 100 mM NaCl). A papaína (1 mg/mL) e a cruzaína (1.7 µM) foram pré-ativadas com 5 mM de DTT por 5 minutos cada e ensaiadas respectivamente em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8) contendo 10 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,2) contendo 400 mM de NaCl com 10 mM de EDTA. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados a 37°C.

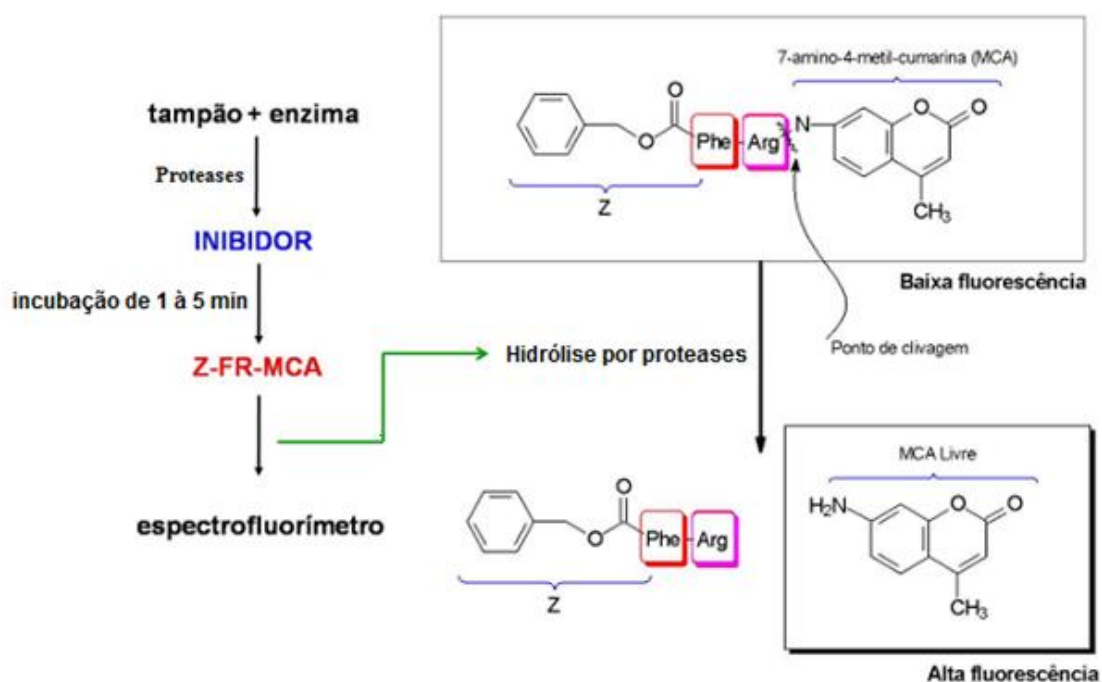


Figura 13. Esquema geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA, mostrando o ponto de clivagem pelas proteases.

Fonte: PEREIRA, 2010.

A dosagem da atividade enzimática das quatro enzimas foi iniciada pela adição de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  do substrato Z-FR-MCA na reação e as atividades proteolíticas remanescentes foram monitoradas num tempo total de 600 segundos. Os resultados coletados foram tratados no programa Grafit® software (Erithacus Software, Horley, Surrey, U.K.) versão 5.0. Adotou-se o modelo de obtenção dos valores de  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), que pode ser definido como a concentração de inibidor necessária para inibir 50% da atividade enzimática no ensaio, conforme demonstrado na equação (3), onde se assume que o valor de  $y$  (atividade enzimática remanescente) diminua gradativamente conforme aumenta o valor de  $x$  (concentração de inibidor).

Equação (3):

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{\text{IC}_{50}}\right)^s}$$

#### 4.12 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando regressão não linear para a obtenção dos valores de  $IC_{50-PRO}$  e  $CC_{50}$ , seguida pela análise do teste de Tukey, em que tais valores obtidos para os derivados foram comparados ao composto de partida utilizado. O  $IC_{50-AMA}$  foi obtido também usando regressão não linear, seguida pela análise do teste de Tukey, nesse caso os valores dos de  $IC_{50-AMA}$  dos derivados foram comparados entre si, além de serem comparados com Anfotericina B. Na dosagem de NO, os valores foram obtidos utilizando-se curva padrão seguidos pela análise do teste de Tukey e foram comparados ao controle positivo. Diferenças foram significantes quando o p valor foi menor que 0,05.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Atividade Antipromastigota

A atividade antipromastigota dos derivados supracitados, bem como de seus precursores foi testada em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, os valores de IC<sub>50-PRO</sub> em os parasitos estão apresentados em µg/mL na Tabela 7. Anfotericina B foi utilizada com fármaco de referência exibindo IC<sub>50-PRO</sub> = 4,70 µg/mL.

De uma maneira geral todos os derivados mostraram-se mais efetivos que seus precursores, evidenciando um ganho na atividade leishmanicida com as modificações químicas feitas, uma vez que os valores de IC<sub>50-PRO</sub> dos derivados diferem estatisticamente de seus respectivos precursores.

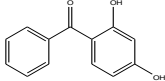
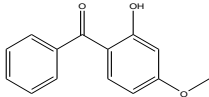
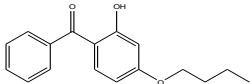
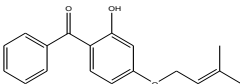
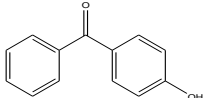
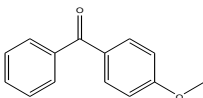
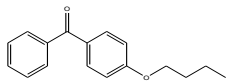
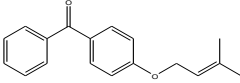
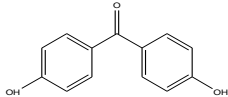
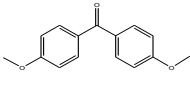
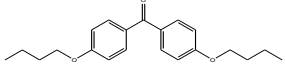
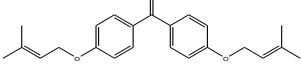
### 5.2 Atividade Citotóxica

A avaliação do potencial citotóxico a macrófagos peritoneais murinos procedeu-se através do tratamento destas células com os compostos precursores e derivados em diferentes concentrações (variando de 1,00 a 160,00 µg/mL no poço). Os valores de CC<sub>50</sub> em tais células estão apresentados em µg/mL na Tabela 8.

O fármaco utilizado como referência nos testes foi Anfotericina B exibindo CC<sub>50</sub> = 25,00 µg/mL e alguns derivados (LFQM-115, LFQM-118 e LFQM-119) exibiram valores de CC<sub>50</sub> próximos ao deste medicamento (CC<sub>50</sub> de 24,60; 28,00 e 28,90 µg/mL, respectivamente).

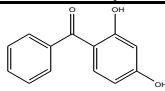
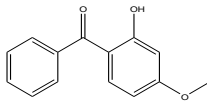
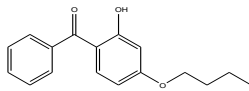
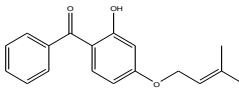
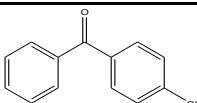
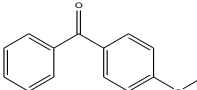
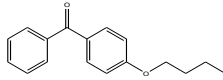
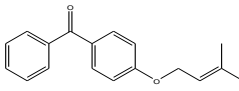
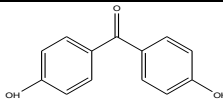
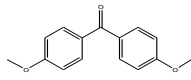
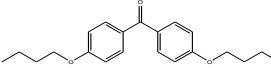
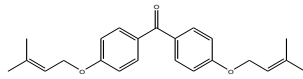
Alguns derivados exibiram valores de CC<sub>50</sub> estatisticamente iguais ao exibido por seus precursores, mostrando-se pouco citotóxicos, como os derivados LFQM-117, LFQM-120, LFQM-121, LFQM-122 e LFQM-123. As substâncias que não se mostraram citotóxicas até a maior concentração utilizada no tratamento das células, admitiram um valor de CC<sub>50</sub> > 160,00 µg/mL.

Tabela 7. Estrutura química das benzofenonas precursoras e seus derivados LFQM e atividade antipromastigota (IC<sub>50-PRO</sub>).

Composto	Estrutura química	IC <sub>50-PRO</sub> (µg/mL)
CM-A		29,00 ± 6,66
LFQM-115		4,90 ± 0,72*
LFQM-116		9,80 ± 1,83*
LFQM-117		7,05 ± 0,44*
CM-B		40,92 ± 1,67
LFQM-118		5,05 ± 0,21*
LFQM-119		8,56 ± 0,18*
LFQM-120		7,82 ± 0,50*
CM-C		121,36 ± 6,33
LFQM-121		21,30 ± 0,70*
LFQM-122		23,80 ± 8,90*
LFQM-123		5,94 ± 1,31*
<b>Anfotericina B</b>		<b>4,70</b>

\* Valores marcados com asterisco significam que o derivado difere estatisticamente de seu composto de partida ao nível de significância de 5%.

Tabela 8. Estrutura química das benzofenonas precursoras e seus derivados LFQM e atividade citotóxica ( $CC_{50}$ ) a macrófagos peritoneais murinos.

Composto	Estrutura química	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
CM-A		> 160,00
LFQM-115		24,60 $\pm$ 1,94*
LFQM-116		40,60 $\pm$ 1,85*
LFQM-117		140,06 $\pm$ 2,80
CM-B		> 160,00
LFQM-118		28,00 $\pm$ 2,08*
LFQM-119		28,90 $\pm$ 1,50*
LFQM-120		87,10 $\pm$ 2,52
CM-C		> 160,00
LFQM-121		116,20 $\pm$ 2,18*
LFQM-122		> 160,00
LFQM-123		> 160,00
<b>Anfotericina B</b>		<b>25,00</b>

\* valores marcados com asterisco significam que o derivado difere estatisticamente de seu composto de partida ao nível de significância de 5%.

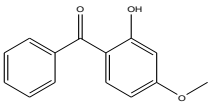
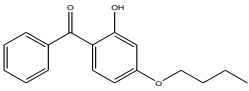
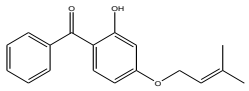
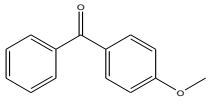
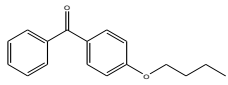
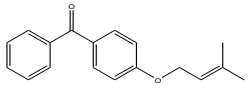
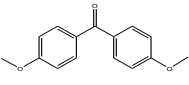
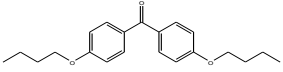
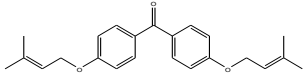
### 5.3 Atividade Antiamastigota

Para a atividade antiamastigota, os macrófagos infectados foram tratados com os derivados benzofenônicos, que mostraram melhor atividade em formas promastigotas quando comparados aos seus compostos de partida. Estas células foram eficientemente infectadas com *L. (L.) amazonensis* obtendo-se quase 100% de infecção nos grupos controle.

Os valores de  $IC_{50-AMA}$  estão apresentados em  $\mu\text{g/mL}$  na Tabela 9. Os derivados LFQM-116, LFQM-117, LFQM-119, LFQM-120 e LFQM-121 exibiram os melhores resultados nas formas intracelulares. Vale ressaltar que o valor de  $IC_{50-AMA}$  de LFQM-120 ( $IC_{50-AMA} = 7,30 \mu\text{g/mL}$ ) foi estatisticamente igual ao mostrado pelo fármaco de referência ( $IC_{50-AMA} = 5,68 \mu\text{g/mL}$ ).

O número de amastigotas por macrófagos foi utilizado como parâmetro qualitativo, constatando-se que na maioria dos casos havia apenas uma amastigota por vacúolo parasitóforo (Figura 14). De maneira geral as substâncias que possibilitaram menor porcentagem de infecção, também renderam menor número de amastigotas por macrófago de forma dose-dependente.

Tabela 9. Estrutura química dos derivados LFQM e atividade anti-amastigota (IC<sub>50-AMA</sub>).

Benzofenona de Partida	Derivados LFQM	Estrutura química	IC <sub>50-AMA</sub> (µg/mL)
CM-A	115		10,19 ± 1,27 <sup>*,a</sup>
	116		11,78 ± 0,94 <sup>*,a</sup>
	117		21,00 ± 0,95 <sup>*,b</sup>
CM-B	118		> 40,00 <sup>*,a</sup>
	119		14,90 ± 1,34 <sup>*,b</sup>
	120		7,30 ± 0,92 <sup>c</sup>
CM-C	121		16,00 ± 0,58 <sup>*,a</sup>
	122		> 40,00 <sup>*,b</sup>
	123		> 40,00 <sup>*,b</sup>
Referência	Anfotericina B		5,68

\* Valores marcados com asterisco diferem estatisticamente do fármaco de referência pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si, dentro de cada grupo, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

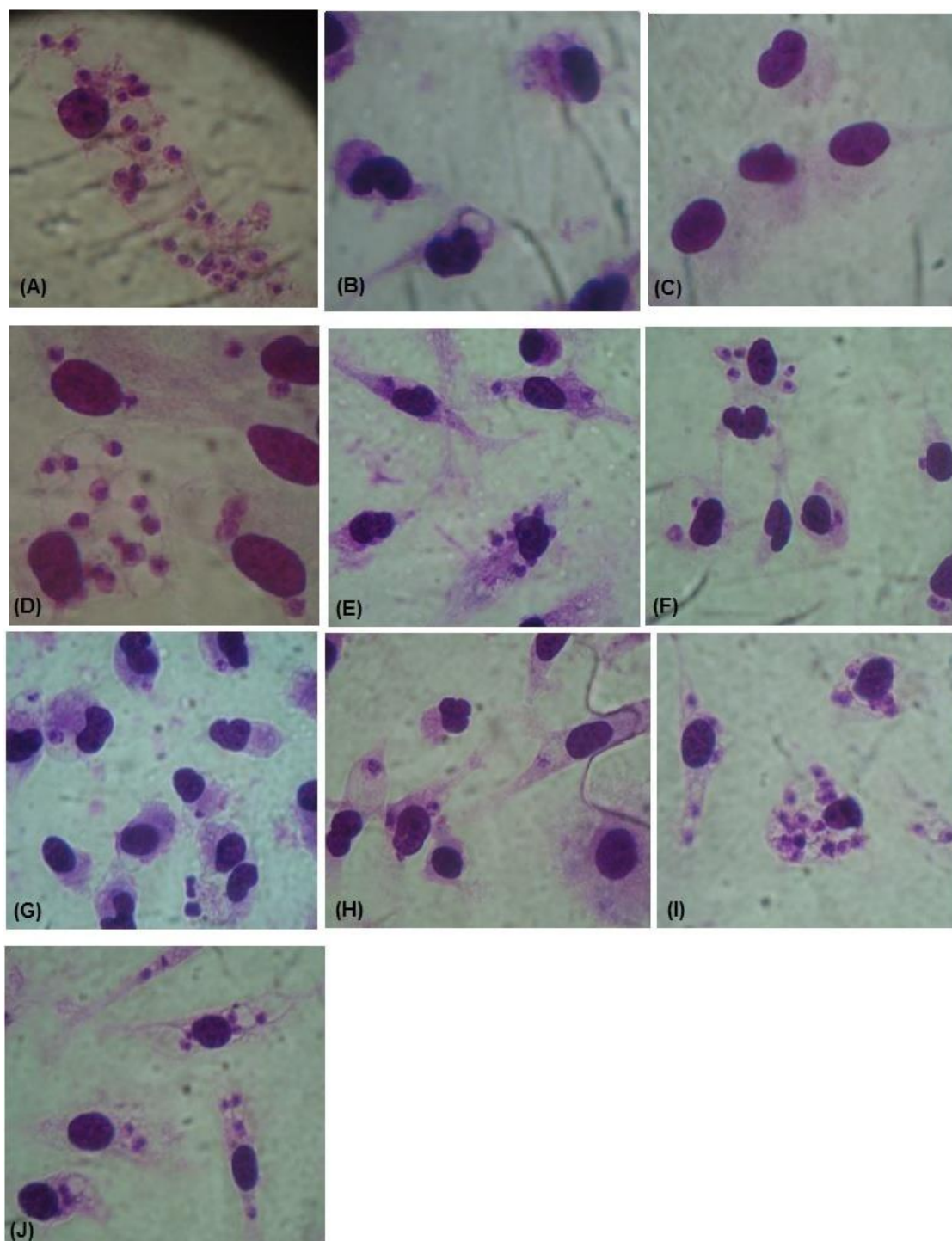


Figura 14. Macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com derivados na concentração máxima usada (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Tratamento em (a) DMSO apenas, (b) LFQM-115, (c) LFQM-116, (d) LFQM-117, (e) LFQM-118, (f) LFQM-119, (g) LFQM-120, (h) LFQM-121, (i) LFQM-122, e (j) LFQM-123. Aumento 100X.

#### 5.4 Determinação do Fator de Segurança (FS)

O fator de segurança (Tabela 10) é um importante parâmetro para garantir que os compostos possam atingir o alvo (*Leishmania* intracelular) causando efeitos colaterais mínimos nas células hospedeiras. Valores maiores ou iguais a 1,00 são considerados satisfatórios (PEREIRA, 2010).

Dentre os derivados, apenas o LFQM-118 mostrou um FS insatisfatório. Os derivados LFQM-117, LFQM-120 e LFQM-121 exibiram FS maior que o apresentado pela Anfotericina B.

Tabela 10. Atividade citotóxica (CC<sub>50</sub>), atividade anti-amastigota (IC<sub>50-AMA</sub>) e fator de segurança (FS) dos derivados LFQM e Anfotericina B.

Derivados LFQM	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>50-AMA</sub> (µg/mL)	FS
115	24,60	10,19	2,41
116	40,60	11,78	3,45
117	140,06	21,00	6,67
118	28,00	40,00	0,70
119	28,90	14,90	1,94
120	87,10	7,30	11,93
121	116,20	16,00	7,26
122	160,00	40,00	4,00
123	160,00	40,00	4,00
Anfotericina B	25,00	5,68	4,40

### 5.5 Avaliação da Lipofilicidade Relativa Octanol/Água (QlogP)

A lipofilicidade relativa é uma importante propriedade muitas vezes relacionada com a atividade biológica de compostos, uma vez que na maioria dos casos quanto mais lipofílico um composto, maior a facilidade de transposição de membranas biológicas. Além disso, tal propriedade pode ajudar a entender os possíveis mecanismos de ação dos compostos (Tabela 11). Esta propriedade foi descrita por Lipinski quanto à sua importância na farmacocinética, absorção e permeabilidade, de candidatos a fármacos.

Tabela 11. Valores de IC<sub>50-PRO</sub>, e IC<sub>50-AMA</sub> correlacionados com logP calculado (QlogP) obtidos pelo software QikProp para os derivados LFQM.

Derivados LFQM	IC <sub>50-PRO</sub> (µg/mL)	IC <sub>50-AMA</sub> (µg/mL)	QlogP
CM-A	29,00 ± 6,66	nd	3,46
115	4,90 ± 0,72	10,19 ± 1,27	3,79
116	9,80 ± 1,83	11,78 ± 0,94	5,04
117	7,05 ± 0,44	21,00 ± 0,95	5,29
CM-B	40,92 ± 1,67	nd	3,07
118	5,05 ± 0,21	40,00	3,40
119	8,56 ± 0,18	14,90 ± 1,34	4,60
120	7,82 ± 0,50	7,30 ± 0,92	4,73
CM-C	121,36 ± 6,33	nd	2,71
121	21,30 ± 0,70	16,00 ± 0,58	3,57
122	23,80 ± 8,90	40,00	5,71
123	5,94 ± 1,31	40,00	6,21
Anfotericina B	25,00	5,68	4,40

nd significa não determinado.

A atividade dos derivados benzofenônicos no protozoário *Leishmania* pode ser correlacionada com os valores de QlogP (Tabela 11).

Quando foi analisado conjuntamente o QlogP com a atividade antipromastigota (Figura 15) verifica-se que o aumento da lipofilicidade em consequência das alquilações fornecem perfis de atividade mais promissores que as benzofenonas precursoras. Entretanto, uma análise correlacionando o QlogP com a atividade antiamestigota (Figura 16) constata-se que há um valor ótimo de QlogP para o qual são observadas as atividades mais promissoras nas formas intracelulares do parasito, ou seja, há uma hidrofobicidade ótima dos compostos de modo que seja possível transpor membranas biológicas e atingir o protozoário.

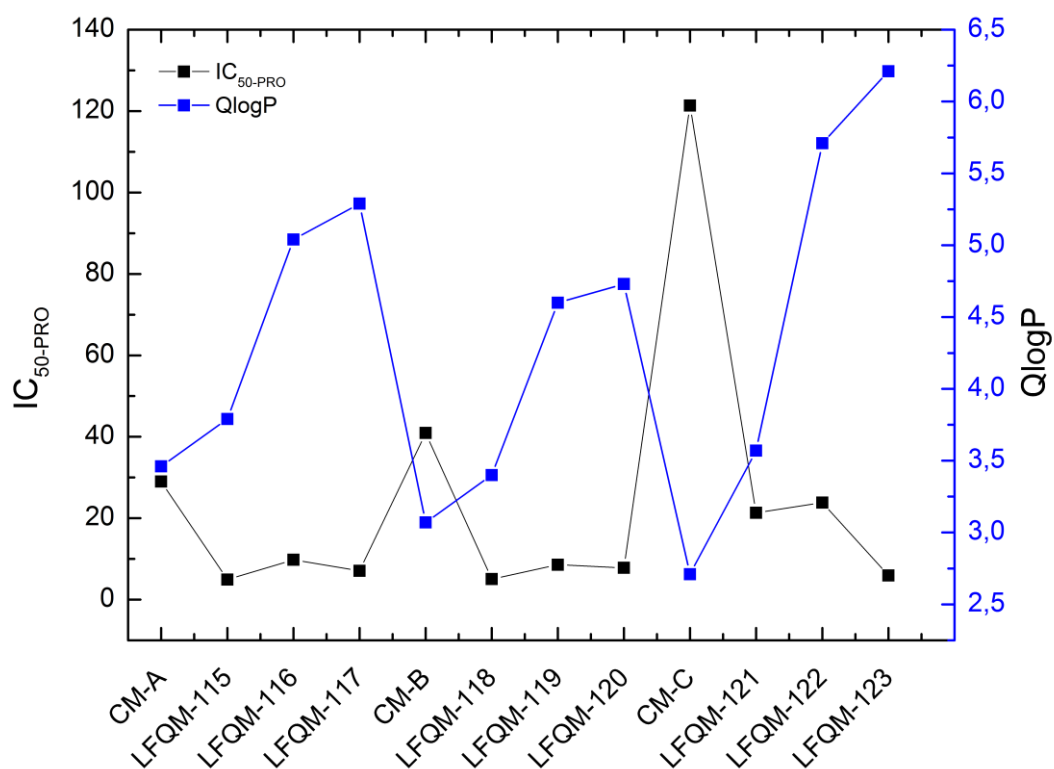


Figura 15. Correlação entre logP calculado (QLogP) e atividade antipromastigota ( $\log IC_{50-PRO}$ ).

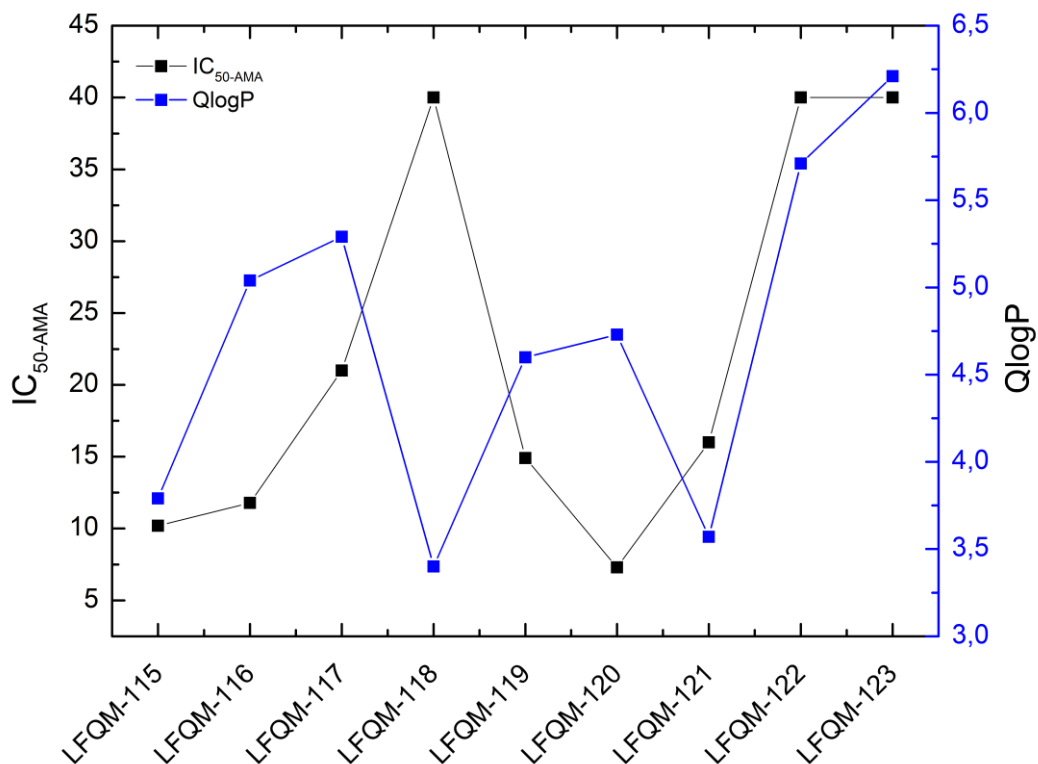


Figura 16. Correlação entre logP calculado (QLogP) e atividade anti-amastigota ( $\log IC_{50-AMA}$ ).

### 5.6 Dosagem de Óxido Nítrico em Sobrenadantes de Culturas de Macrófagos Peritoneais Murinos

Os derivados benzofenônicos e DMSO (utilizado para solubilizar os derivados) foram comparados com os controles: macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* estimulados com LPS, com o intuito de avaliar a produção de NO pelos mesmos.

A produção de NO é um importante parâmetro que nos permite avaliar se os compostos auxiliam para desencadear uma resposta imune com perfil anti-inflamatório ou pró-inflamatório mais acentuado.

Os derivados LFQM-119, e LFQM-120 estimularam macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* a produzirem NO, porém apenas o derivado LFQM-120 estimulou a produção equivalente ao proporcionado pelo LPS (Figura 17).

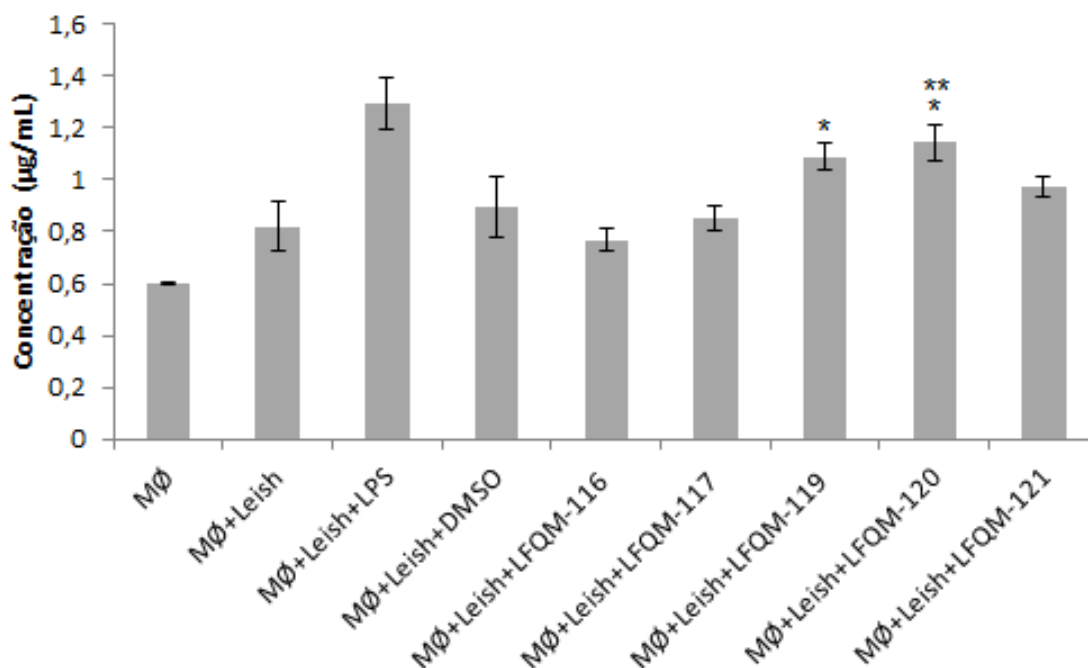


Figura 17. Dosagem de NO avaliada pela concentração de nitritos ( $\mu\text{g/mL}$ ) nos sobrenadantes de culturas de células tratadas com derivados LFQM à  $10 \mu\text{g/mL}$ . Como controle positivo foi utilizado LPS à  $10 \mu\text{g/mL}$ .

\*compostos estatisticamente iguais ao controle macrófagos infectados com *Leishmania* ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

\*\*compostos estatisticamente iguais ao controle macrófagos infectados com *Leishmania* e estimulados com LPS ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

## 5.7 Docking Molecular

A análise por docking molecular foi realizada com enzimas representantes de cisteíno proteases (papaína e cruzaína), serino proteases (tripsina e oligopeptidase B) e enzimas da biossíntese das poliaminas (ornitina descarboxilase e tripanotona redutase). O objetivo da utilização desta ferramenta foi prever a

interação de alguns derivados com enzimas, além de possibilitar um estudo comparativo com os dados obtidos experimentalmente.

A interação de hidrogênio é um parâmetro importante em processos biológicos, sendo assim foram extraídas do software informações a respeito de tal “ligação”, como por exemplo, os átomos do ligante e os átomos da enzima envolvidos nesta interação, e ainda a energia e o comprimento desta interação (Tabelas de 12 à 17).

Outro importante parâmetro que pode ser obtido com o *docking* molecular é predição do  $\Delta G$  do sistema (Tabelas de 12 à 17). A função *score* do Autodock Vina tem uma forma de equação, a qual combina um tipo de força de campo e atributos empiricamente baseados, onde forças de Van-der-Waals, interações de hidrogênio e interações eletrostáticas são ponderadas pelos fatores de ponderação empíricos ( $\Delta G$ 's) (VENKATESAN; SHUKLA; DUBEY, 2010).

Adicionalmente figuras representativas das melhores interações enzima-ligante serão também mostradas (Figuras de 18 à 24). A fim de facilitar a visualização, os sítios de interação foram destacados, e os resíduos da proteína envolvidos foram marcados.

Nas interações com a papaína (Tabela 12) o principal resíduo do sítio ativo (Cys25) não esteve presente nas interações de hidrogênio. Porém nas interações com LFQM-117 e LFQM-121 outro resíduo (His159) do sítio ativo esteve presente. Dentre estes derivados, com os quais resíduos do sítio ativo da enzima estiveram envolvidos em interações de hidrogênio, o LFQM-117 mostrou-se mais promissor, uma vez que outra interação de hidrogênio ocorreu com resíduos da enzima e poderia ser constatada uma melhor estabilização do complexo ligante-receptor (Figura 18).

Por outro lado, nas interações com a cruzaina (Tabela 13) o resíduo Cys25 esteve presente nas interações com LFQM-116 e LFQM-117, além de outro resíduo do sítio ativo (His159). O derivado LFQM-119 não exibiu interações de hidrogênio, porém outras interações intermoleculares que não foram destacadas aqui podem existir. O LFQM-116 os comprimentos das interações de hidrogênio foram ligeiramente menores na interação da enzima com o derivado LFQM-116 do que com LFQM-117, resultando em interações um pouco mais fortes (Figura 19).

Tabela 12. Resultados das interações hidrogênio entre papaína e derivados LFQM, obtidos com o docking molecular utilizando-se o AutoDock Vina.

Derivado LFQM	$\Delta G$	Átomo (ligante)	Átomo (proteína)	Energia da interação de hidrogênio	Comprimento da interação de hidrogênio (Å)
116	- 6,3	O (7)	O (Gly20)	- 1,86	3,23
		O (19)	N (Trp177)	- 2,39	2,81
		O (19)	N (Gln19)	- 2,31	3,14
117	- 6,5	O (14)	N (His159)	- 1,34	3,11
		O (20)	N (Gln19)	- 1,50	3,30
119	- 5,9	O (7)	O (Gly20)	- 1,62	3,28
120	- 6,7	*	*	*	*
121	- 5,9	O (16)	N (His159)	- 1,22	2,98

\* Não houve interação de hidrogênio.

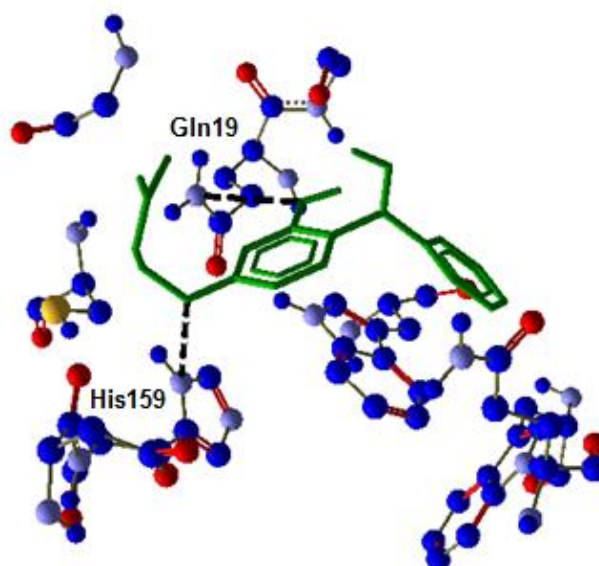


Figura 18. Interação papaína e LFQM-117. Átomos de carbono estão representados em azul, de nitrogênio em lilás, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo. Ligante representado em verde. Interações de hidrogênio estão representadas em preto, em destaque os resíduos da proteína envolvidos em tal interação.

Tabela 13. Resultados das interações hidrogênio entre cruzaína e derivados LFQM, obtidos com o docking molecular utilizando-se o AutoDock Vina.

Derivado LFQM	$\Delta G$	Átomo (ligante)	Átomo (proteína)	Energia da ligação de hidrogênio	Comprimento da interação de hidrogênio (Å)
116	- 6,3	O (7)	N (His159)	- 0,89	3,08
		O (19)	S (Cys25)	- 0,43	3,51
		O (19)	N (Gly160)	- 0,15	3,18
117	- 6,3	O (7)	N (His159)	- 0,24	3,56
		O (20)	S (Cys25)	- 0,11	3,18
		O (20)	N (Gly160)	- 0,61	3,19
119	- 6,2	*	*	*	*
120	- 6,3	O (14)	N (Gly66)	- 0,05	3,55
121	- 6,1	O (9)	N (His159)	- 0,81	3,01

\* Não houve interação de hidrogênio.

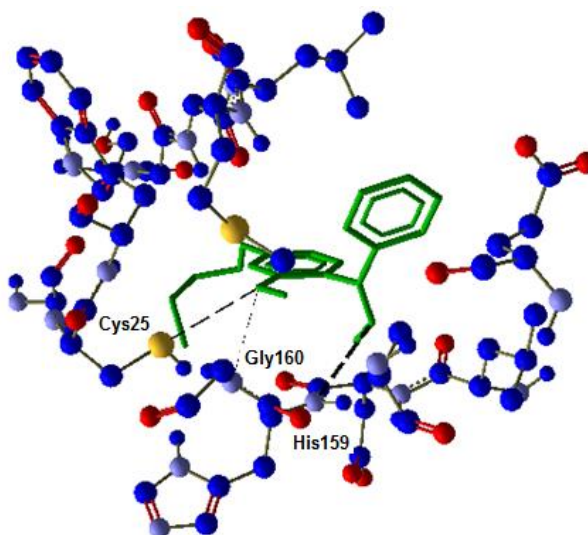


Figura 19. Interação cruzaína e LFQM-116. Átomos de carbono estão representados em azul, de nitrogênio em lilás, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo. Ligante representado em verde. Interações de hidrogênio estão representadas em preto, em destaque os resíduos da proteína envolvidos em tal interação.

Em relação às interações entre os derivados benzofenônicos e tripsina (Tabela 14) verificou-se que os resíduos catalíticos Ser195 e His57 estiveram presentes nas interações de 3 dos 5 derivados usados na realização do docking molecular (LFQM-116, LFQM-117 e LFQM-121). Na interação desta enzima com o derivado LFQM-116 e LFQM-117 verificou-se maior número de interações de hidrogênio e por isso uma estabilização mais forte entre estes seja mais provável (Figura 20 e Figura 21).

Tabela 14. Resultados das interações hidrogênio entre tripsina e derivados LFQM, obtidos com o docking molecular utilizando-se o AutoDock Vina.

Derivado LFQM	$\Delta G$	Átomo (ligante)	Átomo (proteína)	Energia da ligação de hidrogênio	Comprimento da interação de hidrogênio (Å)
116	- 6,2	O (7)	O (Ser195)	- 2,50	2,81
		O (19)	N (His57)	- 2,50	2,83
		O (19)	O (Ser195)	- 2,50	2,99
117	- 6,3	O (7)	O (Ser195)	- 0,28	3,54
		O (20)	O (Ser214)	- 1,43	3,32
		O (20)	N (His57)	- 2,50	2,84
		O (20)	O (Ser195)	- 2,50	2,79
119	- 6,0	O (7)	O (Ser195)	- 2,50	3,08
120	- 6,4	O (7)	O (Ser195)	- 2,50	3,08
121	- 6,1	O (6)	O (Ser190)	- 2,00	3,20
		O (9)	N (His57)	- 2,50	3,04
		O (9)	O (Ser195)	- 2,50	3,08

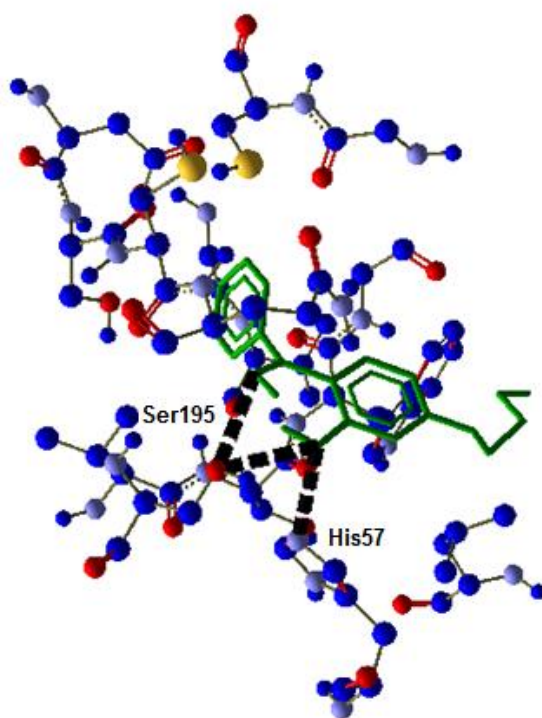


Figura 20. Interação tripsina e LFQM-116. Átomos de carbono estão representados em azul, de nitrogênio em lilás, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo. Ligante representado em verde. Interações de hidrogênio estão representadas em preto, em destaque os resíduos da proteína envolvidos em tal interação.

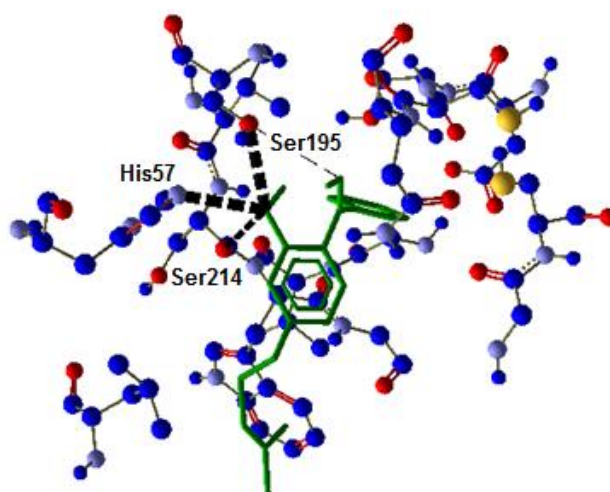


Figura 21. Interação tripsina e LFQM-117. Átomos de carbono estão representados em azul, de nitrogênio em lilás, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo. Ligante representado em verde. Interações de hidrogênio estão representadas em preto, em destaque os resíduos da proteína envolvidos em tal interação.

Nas interações com a oligopeptidase B (Tabela 15) o resíduo de serina, um dos principais resíduos catalíticos, não esteve presente nas interações de hidrogênio. Porém, o resíduo de histidina esteve presente nas interações desta enzima com todos os compostos. A interação com derivado LFQM-117 está destacada na Figura 22.

Tabela 15. Resultados das interações hidrogênio entre oligopeptidase B e derivados LFQM, obtidos com o docking molecular utilizando-se o AutoDock Vina.

Derivado LFQM	$\Delta G$	Átomo (ligante)	Átomo (proteína)	Energia da ligação de hidrogênio	Comprimento da interação de hidrogênio (Å)
116	- 7,6	O (7)	N (His511)	- 2,50	2,98
		O (19)	O (Glu574)	- 2,50	2,77
117	- 8,3	O (7)	N (His511)	- 2,50	3,02
		O (20)	O (Glu574)	- 2,50	2,77
119	- 7,6	O (7)	N (His511)	- 2,50	2,92
120	- 8,2	O (7)	N (His511)	- 2,20	3,03
121	- 7,3	O (9)	N (His511)	- 2,33	2,87
		O (16)	N (Asp504)	- 1,87	3,17

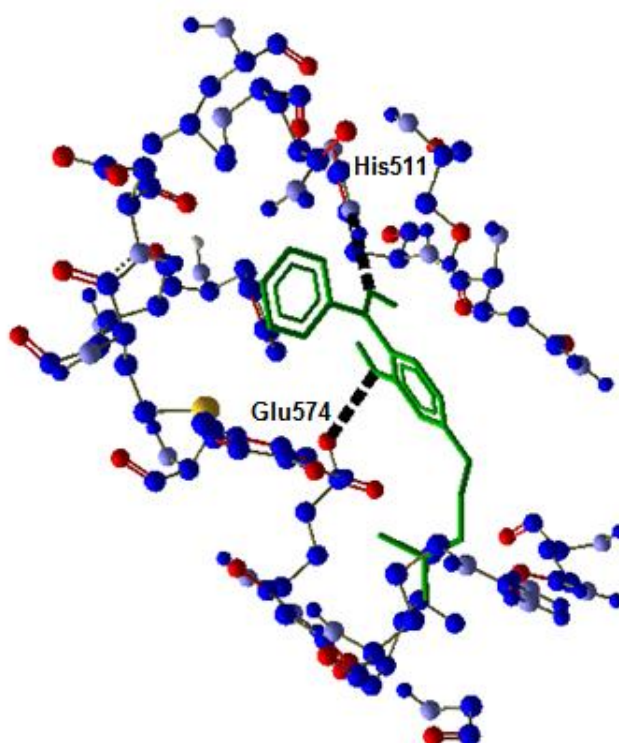


Figura 22. Interação oligopeptidase B e LFQM-117. Átomos de carbono estão representados em azul, de nitrogênio em lilás, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo. Ligante representado em verde. Interações de hidrogênio estão representadas em preto, em destaque os resíduos da proteína envolvidos em tal interação.

No docking com a ornitina descarboxilase (Tabela 16), resíduos importantes como Lys69 e Cys360 não estiveram envolvidos nas interações de hidrogênio verificadas com os ligantes. Porém outros resíduos da enzima estiveram envolvidos e a estabilização do complexo enzima-ligante poderia ser mais forte com o derivado LFQM-117 (Figura 23).

A tripanotona redutase possui alguns importantes resíduos catalíticos Cys52 e Cys57, Tyr198 e Thr335. Com o docking molecular entre esta enzima e os derivados (Tabela 17) verifica-se que interações de hidrogênio com os dois últimos resíduos mencionados puderam ser formadas com LFQM-116, LFQM-117 e LFQM-119. A interação com derivado LFQM-117 está destacada na Figura 24.

Tabela 16. Resultados das interações hidrogênio entre ornitina descarboxilase e derivados LFQM, obtidos com o docking molecular utilizando-se o AutoDock Vina.

Derivado LFQM	$\Delta G$	Átomo (ligante)	Átomo (proteína)	Energia da ligação de hidrogênio	Comprimento da interação de hidrogênio (Å)
116	- 7,4	O (14)	O (Tyr323)	- 2,50	2,91
		O (19)	O (Asp332)	- 2,41	3,12
		O (19)	N (Arg277)	- 0,56	2,96
117	- 7,6	O (7)	O (Ser200)	- 2,50	2,98
		O (20)	N (Gly240)	- 2,28	3,01
		O (20)	N (Thr241)	- 0,94	3,03
		O (20)	O (Thr241)	- 2,50	2,78
119	- 7,5	O (14)	O (Tyr323)	- 2,50	2,89
120	- 7,2	O (7)	N (His197)	- 1,13	3,03
		O (7)	N (Arg154)	- 2,10	3,05
121	- 6,9	O (6)	O (Tyr323)	- 2,50	2,79
		O (16)	N (Gly276)	- 1,60	3,08
		O (16)	N (Gly237)	- 2,50	3,08

Tabela 17. Resultados das interações hidrogênio entre tripanotona redutase e derivados LFQM, obtidos com o docking molecular utilizando-se o AutoDock Vina.

Derivado LFQM	$\Delta G$	Átomo (ligante)	Átomo (proteína)	Energia da ligação de hidrogênio	Comprimento da interação de hidrogênio (Å)
116	- 8,2	O (7)	N (Arg287)	- 1,33	3,34
		O (14)	O (Thr335)	- 2,50	2,80
		O (19)	O (Tyr198)	- 2,50	3,03
117	- 8,7	O (7)	N (Arg287)	- 1,57	3,29
		O (14)	O (Thr335)	- 2,50	2,92
		O (20)	N (Arg287)	- 0,03	3,39
		O (20)	O (Tyr198)	- 2,50	3,09
119	- 7,9	O (7)	N (Arg287)	- 1,73	3,25
		O (14)	O (Thr335)	- 2,50	2,96
120	- 8,4	O (8)	N (Lys60)	- 1,28	3,34
		O (14)	O (Thr335)	- 0,49	3,50
121	- 7,7	O (9)	N (Val36)	- 0,44	3,31

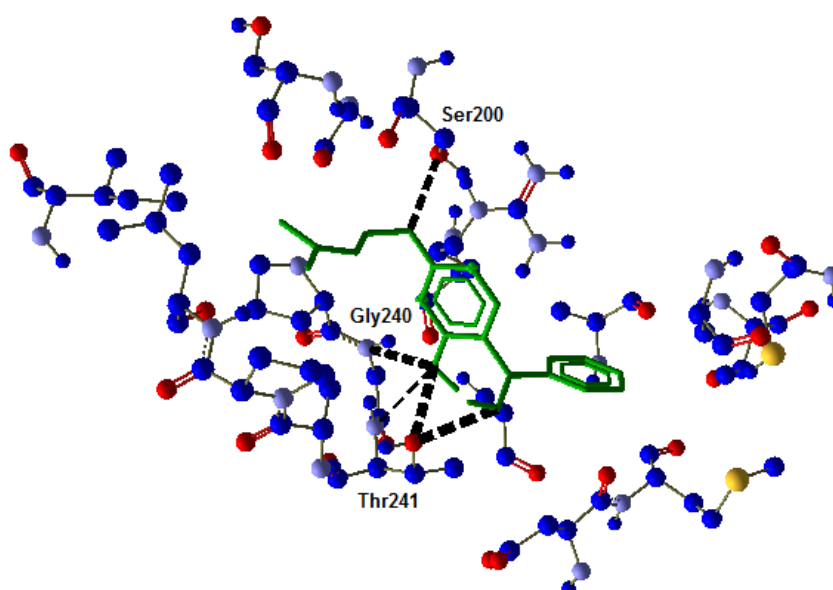


Figura 23. Interação ornitina descarboxilase e LFQM-117. Átomos de carbono estão representados em azul, de nitrogênio em lilás, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo. Ligante representado em verde. Interações de hidrogênio estão representadas em preto, destacando os resíduos da proteína envolvidos em tal interação.

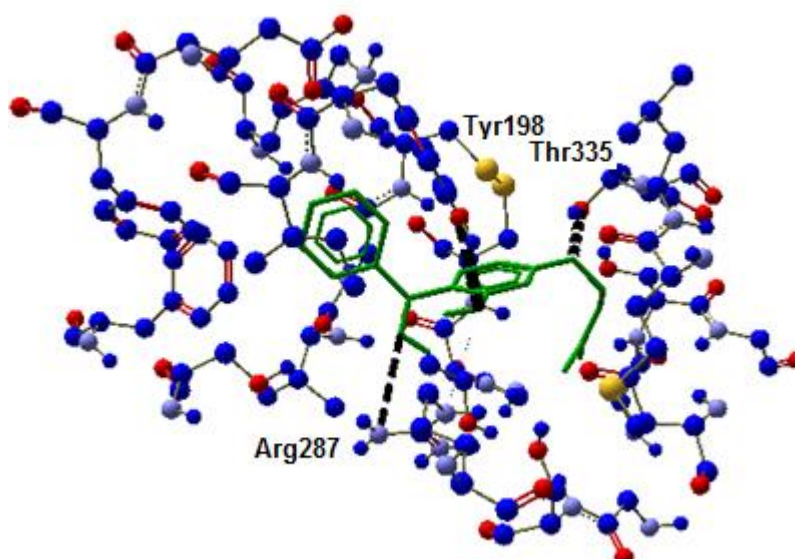


Figura 24. Interação tripanotona redutase e LFQM-117. Átomos de carbono estão representados em azul, de nitrogênio em lilás, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo. Ligante representado em verde. Interações de hidrogênio estão representadas em preto, destacando os resíduos da proteína envolvidos em tal interação.

## 5.8 Avaliação da Inibição Enzimática

Enzimas representantes de CPs e SPs foram utilizadas para a avaliação do potencial de inibição enzimática dos derivados. A papaína e cruzaína foram as cisteíno proteases empregadas nos testes, enquanto que tripsina e oligopeptidase B recombinante de *T. cruzi* foram as serino proteases usadas.

A avaliação do potencial de inibição enzimático foi expressa em IC<sub>50</sub>, ou seja, concentração de inibidor necessária para inibir 50% da atividade enzimática no ensaio (Tabela 18).

Tabela 18. Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) para enzimas da família de cisteíno e serino proteases.

	IC <sub>50</sub> (µg/mL)				
	LFQM-116	LFQM-117	LFQM-119	LFQM-120	LFQM-121
Papaína	7,54	12,08	12,25	19,20	61,38
Cruzaína	8,44	9,51	7,15	10,86	n.i.
Tripsina	8,59	12,90	8,24	28,61	n.i.
Oligopeptidase B	14,25	17,34	28,52	19,09	36,94

\* n.i. significa que não houve inibição enzimática.

Pode-se verificar ao final de todos os resultados apresentados que os compostos podem exibir diferentes mecanismos de ação, ou seja, enquanto alguns (LFQM-119, LFQM-120 e LFQM-121) parecem estimular mais a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos, outros como LFQM-116 e LFQM-117 parecem exibir um perfil como potencial inibidores enzimáticos (Figura 25).

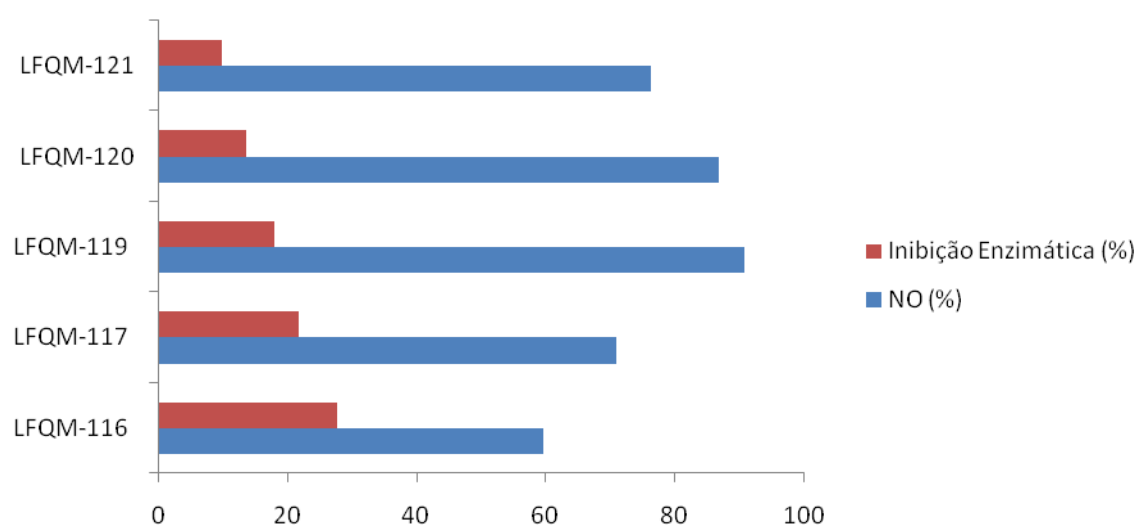


Figura 25. Representação em porcentagem do estímulo de produção de óxido nítrico (NO) (barras azuis) *versus* representação em porcentagem do potencial de inibição enzimática médio considerando todas as enzimas ensaiadas (barras vermelhas) dos derivados LFQM.

## 6 DISCUSSÃO

As leishmanioses são enquadradas por muitos autores como umas das principais doenças tropicais negligenciadas, fato este que é baseado no descaso para com a doença, principalmente no que diz respeito ao tratamento farmacológico utilizado. A quimioterapia está baseada nos antimonialis pentavalentes, os quais vêm sendo usados como os fármacos de primeira linha para o tratamento destas por mais de 70 anos em vários países. Tanto Glucantime, quanto Pentostam apresentam toxicidade elevada, alto custo, dificuldade de administração, longo período de tratamento e surgimento de resistência ao fármaco (TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINK, 2011; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Estas desvantagens estão presentes em outros fármacos utilizados em tratamentos de segunda escolha das leishmanioses. Em vista disso, a pesquisa por novos protótipos a candidatos a fármacos leishmanicida faz-se necessária.

As benzofenonas, além de outras propriedades farmacológicas, vêm sendo descritas devido à sua ação em parasitos como *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* (ESTEVA, 2005; PEREIRA, 2010). Em outros casos, relata-se sua eficácia sobre algumas enzimas do protozoário *Leishmania* (LUQUE-ORTEGA, 2010). Neste contexto, este trabalho focou no estudo do potencial leishmanicida de alguns derivados de benzofenonas, bem como de seus precursores. Os testes foram realizados sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, uma das espécies responsáveis pelas manifestações clínicas cutâneas e de prevalência na América do Sul (KEDZIERSKI, 2011).

O *screening* de substâncias contra *Leishmania spp.* geralmente inicia-se com a realização de testes com as formas promastigotas deste parasito. Esta triagem em promastigotas é particularmente importante devido à dificuldade de realização de testes *in vitro* com as formas intracelulares do parasito (MUYLDER, 2011; TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINK, 2011). De fato, a facilidade de manipulação e manutenção destas em cultura corrobora para a utilização das mesmas em ensaios iniciais para avaliação da atividade leishmanicida. Entretanto, as formas encontradas nos hospedeiros vertebrados são as formas intracelulares (as quais seriam os alvos diretos de fármacos leishmanicidas), por isso realizaram-se,

posteriormente, ensaios em amastigotas. Ressalta-se ainda, a importância dos testes de citotoxicidade, pois, no seu hospedeiro mamífero as formas amastigotas estão localizadas intramacrofagicamente. Portanto, um protótipo que seja candidato a fármaco anti-*Leishmania*, além de sua atividade antiparasítica, deve ser pouco citotóxico.

Com intuito de facilitar a discussão do trabalho, os compostos que possuíam a mesma benzofenona de partida foram agrupados adotando-se a denominação de série para cada grupo de derivados. Assim sendo, na série A estão os compostos obtidos a partir de CM-A. De maneira análoga, os compostos obtidos a partir de CM-B compõem a série B, e aqueles obtidos de CM-C fazem parte da série C.

De uma maneira geral, pode-se verificar nos ensaios realizados que as modificações estruturais feitas melhoraram a atividade dos derivados ao compararmos cada um com sua respectiva benzofenona de partida (Tabela 7).

Dentre os derivados obtidos a partir de reações com CM-A e CM-B, aqueles com grupamento metoxila em C4 (LFQM-115 e LFQM-118) mostraram-se os mais eficazes em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* dentro de cada série. A inserção de uma prenila na posição mencionada rendeu melhor atividade leishmanicida aos derivados (LFQM-117 e LFQM-120) do que a inserção de um grupamento butila (LFQM-116 e LFQM-119). Portanto, a atividade antipromastigota dos derivados de CM-B pode ser equiparada aos derivados de CM-A, uma vez que a hidroxila em C2 que os derivados deste último precursor apresentavam não contribuiu de maneira considerável com ganho na atividade antipromastigota e pode-se concluir que provavelmente os grupamentos em C4 das benzofenonas sejam mais importantes para esta atividade.

Por outro lado, em se tratando dos derivados de CM-C a correlação acima não pode ser constatada. Uma vez que o derivado com a melhor atividade antipromastigota desta série foi aquele com grupamento prenila em C4 e em C4' (LFQM-123), seguido por aquele com grupamento metoxila em C4 e em C4' (LFQM-121) e com grupamento butila na posição mencionada (LFQM-122).

As benzofenonas precursoras mostraram-se pouco tóxicas às células de mamíferos. Nos derivados de CM-A e CM-B apenas aqueles nos quais o grupamento adicionado foi uma prenila (LFQM-117 e LFQM-120) não houve grande comprometimento dessa propriedade, sendo estes os mais promissores ao

analisarmos a atividade citotóxica. Os derivados de CM-C (LFQM-121, LFQM-122, LFQM-123), de uma maneira geral, foram todos pouco tóxicos a macrófagos peritoneais murinos.

Uma série de chalconas preniladas com diferentes substituintes foram preparadas e avaliadas quanto à sua atividade vasorelaxante. As relações estrutura-atividade mostraram que o padrão do substituinte inserido foi crucial para a atividade (DONG, 2009). Em outro trabalho mais recente, em que uma série de derivados foi avaliada quanto a sua atividade leishmanicida, constatou-se que a inserção de diferentes substituintes rendem atividades parasitárias distintas (LUQUE-ORTEGA, 2010). Tais achados evidenciam a importância de iniciar estudos biológicos com uma série de compostos para posterior seleção de promissores.

Para a realização dos ensaios de amastigotas intracelulares foram utilizados macrófagos peritoneais murinos, os quais são descritos como um dos modelos mais precisos, fornecendo resultados altamente reprodutíveis e elevada taxa de infecção (TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINK, 2011), parâmetros necessários para uma análise apropriada da atividade leishmanicida. A ação em amastigotas intracelulares foi realizada apenas com os derivados benzofenônicos, pois estes se mostraram melhores que suas precursoras em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. No ensaio anti-amastigota o derivado LFQM-120 ( $IC_{50-AMA} = 7,30 \mu\text{g/mL}$ ) mostrou-se tão efetivo quanto o fármaco de referência, Anfotericina B ( $IC_{50-AMA} = 5,68 \mu\text{g/mL}$ ), uma vez que o valor de  $IC_{50-AMA}$  de ambos foram estatisticamente iguais entre si. Os derivados LFQM-118, LFQM-122 e LFQM-123 não se mostraram tão ativos ( $IC_{50-AMA} > 40,00 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto que os demais derivados exibiram valores de  $IC_{50-AMA}$  variando de 10,00 à 21,00  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 9).

A resposta biológica produzida por compostos bioativos está diretamente relacionada com os mecanismos de absorção, distribuição e atividade intrínseca. Os processos de absorção e distribuição destes compostos são regulados basicamente pela sua hidrofobicidade, uma vez que é necessário que se dissolvam e atravessem as membranas biológicas que formam os tecidos e sistemas multicompartmentados dos seres vivos, até que alcancem seus respectivos sítios de ação. Estudos demonstraram inúmeras correlações entre a atividade biológica e a hidrofobicidade de compostos bioativos (TAVARES; FERREIRA, 2006).

Modelos teóricos para predição das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) e também segurança e toxicidade de potenciais fármacos têm importante papel no processo de desenvolvimento de fármacos. Lipofilicidade é o fator chave em muitos processos de ADME envolvendo transporte por membranas, mas este também influencia na interação com enzimas metabolizantes e transportadores (OPLETALOVÁ, 2013). O balanço da hidrofobicidade requerido para a translocação através da membrana é finamente sintonizado. A escolha de substituintes com hidrofobicidade moderada pode levar à compostos com lipofilicidade moderada, os quais teriam uma maior facilidade de atravessar a membrana plasmática (LUQUE-ORTEGA, 2010). O logaritmo do coeficiente de partição n-octanol e água (logP) tem sido frequentemente usado para representar a lipofilicidade molecular (OPLETALOVÁ, 2013).

O QlogP dos compostos e os valores de IC<sub>50-PRO</sub> (Figura 15) mostram que a inserção de grupos alquila em C4 resultou em derivados com caráter lipofílico mais pronunciado que suas benzofenonas precursoras e a atividade antipromastigota destes derivados, foi de maneira análoga, mais promissora que os precursores.

Porém na relação entre logP e atividade constata-se que há um valor ótimo, ou seja, há uma lipofilicidade ótima em que há melhor expressão dos requisitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos (BARREIRO; FRAGA, 2008). Isso pode ser verificado, pois ao analisar paralelamente a atividade antiamastigota gerada pelos derivados e seus respectivos QlogP (Figura 16) verifica-se que os derivados mais efetivos em as formas intracelulares foram aqueles, os quais o QlogP estava numa faixa de 3,50 a 5,30 – valores de QlogP abaixo desse limite inferior ou acima desse limite superior renderam um atividade leishmanicida menos efetiva. Portanto, ação dos derivados sobre a forma amastigota de *Leishmania* pode ser relacionada com o QlogP, uma vez que para que o composto consiga atingir o parasito precisa primeiramente transpor as biomembranas dos macrófagos.

Uma estreita relação entre a lipofilicidade e atividade antioxidante também foi descrita por Urzúa e colaboradores quando avaliaram a atividade antimicrobiana de uma série de derivados de espiro-benzofurano (URZÚA, 2008).

É importante reconhecer que a hidrofobicidade de um fármaco determina a extensão e a velocidade de sua absorção e distribuição, a sua capacidade de ligação ao sítio receptor e/ou alvo enzimático, bem como a sua biotransformação e

excreção. O entendimento destas etapas envolve, por um lado, o conhecimento da estrutura, função e propriedades das membranas biológicas e, por outro lado, o conhecimento da estrutura e das propriedades físico-químicas do candidato a fármaco, como o tamanho e forma da molécula, seu grau de ionização e lipossolubilidade relativa de suas formas neutra e ionizada (TAVARES; FERREIRA, 2006).

Essa mesma relação de valor de lipofilicidade ideal e atividade biológica podem ser também constatadas com uma série de derivados de ácidos graxos. Em tal estudo, ácidos graxos com diferentes comprimentos de cadeia foram utilizados para sintetizar derivados de tirosil, a fim de se obter compostos fenólicos com lipofilicidade variável. Apenas os derivados de cadeia média exibiram boa atividade antimicrobiana e leishmanicida (AISSA, 2012).

Os resultados apresentados pelos derivados nos testes antipromastigota, citotóxico e anti-amastigota nos permitiu a seleção de alguns derivados mais promissores (LFQM-116, LFQM-117, LFQM-119, LFQM-120 e LFQM-121). A escolha foi realizada de maneira que os selecionados permanecessem representativos de cada série. Sendo assim da série A, LFQM-115 apesar de ser o mais eficaz em ambas as formas do parasito, mostrou ser o mais citotóxico com um valor de  $CC_{50}$  comparável ao apresentado pela Anfotericina B, que é descrita por seus diversos efeitos colaterais. A problemática apresentada pelo LFQM-118, da série B, abrangeu o fator de segurança, uma vez que este exibiu um valor considerado insatisfatório. Tais fatos acarretaram na eliminação dos derivados mencionados para que prosseguissem nos demais testes. Na série C, dois derivados (LFQM-122 e LFQM-123) exibiram um alto e idêntico valor de  $IC_{50-AMA}$ , o que corroborou na exclusão de ambos para as demais análises.

Os derivados de CM-A além de uma hidroxila em C2 possuíam outro grupamento funcional em C4. Curiosamente, a adição de um grupamento butila em C4 no LFQM-116 rendeu uma melhor atividade de tal derivado em formas amastigotas intracelulares, porém uma perda na atividade citotóxica a macrófagos murinos também pode ser vista. Por outro lado, com a inserção de uma prenila em C4 no LFQM-117 a atividade em formas amastigotas foi levemente diminuída, porém um ganho na atividade citotóxica também pode ser vista.

Entretanto os derivados de CM-B possuíam apenas o grupamento em C4. A presença de uma butila em C4 (LFQM-119) rendeu uma boa atividade em formas amastigotas de *Leishmania* e uma considerável perda na atividade citotóxica. Porém o derivado com uma prenila em C4 (LFQM-120) exibiu uma forte atividade leishmanicida nas formas intracelulares deste parasito e pouca citotoxicidade também pode ser constatada.

Outros pesquisadores também relatam a impotência da inserção de grupamentos alquil para a melhoria na atividade biológica, como Yazaki e colaboradores, que descreveram a importância do grupamento prenila em metabólitos secundários comuns em plantas, os polifenóis. Neste estudo uma variedade de atividade biológica foi exibida por polifenóis prenilados, ex.: antitumoral, antibacteriana, antivírus, antioxidante, estrogênica, inibição de fosfolipase, inibição de sulfotransferase e anti-produção de óxido nítrico. Sugerindo que a adição de grupamentos prenila pode contribuir para o aumento das atividades biológicas de compostos polifenólicos (YAZAKI, 2009).

Portanto, os derivados selecionados para dar continuidade aos demais ensaios (dosagem de NO, *docking* molecular e potencial de inibição enzimática) foram: LFQM-116, LFQM-117, LFQM-119, LFQM-120 e LFQM-121. O derivado LFQM-119 poderia ser questionável quanto a sua escolha para a realização dos demais testes devido ao valor de  $CC_{50}$  próximo ao valor apresentado pela Anfotericina B, porém foi utilizado, uma vez que seu FS foi maior que 1,00.

Os macrófagos são os principais fagócitos que atuam como célula hospedeira para *Leishmania*. Além disso, a ativação de macrófagos é um mecanismo primário para eliminar o parasito presumivelmente mediado por metabólitos tóxicos de oxigênio (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). O aumento nos níveis de NO em macrófagos ativados é o resultado da iNOS. A produção dessas citocinas, ROS e derivados de NO normalmente leva a destruição de micro-organismos fagocitados, mas *Leishmania* é um dos poucos protozoários que pode sobreviver e até mesmo se replicar neste ambiente hostil (ASSCHE, 2011). A morte dos parasitos é dependente da ativação de macrófagos por IFN- $\gamma$ . Este sinal é dado por amastigotas, promastigotas, ou lipofosfoglicanos (LPG), mas não células mortas ou lisados celulares. Uma vez que estes sinais estejam presentes, a iNOS é

induzida e o NO é produzido. Portanto, NO tem claramente um papel crucial na morte do protozoário *Leishmania* por macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  (HORTA, 2012).

Portanto, a produção de NO por macrófagos ativados é um importante fator no entendimento de uma provável função dos agentes testados. Sendo assim, pode-se dizer que os derivados poderiam assumir dois papéis na resposta imune causada, ou seja, poderiam ter um papel pró-inflamatório, onde ajudariam a estimular a produção de NO ou um papel anti-inflamatório, no qual poderia ser constatado um estímulo na produção de TGF- $\beta$ .

O lipopolissacarídeo (LPS) de micro-organismos é descrito por ativar monócitos (COLONNA E FACCHETTI, 2003). Sendo assim, esta substância em contato com macrófagos induz efetivamente a produção de NO por essas células. Nesse sentido a utilização do LPS como controle positivo nos ensaios de dosagem de NO permite-nos avaliar seguramente a produção dessa molécula efetora em macrófagos tratados com os derivados em estudo.

É possível verificar que os derivados de benzofenonas LFQM-119 e LFQM-120 estimularam macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* a produzir NO. Porém nem todos os derivados induziram uma produção de NO equivalente ao que foi produzido pelas células em contato com LPS. Sendo apenas o derivado LFQM-120 foi capaz de induzir uma produção estatisticamente igual à produção induzida por LPS, uma molécula descrita por eficientemente induzir a produção de NO em monócitos. É possível então que a resposta imune desencadeada por tais derivados benzofenônicos em macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* esteja associada à mecanismos pró-inflamatórios com aumento da produção de NO.

Na tentativa de se entender a relação estrutura-atividade *in vitro*, além da avaliação da produção de óxido nítrico, foi também avaliado o potencial de inibição de enzimas do parasito. Para isto, foram realizados ensaios *in silico* (*docking* molecular) e testes enzimáticos *in vitro*.

A predição de interação entre uma biomacromolécula e uma molécula pequena, *docking* molecular, é uma fase crucial na área de desenvolvimento racional de fármacos (HANDOKO, 2012). A ferramenta de *docking* molecular está entre as mais simples dos diferentes tipos de simulações moleculares. Tal ferramenta rende informações sobre a energética, e/ou ranqueamento qualitativo das interações proteína ligante. AutoDock é um software adequado para simulações

de *docking* molecular, porém recentes versões deste software trazem um eficiente algoritmo de procura, os quais incluem a energia livre de Gibbs ( $\Delta G_{bind}$ ), uma correlação derivada de conformações moleculares (HILL; REILLY, 2007).

O AutoDock Vina é um novo programa de *docking* molecular e virtual *screening* que vem ganhando espaço no meio científico. A avaliação da velocidade e precisão do AutoDock Vina durante *redocking* flexível dos 190 complexos receptor-ligante, que constituem o conjunto de treino do AutoDock, mostrou aproximadamente duas ordens de magnitude de melhoria na velocidade e precisão (TROTT; OLSON, 2010). Vantagens essas, que corroboraram para a escolha desse software para a realização das análises *in silico*. A predição de ligação de pequenas moléculas a proteínas é de particular importância prática devido seu uso em virtual *screening* de bibliotecas de moléculas com a finalidade de obter-se compostos líderes para o desenvolvimento de fármacos. O *docking* molecular está interessado em reproduzir potenciais químicos, os quais determinam a conformação preferencial de ligação e a energia livre de ligação (TROTT; OLSON, 2010). Assim como outros processos espontâneos, uma ligação não-covalente ocorre quando está associada com uma energia livre de ligação negativa ( $\Delta G$ ), o qual é bem conhecido como a soma de um termo entálpico ( $\Delta H$ ) e um termo entrópico ( $-T\Delta S$ ) (BISSANTZ; KUHN; STAHL, 2010). Assim, quanto menor a energia mais espontaneamente complexo ligante-receptor irá se formar. Dessa maneira, um dos parâmetros que podem ser levados em consideração nas análises do *docking* molecular é a espontaneidade da formação do complexo ligante-receptor, ou seja, o  $\Delta G$ .

Outro importante parâmetro a ser considerado nessas análises são as interações de hidrogênio formadas, principalmente àquelas interações envolvendo resíduos do sítio ativo das enzimas, uma vez que, um protótipo a fármaco leishmanicida com potencial de inibição enzimática poderia exibir menos efeitos colaterais indesejáveis. As interações de hidrogênio são particularmente importantes, visto que, em muitas estruturas e processos biológicos o efeito combinado de interações covalentes e não-covalentes é responsável pelos mecanismos moleculares de atuação de macromoléculas, sendo as interações de hidrogênio algumas das ligações não-covalentes que ocupam papéis fundamentais em processos biológicos (VIEIRA, 2004). A presença ou ausência de ação biológica em compostos é atribuída até certo ponto, em determinados casos, à capacidade de

formarem ou não interações de hidrogênio. Isso influi substancialmente nas suas propriedades físico-químicas e, portanto, em suas propriedades farmacodinâmicas. Por exemplo, a ligação de um fármaco a um receptor é mediada por interações de hidrogênio, o que contribui para a estabilidade do complexo fármaco-receptor (KOROLKOVAS, 1923). Estudos mostram que 66,9% dos complexos proteína-compostos orgânicos envolvem interações de hidrogênio e que 65,8% dessas interações de hidrogênio são formadas entre grupo NH do resíduo da proteína e o átomo de oxigênio do composto orgânico. Como resultado, acredita-se que a geometria e a complementaridade eletrostática, os quais são utilizados para o reconhecimento molecular, poderiam ser também analisados pela implementação de interações de hidrogênio, no caso de complexos proteína-compostos orgânicos (CHEN; KURGAN, 2009). Portanto, uma análise das ligações de hidrogênio formadas entre as enzimas docadas e os derivados poderia nos fornecer melhor entendimento a respeito das forças das interações proteína-ligantes (VIEIRA, 2004).

Cisteíno proteases (CPs) são assim denominadas devido à função de uma cisteína catalítica, a qual medeia a hidrólise protéica (PANDEY, 2011). As CPs encontradas em abundância em protozoários do gênero *Leishmania* (CPA, CPB e CPC) e em *Trypanosoma cruzi* (cruzaína) exibem homologia entre si (ALVES, 2001). Adicionalmente, o sítio de clivagem ou a tríade catalítica de todas essas CPs é composto de uma cisteína nucleofílica, uma histidina e uma asparagina (SELZER, 1997). Essa homologia existente entre as CPs de *Leishmania* e a de *Trypanosoma cruzi* possibilitou que a enzima deste último organismo, a cruzaína, fosse utilizada para os estudos de *docking* e ensaios enzimáticos *in vitro*. A cruzaína tem sido uma das cisteíno proteases de tripanossomatídeos mais estudadas e melhor caracterizadas, por isso a maior facilidade da realização de ensaios com esta CP.

A papaína é uma das principais representantes de CPs. No *docking* molecular realizado entre essa enzima e os derivados (Tabela 12), ao analisarmos os valores de  $\Delta G$  verifica-se que a formação do complexo proteína-ligante ocorreria mais espontaneamente para os derivados LFQM-120, LFQM-117 e LFQM-116, os quais apresentam valores de  $\Delta G$  próximos ( $\Delta G = - 6,7$ ;  $- 6,5$  e  $- 6,3$  Kcal/mol; respectivamente). Porém, analisando as interações de hidrogênio verifica-se que nenhum dos ligantes realizou interações de hidrogênio envolvendo o principal resíduo do sítio ativo (Cys25). Por outro lado, outro resíduo do sítio ativo (His159)

esteve presente nas interações das enzimas com os ligantes LFQM-117 e LFQM-121. O LFQM-120, apesar de ter apresentado o menor valor de  $\Delta G$ , não foi constatada nenhuma interação de hidrogênio entre este e os resíduos da enzima. O derivado LFQM-116 exibiu maior número de átomos envolvidos com resíduos, que não do sítio ativo, desta enzima em interações de hidrogênio. No ensaio experimental com a papaína os derivados LFQM-116, LFQM-117 e LFQM-119 mostraram os melhores resultados de  $IC_{50-PAP}$  (Tabela 18), ou seja, as concentrações necessárias para inibir 50% da atividade enzimática destes são menores quando comparadas com as demais (27,91; 42,78 e 48,20  $\mu M$ , respectivamente). Sendo assim, ao analisarmos conjuntamente os parâmetros de *docking* molecular abordados e os resultados de inibição enzimática experimental pode-se dizer que os derivados mais promissores seriam LFQM-116 e LFQM-117.

Em relação ao *docking* molecular com outra CP, a cruzaina (Tabela 13), pode-se verificar uma pequena variação entre os valores de  $\Delta G$ , porém os derivados LFQM-116, LFQM-117 e LFQM-120 mostraram o melhor resultado para este parâmetro ( $\Delta G = - 6,3$  Kcal/mol), seguido pelos derivados LFQM-119 e LFQM-121. Os compostos LFQM-116 e LFQM-117 também tiveram átomos envolvidos nas interações de hidrogênio com resíduos da enzima envolvidos nos mecanismos catalíticos (Cys25 e His159). Nesse caso, o LFQM-119 não exibiu nenhuma interação de hidrogênio com os resíduos da enzima, surpreendentemente este mesmo derivado (LFQM-119) exibiu o menor valor de  $IC_{50-CRUZ}$  (Tabela 18) em ensaios enzimáticos experimentais, seguido de LFQM-116 e LFQM-117 (28,13; 31,24 e 33,69  $\mu M$ , respectivamente). No caso da cruzaina os resultados do *docking* molecular e do ensaio experimental são um pouco discrepantes. Pela ferramenta de *docking* molecular o LFQM-120, que mostrou o menor valor de  $IC_{50-CUZ}$  determinado experimentalmente, não exibiu nenhuma interação de hidrogênio. Fato este que não exclui o envolvimento de outros tipos de interações, o que justificaria o valor experimental. Além disso, vale ressaltar que ambos derivados LFQM-116 e LFQM-117, que exibiram os melhores resultados de interação com cruzaina, foram os potenciais inibidores desta cisteína protease de tripanossomatídeos.

Outras benzofenonas vêm sendo descritas por sua ação inibitória de cisteína proteases. Benzofenonas naturais polipreniladas isoladas da *Garcinia brasiliensis* mostraram-se eficazes em ambas as formas de *L. (L.) amazonensis*. Além disso, um

promissor composto isolado de extratos desta planta, fukugetina, exibiu forte atividade inibitória de cisteíno proteases como papaína e cruzaína. Adicionalmente foi evidenciado por *docking* molecular que tal composto realizava interações em importantes bolsões catalíticos (PEREIRA, 2010; ASSIS, 2012). Uma forte atividade leishmanicida foi descrita por uma série de sais de benzofenonas sintéticas, constatando-se maior suscetibilidade de formas amastigotas do que promastigotas à estes compostos; foi ainda verificado que estes apresentavam capacidade inibitória de importantes enzimas mitocondriais (LUQUE-ORTEGA, 2010).

Serino proteases (SPs) são descritas por sua forte atividade hidrolítica contra vários componentes da matriz extracelular e proteínas plasmáticas humanas. Portanto elas são essenciais para processos de invasão de tecido hospedeiro (CHOUDHURY, 2010). A tripsina é uma das SPs, mais estudada e melhor caracterizada, por isso, é uma das enzimas melhor compreendidas. Em virtude disso, a tripsina é uma enzima utilizada como modelo experimental para estudos de caracterização de outras serino proteases (GONTIJO, 2005). A oligopeptidase B (OpB), outra enzima pertencente às SPs, foi identificada em extratos de *Leishmania*. A OpB tem sido também identificada em outros protozoários incluindo *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma evansi* (SWENERTON, 2011).

De acordo com o *docking* molecular com a tripsina (Tabela 14), constatou-se, que os valores de  $\Delta G$  mostraram pouca variação entre os derivados. Acredita-se que os derivados LFQM-116, LFQM-117 e LFQM-121 possam proporcionar uma melhor interação com a tripsina, uma vez que átomos desses ligantes fizeram interação de hidrogênio com os dois resíduos catalíticos (His57, Ser195), enquanto que os outros ligantes apenas um destes resíduos catalítico esteve envolvido nas interações de hidrogênio. No ensaio enzimático experimental (Tabela 18), considerando os valores de  $IC_{50-TRIP}$  para inibição da enzima, os resultados mostrados por LFQM-116, seguido por LFQM-119 e LFQM-117 foram os mais promissores. Nesse contexto, os derivados LFQM-120 e LFQM-121 não mostraram perfil de inibição enzimática adequado, e ao analisarmos conjuntamente os resultados constata-se que os derivados LFQM-116, LFQM-117 e LFQM-119 seriam os mais promissores inibidores da tripsina.

Em relação à OpB, no *docking* molecular (Tabela 15) apesar de pequenas diferenças entre os valores de  $\Delta G$  apresentados pelos derivados, o LFQM-117 ( $\Delta G$

= - 8,3 Kcal/mol) exibiu o melhor resultado, seguido por LFQM-120 , LFQM-116/LFQM-119 e LFQM-121. Na predição da interação destes com tal enzima, também verificou-se pouca diferença e o resíduo His511 esteve presente nas interações com os cinco derivados. No ensaio experimental foi utilizada a enzima recombinante de *T. cruzi*, que apresenta uma grande similaridade com a OpB de *Leishmania*, o que não compromete as conclusões a serem feitas. Assim, de acordo com os resultados do ensaio enzimático experimental (Tabela 18), o LFQM-116 ( $IC_{50-OPB} = 52,73 \mu M$ ) mostrou o resultado mais promissor, seguido pelo LFQM-117 e LFQM-120 ( $IC_{50-OPB} = 61,43$  e  $71,72 \mu M$ ; respectivamente). Portanto, os derivados LFQM-116, LFQM-117 e LFQM-120 seriam o inibidores de OpB mais promissores.

Outros trabalhos descrevem a ação inibitória de serino proteases de *Leishmania (L.) amazonensis* e da viabilidade celular do parasito por um composto marinho (SILVA-LOPES, 2007). Ressaltando assim, a importância dessas enzimas para o protozoário *Leishmania*.

Com as enzimas da biossíntese das poliaminas apenas o *docking* molecular foi realizado. A ornitina descarboxilase (ODC) é uma enzima fosfato piridoxal (PLP)-dependente, e catalisa o primeiro passo que pode ser comprometido na biossíntese das poliaminas, ou seja, catalisa descarboxilação da ornitina para produzir putrescina. Um potente inibidor da ODC,  $\alpha$ -difluorometil ornitina (DFMO), exibiu níveis de cura na doença do sono Africana, o que tem estimulado estudos quanto ao uso dessa enzima como alvo para o desenvolvimento de fármacos. Dois sítios ativos são descritos quanto à sua importância para a enzima, Lys69 e Cys360. O primeiro resíduo mencionado forma uma base de Schiff com PLP, enquanto que o segundo resíduo foi identificado como o local de ligação covalente de DFMO (JACKSON, 2000). Estes importantes resíduos da ODC não estiveram envolvidos nas interações de hidrogênio formadas entre esta enzima e os ligantes (Tabela 16). Porém outros resíduos estiveram envolvidos e em alguns casos três (LFQM-116 e LFQM-121) ou quatro (LFQM-117) interações de hidrogênio foram constadas na estabilização do complexo receptor-ligante. Sendo assim, o LFQM-117 poderia mais facilmente que os demais derivados estabilizar o complexo receptor-ligante, devido ao maior número de interações de hidrogênio formadas, seguido por LFQM-116 e LFQM-121.

A tripanotiona redutase (TryR) é uma oxirredutase FAD dependente que utiliza NADPH como doador de elétrons, e contém sítios de ligação para FAD,

NADPH, além do sítio de ligação do substrato (RODRIGUES, 2012). Os resíduos Cys52 e Cys57 estão envolvidos na formação de uma ponte dissulfeto no sítio ativo da enzima. Além destes, outro importante resíduo do sítio ativo para interação é uma treonina (Thr335) (BAIOCCO, 2009). Um dos resíduos envolvidos no sítio de ligação de NADPH é Tyr198 (BAIOCCO, 2009). Este resíduo (Tyr198) já descrito por outros autores por estar envolvido em mecanismos de interação (VENKATESAN; SHUKLA; DUBEY, 2010). Os resíduos Thr335 e Tyr198 estiveram presentes nas interações da TryR com LFQM-116 e LFQM-117 (Tabela 17), além de interações adicionais com resíduos Arg287, que podem colaborar numa melhor estabilização do complexo ligante-enzima. Os derivados LFQM-119 e LFQM-120 exibiram também interações com o resíduo Thr335, além da interação com outros resíduos (Arg287 e Lys60, respectivamente). Apenas para o LFQM-121 não foram constatadas interações de hidrogênio envolvendo Thr335.

Ao final do estudo pode-se verificar que os derivados LFQM-116 e LFQM-117 exibiram um mecanismo de ação que provavelmente esteja correlacionado como inibidores enzimáticos. Enquanto que, os derivados LFQM-119 e LFQM-121 parecem estar mais relacionados com a indução da produção de NO e conseqüentemente a morte do protozoário *Leishmania*. Por outro lado, o derivado LFQM-120 potencialmente exibe uma ação multi-alvo, pois além de sua potente atividade anti-amastigota em *L. (L.) amazonensis*, este auxilia na indução da produção de NO e também na inibição de algumas proteases testadas.

## 7 CONCLUSÕES

- As modificações estruturais realizadas forneceram um ganho na atividade dos derivados de benzofenonas testados em formas promastigotas do parasito *L. (L.) amazonensis*. Os derivados com melhor atividade antipromastigota exibiram valores de IC<sub>50-PRO</sub> variando de 4,90 a 9,80 µg/mL, e seus precursores IC<sub>50-PRO</sub> variando de 29,00 a 121,36 µg/mL;

- As três benzofenonas precursoras e os derivados LFQM-116, LFQM-117, LFQM-120, LFQM-121, LFQM-122 e LFQM-123 foram pouco citotóxicos a macrófagos peritoneais murinos;

- Uma correlação entre a atividade antipromastigota e QlogP pode também ser verificada. As alquilações feitas resultaram em derivados mais lipofílicos que suas benzofenonas precursoras e a atividade antipromastigota destes derivados foi, de maneira análoga, mais promissora que os precursores;

- Na atividade em formas amastigotas do protozoário *L. (L.) amazonensis* os derivados LFQM-115, LFQM-116, LFQM-117, LFQM-119, LFQM-120 e LFQM-121 exibiram o melhor perfil de atividade nesse teste, com valor de IC<sub>50-AMA</sub> variando de 7,30 a 21,00 µg/mL e um QLogP variando de 3,50 a 5,30;

- Apenas um derivado (LFQM-118) exibiu valor do fator de segurança considerado insatisfatório, sendo que todos os demais derivados apresentaram FS de 1,94-11,93.

- Os derivados LFQM-119 e LFQM-120 aumentaram os níveis de produção de NO, enquanto que apenas o LFQM-120 induziu um estímulo na produção de NO estatisticamente igual ao produzido pelo LPS. Dentre estes, o derivado LFQM-120, obtido a partir de CM-B, mostra-se mais promissor, uma vez que foi altamente efetivo em formas amastigotas do protozoário *Leishmania* e pouco tóxico a células de mamíferos, com FS = 11,93;

- Ao analisarmos conjuntamente os resultados de *docking* molecular e os ensaios enzimáticos verifica-se que para ambas cisteíno proteases (papaína e cruzaína) os derivados LFQM-116 e LFQM-117 exibiram o melhor perfil como inibidores enzimáticos;

- Dentre as serino proteases, os melhores resultados para inibição enzimática da tripsina foram exibidos por LFQM-116, LFQM-117 e LFQM-119. Enquanto que para OpB foram os melhores resultados foram exibidos pelo LFQM-120, além de LFQM-116 e LFQM-117;
- Para as enzimas da biossíntese das poliaminas foi possível constatar que para ODC os inibidores mais promissores seriam, novamente, LFQM-116, LFQM-117, além do LFQM-121; por outro lado, para TryR seriam LFQM-116 e LFQM-117, assim como nas outras enzimas, seguidos por LFQM-119 e LFQM-120;
- Portanto os derivados LFQM-116 e LFQM-117, ambos sintetizados a partir de CM-A (benzofenona precursora mais efetiva em promastigotas), exibiram uma atividade inibitória de proteases mais pronunciada; além de não exibirem grandes diferenças no QlogP;
- Além da potente atividade anti-*Leishmania* exibida pelo LFQM-120, seu mecanismo ação pode ser correlacionado com uma ação multi-alvo, uma vez que auxilia no aumento da produção de NO e atua em alguns casos como inibidor de proteases.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acid/Chemsketch Freeware Version 10.00, Advanced Chemistry Development, Inc., **Toronto, On, Canada** (2006). Disponível em: <www.Acdlabs.com.>

AISSA, I. et al. Synthesis of Lipophilic Tyrosyl Esters Derivatives and Assessment of Their Antimicrobial and Antileishmania Activities. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 13, p. 1-8, 2012.

ALAVI-NAINI, R.; FAZAELI, A.; O'DEMPSEY T. Topical Treatment Modalities for Old World Cutaneous Leishmaniasis: A Review. **Prague Medical Report**, v. 113, n. 2, p. 105-118, 2012.

ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. The Peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive Enzymes, Virulence Factors, and Mediators of Autophagy and Programmed Cell Death. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, n. 1, p. 195-206, 2012.

ALVES, C. R. et al. *Leishmania amazonensis*: Early Proteinase Activities During Promastigote-Amastigote Differentiation *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v. 109, p. 38-48, 2005.

ALVES, C. R. et al. Th1 and Th2 Immunological Profile Induced by Cysteine Proteinase in Murine Leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 26, p. 127-135, 2004.

ALVES, L. C. et al. Substrate Specificity of Recombinant Cysteine Protease, CPB, of *Leishmania mexicana*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 116, p. 1-9, 2001.

ANIRUDHAN, T. S.; REJEENA, S. R. Adsorption and Hydrolytic Activity on a Carboxylate-Functionalized Cation Exchanger Prepared from Nanocellulose. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 381, p. 125-136, 2012.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: New Insights from an Old and Neglected Disease. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 31, p. 109-118, 2012.

APARÍCIO, I. M. et al., A New Cruzipain-Mediated Pathway of Human Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi* Requires Trypomastigote Membranes. **Infection and Immunity**, v.72, p. 5892–5902, 2004.

ASSCHE, T. V. et al. *Leishmania*-Macrophage Interactions: Insights into the Redox Biology. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 337-351, 2011.

ASSIS, D. M. et al. Inhibition of Cysteine Proteases by a Natural Biflavone: Behavioral Evaluation of Fukugetin as Papain and Cruzain Inhibitor. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 2012.

- AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune Response to *Leishmania* Infection. **Indian Journal of Medical Research**, v. 119, p. 238-258, 2004.
- BAIOCCO, P. et al. Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 2603-2612, 2009
- BALANÑA-FOUCE, R. et al. Role of Trypanosomatid's Arginase in Polyamine Biosynthesis and Pathogenesis. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 181, p. 85-93, 2012.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. **Artmed: Porto Alegre**, 2ª ed., 2008.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Perspectives in Biochemistry and Biophysics. Families and Clans of Serine Peptidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 318, n. 2, p. 247-250, 1995.
- BEAULIEU, C. et al. Identification of Potent and Reversible Cruzipain Inhibitors for the Treatment of Chagas Disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 7444-7449, 2010.
- BENJAMIN, N.; WALLANCE, P. Plasma Nitric as a Marker of Nitric Oxide Production. **Lancet**, v. 344, n. 8927, p. 960, 1994.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235-242, 2000.
- BETHONY, J. M. et al. Vaccines to Combat the Neglected Tropical Diseases. **Immunological Reviews**, v. 239, p. 237-270, 2011.
- BISSANTZ, C.; KUHN, B.; STAHL, M. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. **Journal of Medicinal Chemistry Perspective**, v. 53, p. 5061-5084, 2010.
- BOCEDI, A. et al. Trypanothione Efficiently Intercepts Nitric Oxide as a Harmless Iron Complex in Trypanosomatid Parasites. **The FASEB Journal**, v. 24, p. 1035-1042, 2010.
- BOITZ, J. M. *Leishmania donovani* Ornithine Decarboxylase Is Indispensable for Parasite Survival in the Mammalian Host. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 2, p. 756-763, 2009.
- BORGES-VELOSO, A. et al. Proteolytic Profiling and Comparative Analyses of Active Trypsin-Like Serine Peptidases in Preimaginal Stages of *Culex quinquefasciatus*. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 123, p. 1-11, 2012.
- BRASIL. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**, Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnósticos Clínico e Diferencial, 2006.

BRÖMME, D. Papain-like Cysteine Proteases. **Current Protocols in Protein Science**, v. 21, n. 2, 2001.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. **Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure**, v. 32, p. 335-373, 2003.

BUXBAUM, L. U. et al. Cysteine Protease B of *Leishmania mexicana* Inhibits Host Th1 Responses and Protective Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 171, p. 3711-3717, 2003.

CAMERON, P. et al. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Macrophage IL-12 Production by *Leishmania mexicana* Amastigotes: The Role of Cysteine Peptidases and the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 3297-3304, 2004.

CARVALHO, L. P., et al Differential Immune Regulation of Activated T Cells Between Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis as a Model for Pathogenesis. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 5, p. 251–258, 2007.

CAZORLA, S. I. Redirection of the Immune Response to the Functional Catalytic Domain of the Cystein Proteinase Cruzipain Improves Protective Immunity against *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 1, p. 136-144, 2010.

CAZZULO, J. J. Proteinases of *Trypanosoma Cruzi*: Potential Targets for the Chemotherapy of Chagas Disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 1261-1271, 2002.

CHANG, K. P. et al. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, 85, p. 375–390, 2003.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral Leishmaniasis: What Are the Needs for Diagnosis, Treatment and Control. **Nature**, v. 5, p. S7-S16, 2007.

CHEN, K.; KURGAN, L. Investigation of Atomic Level Patterns in Protein-Small Ligand Interactions. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2009.

CHOE, Y. et al. Development of alpha-keto-Based Inhibitors of Cruzain, a Cysteine Protease Implicated in Chagas Disease. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 2141-2156, 2005.

CHOUDHURY, R. et al. *In Situ* Immunolocalization and Stage-Dependent Expression of a Secretory Serine Protease in *Leishmania donovani* and Its Role as a Vaccine Candidate. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 4, p. 660-667, 2010.

COETZER, T. H. T.; GOLDRING, J. P. D.; HUSON, L. E. J. Oligopeptidase B: A Processing Peptidase Involved in Pathogenesis. **Biochimie**, v. 90, p. 336-344, 2008.

COLONNA, M.; FACCHETTI, F. TREM-1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells): a New Player in Acute Inflammatory responses. **Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 2, p. 397-401, 2003.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine Metabolism in *Leishmania*: from Arginine to Trypanothione. **Amino Acids**, v. 40, p. 269-285, 2011.

COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Proteases in Trypanosomatids. In: Hide, G. et al. Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **London: CAB International**, 1997. p 176–197.

CROFT, S. L. PKDL – A Drug Related Phenomenon? **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, p. 10-11, 2008.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis Chemotherapy-Challenges and Opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1478-1483, 2011.

de AZEVEDO Jr., W. F. Virtual Screening Usando MolDock (Estudo da CDK2), 2009. Disponível em: <[http://azevedolab.dominiotemporario.com/doc/molegro\\_vs1.pdf](http://azevedolab.dominiotemporario.com/doc/molegro_vs1.pdf)> Acesso em: Jun.2012.

de AZEVEDO, M. M. M. **Nanoesferas e a Liberação Controlada de Fármacos**. 2002. 20f. Monografia – Instituto de Química da UNICAMP. Campinas. 2002.

de SOUZA, V. L., et al. Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, 2011.

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da Arte e Perspectivas no Desenvolvimento de Novos Fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DONG, X. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Prenylated Chalcones as Vasorelaxant Agents. **Arch. Pharm. Chem. Life Sciences**, v., 342, p. 428-432, 2009.

DOROUD, D. et al. C-Terminal Domain Deletion Enhances the Protective Activity of *cpa/cpb* Loaded Solid Lipid Nanoparticles against *Leishmania major* in BALB/c Mice. **Neglected Tropical Disease**, v. 5, n. 7, 2011.

dos SANTOS, S. M. C. M. **Estudo Computacional das Interações Proteína-Proteína**. 2010. 33f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa. 2010.

DOYLE, P. S. et al. The *Trypanosoma cruzi* Protease Cruzain Mediates Immune Evasion. **Plos Pathogens**, v. 7, n. 9, p. 1-11, 2011.

ESTEVA, M. I. et al. Benzophenone-Based Farnesyltransferase Inhibitors with High Activity against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 23, p. 7186-7191, 2005

ESTEVANATO, L. L. C. **Investigação da Biocompatibilidade de Polímeros de Albumina Magnéticos em Camundongos**. 2008. 101f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Biológicas da UnB. Brasília. 2008.

ESTEVÃO, M. S. et al. Indole Based Cyclooxygenase Inhibitors: Synthesis, Biological Evaluation, Docking and NMR Screening. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 823-833, 2012.

FRANÇA-COSTA, J. et al. Exposure of Phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* Isolates Is Associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis and Parasite Infectivity. **PLoS One**, v. 7, n. 5, 2012.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. New Delivery Strategies for the Old Pentavalent Antimonial Drugs. **Expert Opinion Drug Delivery**, v. 7, n. 12, p. 1343-1358, 2010.

GAZANION, E. et al. The *Leishmania* Nicotinamidase is Essential for NAD<sup>+</sup> Production and Parasite Proliferation. **Molecular Microbiology**, v. 82, p. 21–38, 2011.

GILLMOR, S. A.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. Structural Determinants of Specificity in the Cysteine Protease Cruzain. **Protein Science**, v. 6, p. 1603-1611, 1997.

GONTIJO, D. T. **Purificação e Caracterização Cinética da Calicreína Tecidual do Rato (Rk1) com Os Inibidores da Tripsina: Benzamidina, 4-Aminobenzamidina e 4-Nitrobenzamidina. Síntese e caracterização da 4-nitrobenzamidina**. 2005. 123f. Dissertação de mestrado - Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte. 2005.

GONZÁLEZ, J. et al. Proteasome-Dependent Cyst Formation and Stage-Specific Ubiquitin mRNA Accumulation in *Entamoeba invadens*. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, p. 897-904, 1999.

GONZÁLEZ, U. et al. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **The Cochrane Library**, 2009.

GREEN, L. C. et al. Analyses of Nitrate, Nitrite and <sup>15</sup>N Nitrate in Biological Fluids. **Anal. Biochem.**, v.126, p.131-138, 1982.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de Fármacos, Biotecnologia e Química Medicinal: Aplicações em Doenças Infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

HALPERIN, I. et al. Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 47; p. 409–443, 2002.

HAMILTON, C. J. et al. Time-dependent Inhibitors of Trypanothione Reductase: Analogues of the Spermidine Alkaloid Lunarine and Related Natural Products. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 2266-2278, 2005.

HANDOKO, S. D. et al. Quick Vina: Accelerating AutoDock Vina Using Gradient-Based Heuristics for Global Optimization. **Transactions on Computational Biology and Bioinformatics**, v. 9, n. 5, p. 1266-1272, 2012.

HEBY, O.; PERSSON, L.; RENTALA, M. Targeting the Polyamine Biosynthetic Enzymes: a Promising Approach to Therapy of African Sleeping Sickness, Chaga's Disease and Leishmaniasis. **Amino Acids**, v. 33, p. 359-366, 2007.

HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; BECKER, I. Linfocitos T Citotóxicos CD8<sup>+</sup> en la Leishmaniasis Cutánea. **Salud Pública Méx**, v. 48, n. 5, 2006.

HILL, A. D.; REILLY, P. J. A Gibbs Free Energy Correlation for Automated Docking of Carbohydrates. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 1131-1141, 2007.

HORTA, M. F. et al. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

HUANG, L.; BRINEN, L. S.; ELLMAN, J. A. Crystal Structures of Reversible Ketone-Based Inhibitors of the Cysteine Protease Cruzain. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 1, p.21-29, 2003.

HUET, J. et al. Structural Characterization of the *Papaya* Cysteine Proteinases at Low pH. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, p. 620–626, 2006.

ISMAIL, N. I. M. et al. A critical role for highly conserved Glu<sup>610</sup> residue of oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei* in thermal stability. **The Journal of Biochemistry**, v. 147, n. 2, p. 201-211, 2010.

KANG, L. et al. An Improved Adaptive Genetic Algorithm for Protein-Ligand Docking. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 23, p. 1-12, 2009.

KAPPAGODA, S.; SINGH, U.; BLACKBURN, B. G. Antiparasitic Therapy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 6, p. 561-583, 2011.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the Host-Pathogen Interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 604-615, 2011.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where Are We Today? **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, p. 177-185, 2010.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. **Human Vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1204-1214, 2011.

KERR, I. D. et al. Vinyl Sulfones as Antiparasitic Agents and a Structural Basis for Drug Design. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 38, p. 25697–25703, 2009.

KOROLKOVAS, A. Fundamentos de Farmacologia Molecular. **EDART, Ed. da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2ª ed., 1923.

JACKSON, L. K. et al. Altering the Reaction Specificity of Eukaryotic Ornithine Decarboxylase. **Biochemistry**, v. 39, n. 37, p. 11247-11257, 2000.

LI, M. et al. Purification and *In Situ* Immobilization of Papain with Aqueous Two-Phase System. **PlosOne**, v. 5, p. 1-10, 2010.

LILL, M. A. Efficient Incorporation of Protein Flexibility and Dynamics into Molecular Docking Simulations. **Biochemistry**, v. 50, p.6157-6169, 2011.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected Tropical Diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and Computacional Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. **Advanced Drug Discovery Reviews**, v. 23, p. 3-25, 1997.

LUQUE-ORTEGA, J. R. et al. New Benzophenone-Derived Bisphosphonium Salts as Leishmanicidal Leads Targeting Mitochondria through Inhibition of Respiratory Complex II. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 1788–1798, 2010.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de Resposta Imune às Infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p.647-664, 2004.

MANSOUR, T. E. Chemoterapeutic Targets in Parasites. **New York: Cambridge University Press**, 2002.

MARVEL, C. S.; SPERRY, W. M. **Organic Syntheses**, Coll. V. 1, 1941.

MATOS GUEDES, H. L. et al. Serine proteases of *Leishmania amazonensis* as immunomodulatory and disease-aggravating components of the crude LaAg vaccine. **Vaccine**, v. 28, p. 5491-5496, 2010.

McCONVILLE, M.; NADERER, T. Metabolic Pathways Required for the Intracellular Survival of *Leishmania*. **Annual Review of Microbiology**, v. 6, p. 543-561, 2011.

McKERROW, J. H. et al. Proteases in Parasitic Diseases. **Annual Review of Pathology : Mechanisms of Disease**, v. 1, p. 497-536, 2006.

McLUSKEY, K. et al. Crystal Structure of *Leishmania major* Oligopeptidase B Gives Insight into the Enzymatic Properties of a Trypanosomatid Virulence Factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 50, p. 39249-59, 2010.

MICHELS, P. A.; AVILÁN, L. The NAD<sup>+</sup> Metabolism of *Leishmania*, Notably the Enzyme Nicotinamidase Involved in NAD<sup>+</sup> Salvage, Offers Prospects for Development of Anti-Parasite Chemotherapy. **Molecular Microbiology**, v. 82, p. 4–8, 2011.

MONZOTE, L. et al. Antimicrobial Evaluation of the Polyisoprenylated Benzophenones Nemorosone and Guttiferone A. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 3, p. 458-462, 2011.

MOSHAGE, H.; KOK, B.; HUIZENGA, J. R.; JANSEN, P.L.M. Nitrite and Nitrate Determinations in Plasma: a Critical Evaluation. **Clinical Chemistry**, v. 41, p. 892-896, 1995.

MOTTRAM, J. C.; BROOKS, D. R.; COOMBS, G. H. Roles of Cysteine Proteinases of *Trypanosomes* and *Leishmania* in Host-Parasite Interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 455-460, 1998.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine Peptidases as Virulence Factors of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p. 375-381, 2004.

MUNDAY, J. C. Oligopeptidase B Deficient Mutants of *Leishmania major*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 175, p. 49-57, 2011.

MUYLDER, G. et al. A Screen against *Leishmania* Intracellular Amastigotes: Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 7, 2011.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11ed. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 8, p. 56.

OLENYIK, T.; GILROY, C.; ULLMAN, B. Oral Putrescine Restores Virulence of Ornithine Decarboxylase-Deficient *Leishmania donovani* in Mice. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 176, p. 109-11, 2011.

OLIN-SANDOVAL, V.; MORENO-SÁNCHEZ, R.; SAAVEDRA, E. Targeting Trypanothione Metabolism in Trypanosomatid Human Parasites. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 11, p. 1-17, 2010.

OPLETALOVÁ, V. et al. Study of Hydrophobic Properties of Biologically Active Open Analogues of Flavonoids. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 39, p. 61-64, 2013.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DAY, M. J. One Health: The Global Challenge of Epidemic and Endemic Leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 197, p. 1-10, 2011.

PANDEY, K. C. Centenary Celebrations Article: Cysteine Proteases of Human Malaria Parasites. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 35, n. 2, p. 94-103, 2011.

PATRICK, G.L. An Introduction to Medicinal Chemistry, **Oxford Univ. Press: New York**, 3th Ed., 2005

PEREIRA, B. A. S. et al. In silico predicted epitopes from the COOH-terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during

*Leishmania (Leishmania) amazonensis* experimental murine infection. **BioMed Central Immunology**, v. 12, n. 44, 2011.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 339-45, 2010.

PIERRI, C. L.; PARISI, G.; PORCELLI, V. Computational Approaches for Protein Function Prediction: A Combined Strategy from Multiple Sequence Alignment to Molecular *Docking*-Based Virtual Screening. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, p. 1695-1712, 2010.

POWERS, J. C. Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine and Threonine Proteases. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4639-4750, 2002.

PROSDOCIMI, F. et al. Bioinformática: Manual do Usuário. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p. 12-25, 2001.

RAI, S.; DWIVEDI, U. N.; GOYAL, N. *Leishmania donovani* Trypanothione Reductase: Role of Urea and Guanidine Hydrochloride in Modulation of Functional and Structural Properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 1474-1484, 2009.

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J. Evolutionary Families of Peptidases. **The Biochemical Journal**, v. 290, p. 205-218, 1993.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRET, A. J. MEROPS: the Peptidase Database. **Nucleic Acids Research**, v. 244, p. 270-272, 2006.

REBELLO, K. M. et al. Cysteine proteinases from promastigotas of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasitology Research**, v. 106, p. 95-104, 2009.

REIS, L. et al. Mecanismos Imunológicos na Resposta Celular e Humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006.

REY, L. **Leishmania e leishmanioses: os parasitos**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001

REZENDE, C. M. M. **Síntese de Derivados Benzofenônicos com Potencial Antifúngico e Anti-Leishmania**. 2012. 139f. Dissertação de mestrado – Instituto de Química da UNIFAL-MG. Alfenas. 2012.

ROBERTSON, C. D. The *Leishmania mexicana* Proteasome. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 103, p. 49-60, 1999.

ROCHA, L.G. et al. A Review of Natural Products with Antileishmanial Activity. **Phytomedicine**, v. 12, p. 514-535, 2005.

RODRIGUES, R. F. et al. Investigation of Trypanothione Reductase Inhibitory Activity by 1,3,4-Thiadiazolium-2-aminide Derivatives and Molecular *Docking* Studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1760-1766, 2012.

ROGERS, K. E. et al. Novel Cruzain Inhibitors for the Treatment of Chagas' Disease. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 80, p. 398-405, 2012.

SADIJ, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine Proteases of Parasitic Organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, p.1-21, 2002.

SANTOS, A. L. S. Protease expression by Microorganisms and its Relevance to Crucial Physiological/Pathological Events. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 48-58, 2011.

SANTOS, C. X. C. et al. Protein disulfide isomera (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of *Leishmania chagasi* promastigotes by macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, p. 989-998, 2009.

SCHARFSTEIN, J. et al. Kininogens Coordinate Adaptive Immunity through the Proteolytic Release of Bradykinin, an Endogenous Danger Signal Driving Dendritic Cell Maturation. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 2-3, p. 128-136, 2007

SEGUNDO, B. S. Role of Proteolytic Enzymes in Specific Developmental Processes in Plants. In **"Innovations in protease and their inhibitors"**. Ed. Avilés, F. X., Walter De Gruyter. New York, p. 349-367, 1993.

SEIFERT, K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 31-39, 2011.

SELZER, P. M. et al. *Leishmania major*. Molecular Modeling of Cysteine Proteases and Prediction of New Nonpeptide Inhibitors. **Experimental Parasitology**, v. 87, p. 212-221, 1997.

SHADAB, Md.; ALI, N. Evasion of Host Defence by *Leishmania donovani*: Subversion of Signaling Pathways. **Molecular Biology International**, p. 1-10, 2011.

SHIO, M. T. et al. Host Cell Signalling and *Leishmania* Mechanisms of Evasion. **Journal of Tropical Medicine**, p.1-14, 2012.

SHUKLA, A. K.; PATRA, S.; DUBEY, V. K. Biophysical and Folding Parameters of Trypanothione Reductase from *Leishmania infantum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 1, p. 13-23, 2011 a.

SHUKLA, A. K.; PATRA, S.; DUBEY, V. K. Evaluation of Selected Antitumor Agents as Subversive Substrate and Potential Inhibitor of Trypanothione Reductase: an Alternative Approach for Chemotherapy of Leishmaniasis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 352, n. 1-2, p. 261-270, 2011 b.

SILVA, C. R. et al. Genotoxic and Cytotoxic Safety Evaluation of Papain (*Carica papaya L.*) Using *In Vitro* Assays. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

SILVA-LOPEZ, R. E. et al. Effects of Serine Protease Inhibitors on Viability and Morphology of *Leishmania amazonensis* Promastigotes. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1627-1635, 2007.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: Novos Alvos para o Desenvolvimento Racional de Fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current Status of Available Drugs and New Potential Drug Targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 485-497, 2012.

SOLER, J. M. The Siesta Method for ab initio Order-N Materials Simulation. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 14, p. 2745-2779, 2002.

SOONG, L. Subversion and Utilization of Host Innate Defence by *Leishmania amazonensis*. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 58, p. 1-5, 2012.

SPINKS, D. et al. Investigation of Trypanothione Reductase as a Drug Target in *Trypanosoma brucei*. **Medicinal Chemistry**, p. 2060–2069, 2009.

SUKLA, A. K.; PATRA, S.; DUBEY, V. K. Deciphering Molecular Mechanism Underlying Antileishmanial Activity of *Nyctanthes arbotristis*, an Indian Medicinal Plant. **Journal of Ethnopharmacology**, 2011.

SWENERTON, R. K. et al. *Leishmania* Subtilisin is a Maturase for the Trypanothione Reductase System and Contributes to Disease Pathology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 41, 2010.

SWENERTON, R. K. et al. The Oligopeptidase B of *Leishmania* Regulates Parasite Enolase and Immune Evasion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 429-440, 2011.

TAVARES, L. C.; FERREIRA E. I. Relações Quantitativas Estrutura-Atividade: Fundamentos e Aplicação da Análise de Hansch, 2006. Disponível em: <[http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-II-1.pdf](http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-II-1.pdf)> Acesso em: jun.2012.

TEMPONE, A. G.; OLIVEIRA, C. M.; BERLINCK, R. G. S. Current Approaches to Discover Marine Antileishmanial Natural Products. **Planta Med.**, v. 77, p. 572-585, 2011.

TIUMAN, T. S. et al. Recent Advances in Leishmaniasis Treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 525-532, 2011.

TRANSUE, T. R. et al. X-ray and NMR Characterization of Covalent Complexes of Trypsin, Borate, and Alcohols. **Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 2829-2839, 2004.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDockVina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, p. 455-461, 2010.

TSUGE, H. et al. Inhibition Mechanism of Cathepsin L-Specific Inhibitors Based on the Crystal Structure of Papain-CLIK148 Complex. **Biochemistry Biophysical Research Community**, v. 266, p. 411-416, 1999.

URZÚA, A., et al. Antibacterial Properties of 3 H-Spiro[1-benzofuran-2,10-cyclohexane] Derivatives from *Heliotropium filifolium*. **Molecules**, v. 13, p. 2385–2393, 2008.

UYGUN, D. A. et al. Purification of Papain Using Reactive Green 5 Attached Supermacroporous Monolithic Cryogel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 552–563, 2012.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 309-322, 2012.

VANNIER-SANTOS, M. A. et al. The Putrescine Analogue 1,4-diamino-2-butanone Affects Polyamine Synthesis, Transport, Ultrastructure and Intracellular Survival in *Leishmania amazonensis*. **Microbiology**, v. 154, p. 3104-3111, 2008.

VENKATESAN, S. K.; SHUKLA, A. K.; DUBEY, V. K. Molecular *Docking* Studies of Selected Tricyclic and Quinone Derivatives on Trypanothione Reductase of *Leishmania infantum*. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 13, 2010.

VIEIRA, E. D. **Complexos de Cobre-Dipeptídeo como Sistemas Modelo para Interações Moleculares de Interesse Biológico: Estudos por Ressonância Paramagnética Eletrônica**. 2004. 85f. Dissertação de mestrado – Instituto de Física da USP. São Carlos. 2004.

WEIDLICH, S. et al. Environmental Control of Trypsin Secretion in the Midgut of the Two-Spotted Field Cricket, *Gryllus bimaculatus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p. 1477-1484, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **WHO**, Geneva. Cutaneous Leishmaniasis, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **WHO**, Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases, 2010.

YANG, Z. et al. Design, Synthesis, Antitumor Activity and Mode of Action of Novel Oxiranyl and Thiiranyl Phenol Derivatives. **Korean Chemistry Societat**, v.30, p.1463-1469, 2009.

YAZAKI, K.; SASAKI, K.; TSURUMARU, Y. Prenylation of Aromatic Compounds, a Key Diversification of Plant Secondary Metabolites. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1739–1745, 2009.

ZHANG, S. et al. DOVIS: An Implementation for High-Throughput Virtual Screening Using AutoDock. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 126, 2008.

ZUCCA, M.; SAVOIA, D. Current Developments in the Therapy of Protozoan Infections. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p.4-10, 2011.

**ANEXO 1 – Aprovação Comitê de Ética em Uso de Animais**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Alfenas/MG - CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299 1000 Fax: (35) 3299 1063



Alfenas, 05 de agosto de 2011.

Prof. Marcos José Marques

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 351/2011, intitulado “Avaliação da atividade leishmanicida de compostos derivados de benzofenonas” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

---

Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento  
Presidente do CEUA – Unifal-MG

**ANEXO 2 – Artigo de Autoria Própria Submetido**

Elsevier Editorial System(tm) for

Experimental Parasitology

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Biological Activity of Benzophenone Derivatives against  
Leishmania  
(L.) amazonensis and their Potential as Cysteine Protease Inhibitors

Article Type: Research Paper

Keywords: Leishmania, Benzophenones, biological activity, molecular  
docking, enzymatic inhibition.

Corresponding Author: Ms. Leticia Almeida, M.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Alfenas  
First Author: Leticia Almeida, M.D.

Order of Authors: Leticia Almeida, M.D.; Poliany G de Freitas, M.D.;  
Karina F Alves, Jr.; Claudia M Maciel-Rezende, M.D.; Francieli R Pires,  
Jr.; Danielle F Dias, PhD.; Nelson J Freitas da Silveira, PhD.; Claudio  
Viegas Jr., PhD.; Mario A Izidoro, PhD.; Marcelo H dos Santos, PhD.;  
Marcos J Marques, PhD.

Abstract: It is estimated that there are 350 million people at risk of leishmaniasis. Commercial drugs available for the treatment exhibit several drawbacks and therefore the development of new effective and low toxic drug candidates for the treatment of leishmaniasis is necessary. Since benzophenones have been described against several pathogens we considered this class of compounds as possible cysteine protease (CPs) inhibitors, as these enzymes, which include cruzain of *Trypanosoma cruzi*, play a key role in the growth of several parasites. Here we described molecular docking and inhibition studies of some benzophenone derivatives (1b, 1c, 2c and 3a) and two CPs (papain and cruzain), which showed the best activities against amastigotes forms of *Leishmania (L.) amazonensis* and low cytotoxic effect in mammalian cells(entre as testadas). Derivatives 1b and 1c showed significant inhibition activity, indicating that they can be exploited as leads for drug development.

## Cover Letter



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas . Unifal-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 . Alfenas/MG . CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Dear Prof. John Horton

Editor Experimental Parasitology

We are submitting our original manuscript entitled “**Biological Activity of Benzophenone Derivatives against *Leishmania (L.) amazonensis* and their Potential as Cysteine Protease Inhibitors**” for publication in Experimental Parasitology, according to the journals instruction. This work deals with the leishmanicidal *in vitro* activity of benzophenone derivatives, moreover the cytotoxic effect of these compounds were also tested. We also described the potential of these derivatives as papain/cruzain inhibitors by *in vitro* and *in silico* approaches.

This manuscript was not published elsewhere. We also declare no conflict of interest. We hope the style is adequate to Experimental Parasitology standards.

Sincerely,

---

Marcos José Marques

PhD.

Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas

Alfenas, Brazil

**\*Reviewer Suggestions**

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas . Unifal-MG**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 . Alfenas/MG . CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



## Reviewer Suggestions:

1- Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero

Universidade de Brasília – Brazil

gromero@unb.br

2 – Dr. André Gustavo Tempone

Instituto Adolfo Lutz

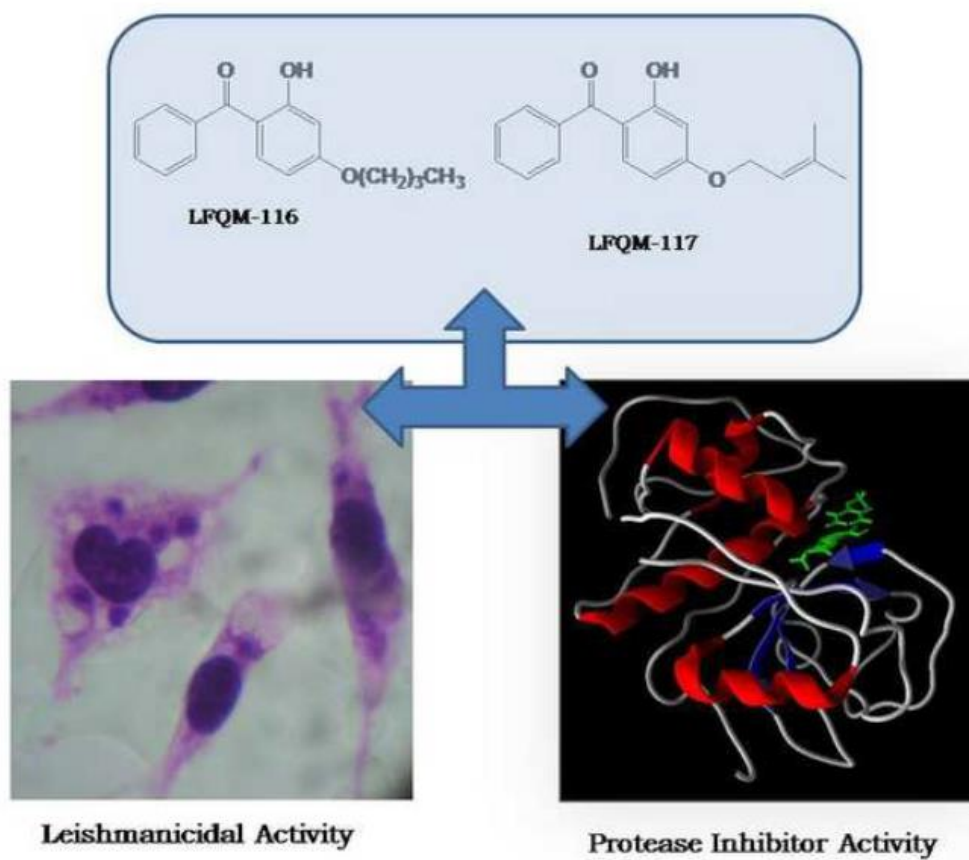
atempone@usp.br

3 – Célia Maria Ferreira Gontijo

Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz

gontijo@cpqrr.fiocruz.br

\*Graphical Abstract (for review)



**\*Research Highlights**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas . Unifal-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 . Alfenas/MG . CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



## Research Highlights

- 1- Chemical modifications have improved the leishmanicidal activity in derivatives benzophenones over the starting ones.
- 2 – Compounds LFQM-115 (**1a**), LFQM-120 (**2c**) and LFQM-116 (**1b**) exhibited strong leishmanicidal activity on amastigotes of *L. (L.) amazonensis*.
- 3 – Compounds LFQM-116 (**1b**) and LFQM-117 (**1c**) have to be highlighted due to their dual biological properties exhibiting leishmanicidal activity, and also inhibitory effects on cysteine proteases (papain and cruzain).

\*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

## **Biological Activity of Benzophenone Derivatives against *Leishmania (L.) amazonensis* and their Potential as Cysteine Protease Inhibitors**

Letícia de Almeida<sup>1</sup>, Poliany Graziella de Freitas<sup>4</sup>, Karina Ferreira Alves<sup>1</sup>, Claudia Mara Maciel-Rezende<sup>2</sup>, Francieli Ribeiro Pires<sup>2</sup>, Danielle Ferreira Dias<sup>2</sup>, Nelson José Freitas da Silveira<sup>4</sup>, Claudio Viegas Junior<sup>2</sup>, Mario Augusto Izidoro<sup>3</sup>, Marcelo Henrique dos Santos<sup>2</sup>, Marcos José Marques<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>*Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil*

<sup>2</sup>*Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal - Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil*

<sup>3</sup>*Laboratório de Biologia Celular de Parasitas - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, 04039-032, São Paulo-SP, Brazil*

<sup>4</sup>*Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil*

\* Correspondence author's e-mail: leticia.almeida.le@gmail.com

### **Abstract**

It is estimated that there are 350 million people at risk of leishmaniasis. Commercial drugs available for the treatment exhibit several drawbacks and therefore the development of new effective and low toxic drug candidates for the treatment of leishmaniasis is necessary. Since benzophenones have been described against several pathogens we considered this class of compounds as possible cysteine protease (CPs) inhibitors, as these enzymes, which include cruzain of *Trypanosoma cruzi*, play a key role in the growth of several parasites. Here we described molecular docking and inhibition studies of some benzophenone derivatives (**1b**, **1c**, **2c** and **3a**) and two CPs (papain and cruzain), which showed the best activities against amastigotes forms of *Leishmania (L.) amazonensis* and low cytotoxic effect in mammalian cells (entre as testadas). Derivatives **1b** and **1c** showed significant inhibition activity, indicating that they can be exploited as leads for drug development.

**Keywords:** *Leishmania*, Benzophenones, biological activity, molecular docking, enzymatic inhibition.

## 1 Introduction

Leishmaniasis is a vector-borne disease caused by more than 20 species of the protozoan parasite that belongs to family Trypanosomatidae and genus *Leishmania* (Alavi-Naini et al., 2012). Upon taking a blood meal, *Leishmania*-infected sandflies transmit the flagellated insect vector stage (promastigote form) through the skin of the vertebrate host. Following uptake of promastigotes by host macrophages, the parasites differentiate into ovoid, aflagellate forms (amastigote forms) that replicate into the macrophage phagolysosome (McKerrow et al., 2006). Species of *Leishmania* cause a broad spectrum of diseases ranging from cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis (Fedeli et al., 2010). An estimated 350 million people are at risk of infection and disease worldwide. The annual incidence is estimated at 1.5 - 2 million with 70.000 deaths each year (Seifert, 2011; WHO, 2010). Soon after realization that *Leishmania* causes this disease, generic pentavalent antimonials have been the cornerstone of leishmanial chemotherapy. In addition, sodium stibogluconate and meglumine antimoniate are the alternatives of generic antimonials. Amphotericin B and in its liposomal formulations and miltefosine are being used in the treatment as second choices (Singh et al., 2012).

Proteases are essential for all life forms of the parasite. They are involved in different steps of the multifaceted interaction events between microorganism and host structures, being considered as virulent attributes. Consequently, the biochemical characterization of these proteolytic enzymes is of interest not only for known proteases in general but also for understanding of their role in microbial infections and support a rational exploitation as targets for rational chemotherapy of microbial diseases (dos Santos, 2011).

The cysteine proteases (CPs) have a cysteine residue in the active center of the enzyme, with catalysis assisted by adjacent residues such as histidine and aspartic acid. Examples of cysteine proteases are papain, cruzain, calpains and cathepsins (Segundo, 1993). Papain is a cysteine protease isolated from papaya - *Carica papaya*. Papain has two domains separated by a slit, where the active site and catalytically important residues are cysteine (Cys25), histidine (His159) and aspartic acid (Asp175) (Rawlings et al., 2006; Uygun et al., 2012). The best-characterized CP in *T. cruzi* is cruzipain, also known as cruzain (Alvarez et al., 2012). It is involved in intracellular replication and differentiation, and is essential in all stages of the parasite life cycle (Assis et al., 2012). Cruzain has a high degree of sequence identity with some cathepsins, and an additional C-terminal extension of 130 amino acids, which is also found in some CP (CPB) of *Leishmania* (Alvarez et al., 2012).

Recently natural polyprenylated benzophenones isolated from some species of Clusiaceae family and *Garcinia brasiliensis*, exhibited a remarkable activity against *Staphylococcus aureus* and *Plasmodium falciparum* and both forms of *L. (L.) amazonensis*, respectively (Monzote et al., 2011; Pereira et al., 2010). Luque-Ortega and co-workers (Luque-Ortega et al., 2010) synthesized a series of benzophenone salts that revealed leishmanicidal activity, highlighting the higher susceptibility of amastigotes, as the pathological form of the parasite in vertebrates, over promastigote. The possible targets for benzophenone, however, have not been fully identified so far.

Herein we investigated whether – benzophenone derivatives – could target CPs of parasites. For that, we have evaluated the leishmanicidal activity and the cytotoxic effect on murine peritoneal macrophages of benzophenone derivatives (**1a-1c**; **2a-2c**; **3a-3c**). Molecular docking was also performed with the cysteine proteases representatives (papain and cruzain) and the derivatives **1b**, **1c**, **2c**, **3a**, which exhibited the best biological profile against amastigotes and low toxicity in murine macrophages. Moreover, they were evaluated as potential inhibitors of papain and cruzain.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Parasites and Macrophages

Promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/ 71973/ M2269) were grown on 24-wells plates in Schneider's Drosophila medium (SIGMA®, USA) supplemented with 10.00% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and 1.00% penicillin (10000 UI/mL)/streptomycin (10.00 mg/mL) (SIGMA®, USA).

Murine macrophages were isolated from peritoneal cavity of Swiss mice (Raychaudhury et al., 2005) and animal procedures were performed with the approval of the Ethics Committee from Universidade Federal de Alfnas in agreement the registry number 351/2011.

### 2.2 Chemicals

The hydroxylated benzophenones (**1-3**) were used in *O*-alkylation reactions to give alkylated benzophenone derivatives: 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (LFQM-115, **1a**); 2-hydroxy-4-*O*-butylbenzophenone (LFQM-116, **1b**); 2-hydroxy-4-*O*-(3,3-dimethyl)-allylbenzophenone (LFQM-117, **1c**); 4-methoxybenzophenone (LFQM-118, **2a**); 4-butoxybenzophenone (LFQM-119, **2b**); 4-*O*-(3,3-dimethyl)-allylbenzophenone (LFQM-120,

**2c**); 4,4'-di-methoxybenzophenone (LFQM-121, **3a**); 4,4'-di-butoxybenzophenone (LFQM-122, **3b**) and 4,4'-di-*O*-(3,3-dimethyl)-allylbenzophenone (LFQM-123, **3c**) (Table 2). Those derivatives were obtained by *O*-alkylation reactions kindly supplied by M. H. dos Santos, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Brazil, as described by Maciel-Rezende (Maciel-Rezende, unpublished results).

Papain (E.C.3.4.22.2 from *Carica papaya* latex) and the substrate carbobenzoxy-phenylalanil-arginyl-7-amido-4-methylcoumarin (Z-F-R-MCA) were commercially obtained from SIGMA® (St. Louis, USA). Cruzain (EC 3.4.22.51) was obtained from *Escherichia coli* kindly supplied by J. H. McKerrow, University of California, San Francisco, USA, and the recombinant protein purified essentially as described previously (Eakin et al., 1992). All other chemicals and solvents were obtained from commercial sources (SIGMA® or Merck). All the compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO).

### 2.3 Leishmanicidal activity against amastigotes

Murine peritoneal macrophages were maintained in RPMI-1640 medium (SIGMA®, USA) supplemented with 10.00% heat-inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin (10000UI/mL)/streptomycin (10.00 mg/mL) at 37°C in 5.00% CO<sub>2</sub>. Cells were cultured on 13 mm round coverslips in 24-well plates (Nunc, USA) to a cell density of 8 x 10<sup>5</sup> cells per well, and infected with late log-phase promastigotes of *L. (L.) amazonensis* at a multiplicity of infection of 10:1 (parasite/macrophage) for 24 h at 37°C in 5.00% CO<sub>2</sub>. Non-internalized promastigotes were removed by washing, and the compounds (**1a-1c**; **2a-2c**; **3a-3c**) solubilized in DMSO at the indicated dilutions were administered. The volume of DMSO added was 0.06% of the total volume of medium. After 72 h, the media were removed and cells were fixed in absolute methanol, stained with 10.00% Giemsa, and examined under a light microscope using an 100x magnification oil immersion objective. At least 200 macrophages were counted per well for calculating the percentage of infected macrophages. The percent of inhibition was calculated in relation to the control only with DMSO, for the determination of IC<sub>50</sub> value. All tests were performed in triplicate on three different occasions.

### 2.4 Evaluation of cytotoxicity

For the cytotoxicity assay a suspension of 8 x 10<sup>5</sup> murine peritoneal macrophages per mL, in RPMI-1640 medium supplemented with 10.0% heat-inactivated fetal bovine serum and 1.0% penicillin (10000 UI/mL)/streptomycin (10.00 mg/mL), were added to each well in

24-well plates containing coverslips. The plates were incubated in a 5.00% CO<sub>2</sub> at 37 °C. After 24 h, non-adherent cells were removed and wells washed twice. To each well the compounds **1-3** and **1a-1c**; **2a-2c**; **3a-3c** (in the range of 0.05 to 160.00 µg/mL) were added and the plates were incubated for 72 h. Then, 50.00 µL of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was added to each well at concentration of 5.00 mg/mL, followed by incubation for more 4 h. After this, the medium was removed and 1.00 mL of DMSO was added to each well and it was homogenized for 15 min. The absorbance at 570 nm of each individual well was used to calculate the percentage of inhibition according to the formula.

$$\%inhibition = \left( \frac{OD_{control} - OD_{benzophenone}}{OD_{control}} \right) \times 100$$

Each experiment was performed in triplicate, and the percentage of viable cells was calculated in relation to control cultures for the determination of CC<sub>50</sub> value. The control cultures were medium with just DMSO at the concentration of 0.60% v/v. All tests were performed in triplicate on three different occasions.

## 2.5 Security Factor (SF)

The security factor is the ratio between CC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> values (SF = CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>), where CC<sub>50</sub> is the concentration cytotoxic to 50.00% of the cells assessed in the cytotoxicity assay and IC<sub>50</sub> is the inhibitory concentration for 50.00% of the cells evaluated in the test of activity of compounds against amastigotes, considering the same substance. Values greater than or equal to 1.00 are considered satisfactory.

## 2.6 Molecular Docking

The crystal structures of the receptors shown in Table 1 were obtained from the PDB database (Protein Data Bank) (Berman et al., 2000) as template for the molecular docking with the benzophenone derivatives structures (**1b**, **1c**, **2c** and **3a**). Among the crystallographic structures containing water molecules and/or ligands were removed from conformations for carrying out docking simulations. The chemical structures of benzophenones were built by the program ChemSketch 10.0 ACDLabs (Acd/ChemSketch) and *ab initio* calculations were performed with the program Siesta 3.1 (Soler et al., 2002) to optimize the geometry and

energy minimization of structures. For the simulations of rigid-flexible docking the chemical structures of receptors and ligands were prepared with the tool AutoDockTools. The receptors were first modified by the addition of polar hydrogen and the ligands were released with freedom of rotation for the torsion angles to maintain the flexibility of the molecules. In addition, the grid maps energy of interaction with the receptors were defined 1.00 Å Grid spacing the grid points forming a box (Table 1) in interaction sites of receptors. Prepared with molecules, processes for docking were carried out by AutoDock Vina program (Trott et al., 2010). Best results of each calculation docking were grouped based on the root mean square deviation (RMSD) and conformation lowest interaction energy calculated from the score function contained in the algorithm of the AutoDock Vina program. Best results of each calculation docking were grouped based on the root mean square deviation (RMSD) and the conformation with lowest interaction energy calculated from the score function contained in the algorithm of the AutoDock Vina program.

## 2.7 Inhibition enzyme assay

Papain (1.00 μM) and cruzain (1.70 μM) were pre-activated with 5.00 mM of DTT for 5 minutes (each in buffer) and were assayed respectively in 50.00 mM sodium phosphate (pH 6.8), containing 10.00 mM of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and sodium phosphate buffer 50.00 mM (pH 6.2) besides 400.00 mM NaCl with 10.00 mM EDTA. The benzophenone derivatives (**1b**, **1c**, **2c** and **3a** - with concentrations ranging from 1.00 to 200.00 μM) were dissolved in DMSO and diluted in the enzymatic buffer. The reactions were carried out by following the fluorescence emission at 460 nm, excitation of 380 nm, in spectorfluoremeter model F-2500 (Hitachi, Japan), which indicates hydrolysis of the peptide substrate added to 10.00 μM Z-FR-MCA. The dosage of the activity of the enzymes was started by addition of this substrate in the reaction and the proteolytic activities remaining were monitored in a time of 600 seconds. The results collected were processed in the Grit software (Erithacus Software, Horley, Surrey, UK) version 5.0; which were expressed as IC<sub>50</sub> values in μM. These values can be defined as the concentration of inhibitor required to inhibit 50.00% of enzyme activity in the assay (as shown in Equation 1, where it is assumed that the value of y (enzyme activity remaining) decreases gradually with increasing the value of x (inhibitor concentration)).

Equation 1: 
$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^s}$$

## 2.7 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using nonlinear regression to obtain  $CC_{50}$ , amastigotes  $IC_{50}$  values, and enzymatic  $IC_{50}$  values. Analysis employed the followed by the Tukey's test, for the values comparisons. Differences were significant when the p value was less than 0.05.

## 3 Results and Discussion

The natural polyprenylated benzophenones isolated from *G. brasiliensis*, had been reported for their activity against *L. (L.) amazonensis*, and also with strong inhibitory activities of a typical cysteine protease (papain) (Pereira et al., 2010), suggesting that it could target the parasite cysteine. Whereas, another compounds isolated from *G. brasiliensis* showed highly inhibitory activity against recombinant cysteine protease (r-CPB2.8 and r-CPB3) of *Leishmania* (Gontijo et al., 2012). In contrast, a biflavone isolated from this same plant, fukugetin, inhibited a cysteine protease of *T. cruzi* - cruzain (Assis et al., 2012). Since antileishmanial activities that are being displayed by these natural compounds, new derivative benzophenones were evaluated for their activity against macrophages infected with *L. (L.) amazonensis*, and their potential as cysteine protease inhibitors.

The results of the inhibitory activity against amastigote forms of *L. (L.) amazonensis* and citotoxicity activity against peritoneal murine macrophages by **1-3** and **1a-1c**; **2a-2c**; **3a-3c** are shown on Table 2.

Some compounds (**1a**, **1b**, **1c**, **2b**, **2c** and **3c**) showed strong leishmanicidal activity presenting  $IC_{50}$  values ranging from 7.30 to 21.00  $\mu\text{g/mL}$  (Table 2). Despite the significant biological activity showed by these compounds, only derivative **2c** was considered to be an effective and promising derivative when compared to Amphotericin B against amastigotes of *L. (L.) amazonensis* ( $IC_{50} = 5.68 \mu\text{g/mL}$ ).

The derivatives **1c**, **3a**, **2c** and **1b** were 5.6-, 4.7-, 3.5- and 1.6-fold less cytotoxic, respectively, than Amphotericin B ( $CC_{50} = 25.00 \mu\text{g/mL}$ ), indicating that it is possible to modulate toxicity by adequate substitution on the phenolic hydroxyl groups in the benzophenone scaffold. Only derivative **1a** ( $CC_{50} = 24.60 \mu\text{g/mL}$ ) exhibited a highest

cytotoxicity related to the reference drug ( $p < 0.05$ ), while compounds **2a** ( $CC_{50} = 28.00 \mu\text{g/mL}$ ) and **2b** ( $CC_{50} = 28.90 \mu\text{g/mL}$ ) have shown closer values to Amphotericin B.

Due to the weak leishmanicidal activities exhibited by compounds **2a**, **3b** and **3c** and the high toxicity to mammalian cells observed for **1a**, **2a** and **2b**, these derivatives have not been evaluated for their enzymatic inhibitory potential or molecular docking. These activities could be an indication that lipophilicity resulting from the length of the substituent side chain on the benzophenone framework plays a decisive role in the ability of compounds to interact with the parasite. Thus, the most promising compounds **1b**, **1c**, **2c** and **3a** were further studied by molecular docking experiments as potential ligands for papain and cruzain as biomacromolecule targets (Table 3).

Following Luque-Ortega and co-workers (2010) we used the leishmanicidal test and the toxicity to mammalian cells to select the best derivatives to perform the enzymatic inhibition assay, and then identify new promising lead compounds to the development of leishmanicidal drugs. Additionally, the molecular docking can be used for a comparative study.

Like any other spontaneous process, a non-covalent binding event takes place only when it is associated with a negative binding Gibbs free energy ( $\Delta G$ ) (Bissantz et al., 2010). So, the lower the free energy of the interaction process, more spontaneously a ligand-receptor complex will be formed. In this context, the occurrence of Hydrogen bonds (H-bonds) plays a crucial role in molecular association, because it lies in an energy range intermediate, which permits to both associate and dissociate quickly at ambient temperatures. This twin ability renders the interaction well suited to achieving specificity of recognition within short time spans, a necessary condition for biological reactions (Desiraju; Steiner, 1999). Furthermore, experimental and theoretical data have shown that almost 70% of organic compound-protein complexes present the involvement of hydrogen bond interactions (Chen et al., 2009).

Compound **2c** should be the one forming the cruzain/papain-ligand complex formation more spontaneously, according to  $\Delta G$  values obtained from molecular docking (Table 3). This is followed by compounds **1c** and **1b**. However **2c** showed no H-bonds interaction with the most important residue of the papain's active site (Cys25), while the derivatives **1c** and **3a** exhibited significant interactions with another one (His159). Therefore, if were considering the  $\Delta G$  values and the H-bonds showed, the derivative **1c** would be the more potential inhibitor for papain. Whereas **1b** and **1c** showed H-bonds interactions with the residues the cruzain's active site (Cys25 and His159). So this both derivatives would be the more potential inhibitor for

cruzain. These interactions are illustrated in Figure 1 and 2 for papain and cruzain, respectively.

Similar results were obtained using molecular docking for the interaction of cruzain with fukugetin to confirm the sites of ligation between a cysteine protease, highlighting hydrogen bonds with the molecule and important enzyme's residues. Inhibitor enzymatic assay was also performed, and that compound inhibited cruzain with low  $IC_{50}$  value (Assis et al., 2012). Therefore, the analysis of the hydrogen bond interactions between the enzyme's active site and derivatives can provide us a good understanding about the protein-ligand interaction.

Furthermore the compounds (**1b**, **1c**, **2c** and **3a**) were also evaluated for their ability to inhibit cysteine proteases *in vitro* and the results expressed as an  $IC_{50}$  values ( $\mu\text{M}$ ) are shown in Table 4.

Inhibition of cysteine proteases is emerging as an important strategy to combat parasitic diseases such as Chagas' disease, and leishmaniasis. The identification of inhibitors of cysteine proteases trypanosomatids have been reported by several authors recently (Assis, et al., 2012; Gontijo, et al., 2012; Pereira et al., 2010). Some of them attribute the reduction of virulence by cysteine protease inhibitors and in other cases the induced cell death by cysteine cathepsin inhibitors (Bryson, et al., 2009; Schurigt, et al. 2010).

The *in vitro* biological data disclosed derivative **1b** as the most potent inhibitor candidate for both papain and cruzain, with  $IC_{50} = 27.91 \mu\text{M}$  and  $31.24 \mu\text{M}$ , respectively ( $p < 0.05$ ). Additionally, compound **1b** showed to be 1.5-fold more active than compound **1c** ( $IC_{50} = 42.78 \mu\text{M}$ ) for papain inhibition, while both compounds exhibited an almost equipotent inhibitory effect for cruzain (**1b** -  $IC_{50} = 31.24 \mu\text{M}$  and **1c** -  $IC_{50} = 33.69 \mu\text{M}$ ;  $p < 0.05$ ).

Taking all results together, derivatives **1b** and **1c** showed the best inhibitory activity for both cysteine proteases papain and cruzain, with a good agreement between molecular docking data and experimental results. Thus, this class of compounds could be considered as interesting and promising prototype candidates for the development of novel antileishmanial drugs. Moreover, compound **2c** exhibited as strong activity against amastigote forms of *L. (L.) amazonensis*, compared to Amphotericin B, but with significant low cytotoxicity than such drug reference. However, more studies are needed to understand the mechanism of action of this compound, since it apparently does not act as an inhibitor of proteases.

#### 4. Conclusions

In conclusion, the results presented in this work suggest that the benzophenone derivatives, due to its strong activity against amastigote forms of *L. (L.) amazonensis* represent a class of active and low toxic promising prototype candidates for the treatment of leishmaniasis. Among all compounds test, compounds LFQM-116 (**1b**) and LFQM-117 (**1c**) have to be highlighted due to their dual biological properties exhibiting leishmanicidal activity, and also inhibitory effects on cysteine proteases (papain and cruzain), confirmed by *in silico* and *in vitro* approaches. Further experiments are on course with compounds **1b** and **1c** that were selected for *in vivo* evaluation.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from Universal Project (CNPq, Brazil, #477876/2011-0) and Universal Projects (Fapemig, Brazil, #CEX-APQ-01072-08 and). The authors are also grateful for the fellowships granted by CAPES, CNPq, FAPEMIG. We also acknowledge Prof. Dr. Sergio Schenkman from Universidade Federal de São Paulo by article review.

#### References

- Acid/Chemsketch Freeware (2006). Version 10.00, Advanced Chemistry development, Inc., Toronto, On, Canada. www.Acdlabs.com.
- Alavi-Naini, R., Fazaeli, A., O'Dempsey, T., 2012. Topical Treatment Modalities for Old World Cutaneous Leishmaniasis: A Review. **Prague Med Rep** 113(2), 105-118.
- Alvarez, V. E., Niemirowicz, G. T., Cazzulo, J. J., 2012. The Peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive Enzymes, Virulence Factors, and Mediators of Autophagy and Programmed Cell Death. **Acta Biochim Biophys** 1824(1), 195-206.
- Assis, D. M., Gontijo, V. M., Pereira, I. O., Santos, J. A. N., Camps, I., Nagem, T. J., Ellena, J., Izidoro, M. A., Tersariol, I. L., Barros, N. M. T., Doriguetto, A. C., Santos, M. H., Juliano, M. A., 2012. Inhibition of cysteine proteases by a natural biflavone: behavioral evaluation of fukugetin as papain and cruzain inhibitor. **J Enzyme Inhib Med Chem**.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P. E., 2000. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res** 28, 235-242.
- Bissantz, C., Kuhn, B., Stahl, M., 2010. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. **J Med Chem Persp** 53, 5061-5084.
- Bryson, K., Besteiro, S., McGachy, H. A., Coombs, G. H., Mottram, J. C., Alexander, J., 2009. Overexpression of the Natural Inhibitor of Cysteine Peptidases in *Leishmania mexicana* Leads to Reduced Virulence and a Th1 Response. **Infect Immunol**, 77(7), 2971-2978.
- Chen, K., Kurgan, L., 2009. Investigation of Atomic Level Patterns in Protein-Small Ligand Interactions. **PLoS One** 4(2), 1-14.

Desiraju, G. R., Steiner, T., 1999. The Weak Hydrogen Bond In Structural Chemistry and Biology. **Oxford: Oxford University Press**. New York.

dos Santos, A. L. S., 2011. Protease expression by Microorganisms and its Relevance to Crucial Physiological/Pathological Events. **World J Biol Chem** 2(3) 48-58.

Eakin, A.E., Mills, A. A., Harth, G., McKerrow, J. H., Craik, C. S., 1992. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, 267, 7411-7420.

Fedeli, C. E. C., Ferreira, J. H. L., Mussalem, J. S., Longo-Maugéri, I. M., Gentil, L. G., dos Santos, M. R. M., Katz, S., Bárbieri, C. L., 2010. Partial protective responses induced by a recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Exp Parasitol** 124, 153-158.

Huang, L., Brinen, L. S., Ellman, J. A., 2003. Crystal structures of reversible ketone-Based inhibitors of the cysteine protease cruzain. **Bioorg Med Chem** 11(1), 21-29.

Luque-Ortega, J. R., Reuther, P., Rivas, L., Dardonville, C., 2010. New Benzophenone-Derived Bisphosphonium Salts as Leishmanicidal Leads Targeting Mitochondria through Inhibition of Respiratory Complex II. **J Med Chem** 53, 1788–1798.

McKerrow, J. M., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., Sajid, M., 2006. Proteases in Parasitic Diseases. **Annu Rev Pathol Mech Dis** 1, 497–536.

Monzote, L., Cuesta-Rubio, O., Matheussen, A., Van Assche, T., Maes, L., Cos, P., 2011. Antimicrobial Evaluation of the Polyisoprenylated Benzophenones Nemorosone and Guttiferone A. **Phytother Res** 25(3), 458-462.

Pereira, I., Assis, D., Juliano, M., Cunha, R., Bárbieri, C., Sacramento, L., Marques, M., Santos, M., 2010. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine** 17(5), 339-345.

Rawlings, N. D., Morton, F. R., Barret, A. J., 2006. MEROPS: the Peptidase Database. **Nucleic Acids Res** 244, 270-272.

Raychaudhury, B., Banerjee, S., Gupta, S., Datta, S. C., 2005 Antiparasitic Activity of a Triphenyl Tin Complex against *Leishmania donovani*. **Acta Trop** 95, 1-8.

Schuriqt, U., Schad, C., Glowa, C., Baum, U., Thomale, K., Schnitzer, J. K., Schultheis, M., Schaschke, N., Schirmeister, T., Moll, H., 2010. Aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine cathepsin inhibitors induce cell death in *Leishmania major* associated with accumulation of debris in autophagy-related lysosome-like vacuoles. **Antimicrob Agents Chemother**, 54(12), 5028-5041.

Segundo, B. S., 1993. Role of Proteolytic Enzymes in Specific Developmental Processes in Plants. In **“Innovations in protease and their inhibitors”**. Ed. Avilés, F. X., Walter De Gruyter. New York 349-367.

Seifert, K., 2011. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. **Open Med Chem J** 5, 31-39.

Singh, N., Kumar, M., Singh, R. K., 2012. Leishmaniasis: Current Status of Available Drugs and New Potential Drug Targets. **Asian Pac J Trop Med** 2012, 485-497.

Soler, J. M., Artacho, E., Gale, J. D., García, A., Junquera, J., Ordejón, P., Sánchez-Portal, D., 2002. The Siesta method for *ab initio* order-N materials simulation. **J Phys Condens Matter** 14, 2745-2779.

Trott, O., Olson, A. J., 2010. AutoDockVina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J Comput Chem** 31, 455-461.

Tsuge, H., Nishimura, T., Tada, Y., Asao, T., Turk, D., Turk, V., Katunuma, N., 1999. Inhibition mechanism of cathepsin L-specific inhibitors based on the crystal structure of papain-CLIK148 complex. **Biochem Biophys Res Commun** 266(2), 411-416.

Uygun, D. A., Akduman, B., Uygun, M., Akgol, S., Denizli, A., Purification of Papain Using Reactive Green 5 Attached Supermacroporous Monolithic Cryogel. **Appl Biochem Biotechnol** 167, 552–563.

World Health Organization, **WHO**, 2010. Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases.

Figure  
[Click here to download high resolution image](#)

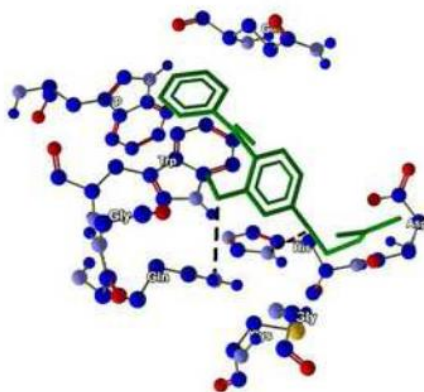
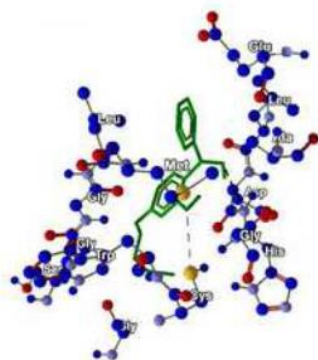


Figure  
[Click here to download high resolution image](#)



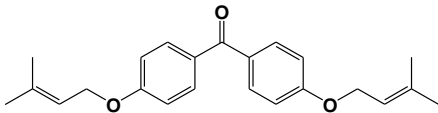
## Tables

**Table 1.** PDB code of the receptors with their respective resolutions and grid points.

<b>Receptor</b>	<b>PDB Code</b>	<b>Resolution (Å)</b>	<b>Grid Points (Å)</b>
Papain	1CVZ <sup>(Tsuge et al., 1999)</sup>	1.70	22 x 28 x 26
Cruzain	1ME3 <sup>(Huang et al., 2003)</sup>	1.20	18 x 18 x 18

**Table 2.** Chemical structure, biological activity of benzophenones and Amphotericin B against amastigotes of *L. (L.) amazonensis* (IC<sub>50</sub>) and macrophages (CC<sub>50</sub>).

Compound	Chemical Structure	IC <sub>50</sub> <sup>*</sup> (µg/mL)	CC <sub>50</sub> <sup>**</sup> (µg/mL)	Security Factor (SF)
1		nd	> 160.00	nd
LFQM-115 (1a)		10.19 ± 1.27 <sup>*, a</sup>	24.60 ± 1.94 <sup>**</sup>	2.41
LFQM-116 (1b)		11.78 ± 0.94 <sup>*, a</sup>	40.60 ± 1.85 <sup>**</sup>	3.45
LFQM-117 (1c)		21.00 ± 0.95 <sup>*, b</sup>	140.06 ± 2.80	6.67
2		nd	> 160.00	nd
LFQM-118 (2a)		> 40.00 <sup>*, c</sup>	28.00 ± 2.08 <sup>**</sup>	0.70
LFQM-119 (2b)		14.90 ± 1.34 <sup>*, d</sup>	28.90 ± 1.50 <sup>**</sup>	1.94
LFQM-120 (2c)		7.30 ± 0.92 <sup>e</sup>	87.10 ± 2.52	11.93
3		nd	> 160.00	nd
LFQM-121 (3a)		16.00 ± 0.58 <sup>*, f</sup>	116.20 ± 2.18 <sup>**</sup>	7.26
LFQM-122 (3b)		> 40.00 <sup>*, g</sup>	> 160.00	4.00

LFQM-123 (3c)		> 40.00 <sup>*,g</sup>	> 160.00	4.00
Amphotericin B		5.68	25.00	4.40

---

\*\* Values of biological activity that differ statistically from their starting compound when  $p < 0,05$  by Tukey's test.

\* Values of biological activity that differ statistically from drug reference when  $p < 0,05$  by Tukey's test. And values followed by the same letter are statistically equal to each other when  $p < 0,05$  by Tukey's test.

**Table 3.**  $\Delta G$  values, atoms involved in, energy and length of the hydrogen bond (Hbond) obtained from molecular docking experiments.

Compounds	Enzyme	$\Delta G$ (Kcal/mol)	Atom (ligand)	Atom (receptor)	Energy of the Hbond	Length of the Hbond (Å)
LFQM-116 (1b)	Papain	- 6.30	O (7)	O (Gly20)	- 1.85	3.23
			O (19)	N (Trp177)	- 2.39	2.81
			O (19)	N (Gln19)	- 2.31	3.14
	Cruzain	- 6.30	O (7)	N (His159)	- 0.89	3.08
			O (19)	S (Cys25)	- 0.43	3.51
			O (19)	N (Gly160)	- 0.15	3.18
LFQM-117 (1c)	Papain	- 6.50	O (14)	N (His159)	- 1.34	3.11
			O (20)	N (Gln19)	- 1.50	3.30
	Cruzain	- 6.30	O (7)	N (His159)	- 0.24	3.55
			O (20)	S (Cys25)	- 0.11	3.18
			O (20)	N (Gly160)	- 0.61	3.19
LFQM-120 (2c)	Papain	- 6.70	*	*	*	*
	Cruzain	- 6.30	O (14)	N (Gly66)	- 0.05	3.55
LFQM-121 (3a)	Papain	- 5.90	O (16)	N (His159)	- 1.22	2.98
	Cruzain	- 6.10	O (9)	N (His159)	- 0.81	3.01

\* No Hbond interactions.

**Table 4.** IC<sub>50</sub> values for *in vitro* inhibitory effects of compounds **1b**, **1c**, **2c** and **3a** on papain and cruzain.

Compound	Values of IC <sub>50</sub> (μM)	
	Papain	Cruzain
LFQM-116 ( <b>1b</b> )	27.91 <sup>a</sup>	31.24 <sup>a</sup>
LFQM-117 ( <b>1c</b> )	42.78 <sup>b</sup>	33.69 <sup>b</sup>
LFQM-120 ( <b>2c</b> )	72.14 <sup>c</sup>	40.79 <sup>c</sup>
LFQM-121 ( <b>3a</b> )	253.55 <sup>d</sup>	ni

ni means without inhibition

\* Values followed by the same letter are statistically equal to each other when  $p < 0,05$  by Tukey's test.

#### Supplementary Material

[Click here to download Supplementary Material: Legends.doc](#)

Figure 1. Interactions between papain and LFQM-117 (**1c**). Carbon atoms are shown in blue, Nitrogen in lilac, Oxygen in red, Sulfur in yellow. Ligand represented in green. Hydrogen interactions are represented in black, highlighting the residues of the protein involved in this interaction.

Figure 2. Interactions between cruzain and LFQM-116 (**1b**). Carbon atoms are shown in blue, Nitrogen in lilac, Oxygen in red, Sulfur in yellow. Ligand represented in green. Hydrogen interactions are represented in black, highlighting the residues of the protein involved in this interaction.

## ANEXO 3 – Artigo de Co-Autoria Submetido

## Graphical Abstract

Leave this area blank for abstract info.

### Synthesis and Biological Evaluation against *Leishmania amazonensis* of a Series of Alkyl-Substituted Benzophenones

Claudia Mara Maciel-Rezende<sup>1,2</sup>, Letícia de Almeida<sup>3,4</sup>, Ederson Costa D’Martin<sup>2</sup>, Francieli Ribeiro Pires<sup>1</sup>, Karina Ferreira Alves<sup>4</sup>, Claudio Viegas Junior<sup>1,5</sup>, Danielle Ferreira Dias<sup>1,5</sup>, Antônio Carlos Doriguetto<sup>5</sup>, Marcos José Marques<sup>4,6</sup>, Marcelo Henrique dos Santos<sup>1,7,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal – LFQM, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil

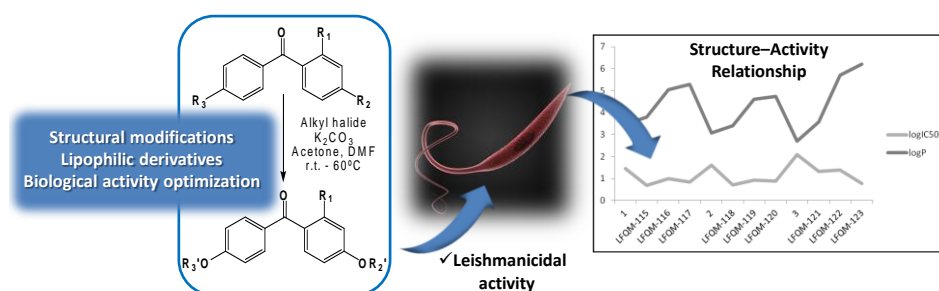
<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos

<sup>5</sup>Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil

<sup>6</sup>Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil

<sup>7</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil





## Synthesis and Biological Evaluation against *Leishmania amazonensis* of a Series of Alkyl-Substituted Benzophenones

Claudia Mara Maciel-Rezende<sup>1,2</sup>, Letícia de Almeida<sup>3,4</sup>, Ederson Costa D'Martin<sup>2</sup>, Francieli Ribeiro Pires<sup>1</sup>, Karina Ferreira Alves<sup>4</sup>, Cláudio Viegas Junior<sup>1,5</sup>, Danielle Ferreira Dias<sup>1,5</sup>, Antônio Carlos Doriguetto<sup>5</sup>, Marcos José Marques<sup>4,6</sup>, Marcelo Henrique dos Santos<sup>1,7,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal – LFQM, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos

<sup>5</sup>Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil

<sup>6</sup>Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil

<sup>7</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil

\* Correspondence author's e-mail: marcelo\_hs@yahoo.com.br

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received

Received in revised form

Accepted

Available online

#### Keywords:

Benzophenones Derivatives

Leishmaniasis

*Leishmania amazonensis*

### ABSTRACT

Nine *O*-alkyl and *O*-prenyl derivatives were synthesized from commercial 2,4-, 4-, e 4,4'-hydroxybenzophenones and were evaluated for their leishmanicidal activity against promastigote forms of *Leishmania amazonensis*, as well their toxicity in murine macrophages. All derivatives exhibited better biological activity than their hydroxylated benzophenones precursors, and compound LFQM-123 (**3c**) was 250-fold more active than its precursor 4,4'-di-hydroxybenzophenone (**3**). Moreover, some of the results were comparable to the standard drug Amphotericin B, suggesting that the increase in lipophilicity could facilitate protozoa membrane permeation. In this study we confirmed that benzophenones derivatives exhibit leishmanicidal properties, with relatively low toxicity, and thus could be exploited as promise prototypes for the design and development of new drug for the treatment of leishmaniasis.

2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Leishmaniasis is a parasitosis transmitted by several species of the protozoan genus *Leishmania* and is endemic in 88 tropical, subtropical countries around the world. Recent rough estimates point for a Global prevalence of 12 million infected people and other 350 million at risk. This infectious disease is

characterized by both diversity and complexity, due to different clinical syndromes that could be developed for more than 20 leishmanial species, transmitted to humans by more than 30 different species of phlebotomine sandflies.<sup>1</sup> An important point to be considered is that in most of cases, infected people live in countries with sanitary and fragile governmental health systems,

which are close related to the high taxes of morbidity and mortality of the disease.

After transmission from the insect, all species of *Leishmania* change from the flagellar promastigote form to the amastigote form and are internalized mainly in the macrophages. Then, they can multiply and survive in the secondary phagolysosomes and infiltrate to infect other surrounding macrophages.<sup>2</sup> The disease occurs in four main clinical forms: cutaneous leishmaniasis, muco-cutaneous leishmaniasis, visceral leishmaniasis (VL) and diffuse cutaneous leishmaniasis. Visceral leishmaniasis, also known as kala-azar, is caused *L. donovani* and *L. infantum* and is the most serious infection form of the disease. In VL, the patient generally presents symptoms of persistent infections, including fever, appetite and weight loss, hepatomegaly, hypergamaglobulinemy, weakness, fatigue, and death if untreated.<sup>2,3</sup> *Leishmania brasiliensis* is responsible for the most cases of muco-cutaneous leishmaniasis, one of the most common clinical manifestation in Brazil and other tropical countries. *Leishmania amazonensis* is a member of the *Leishmania Mexicana* complex and the etiological agent for a broad-spectrum of leishmaniasis in South American countries.<sup>4</sup> In Brazil, *L. amazonensis* infection can cause two distinct clinical forms of cutaneous leishmaniasis: localized cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis.<sup>5</sup>

Chemotherapy is the current basis for the treatment of leishmaniasis, and effective anti-leishmanial vaccines are still under study and development.<sup>6</sup> Pentavalent antimonial drugs are the first choice treatment for leishmaniasis,<sup>2</sup> and resistance arise is frequently a problem in endemic areas. Amphotericin B and pentamidine are the second choice drugs, and have their therapeutic effectiveness limited by high toxicity and difficulties in administration.<sup>2</sup> In this context, and due to the restricted therapeutic alternatives and high toxicity of the current medicines, the search in biodiversity for new active compounds and extracts against *Leishmania* is a current field in Natural Products and Medicinal Chemistry.<sup>6,7</sup> In a recent communication, our group showed that natural polyprenylated benzophenones like guttiferone-A, 7-*epi*-clusianone and garciniaphenone isolated from the fruits of *Garcinia brasiliensis*, exhibited leishmanial activity against amastigote and promastigote forms of *L.*

*amazonensis*, and 7-*epi*-clusianone was the most active compound.<sup>8</sup> In another work, Luque-Ortega and co-workers<sup>9</sup> synthesized a series of benzophenone salts that revealed that the presence of more lipophilic substituents clearly contribute for the increase in leishmanicidal activity. In this work, we report the synthesis of a series of methyl, butyl and prenyl-derivatives of 2,4-dihydroxybenzophenone (**1**), 4-hydroxybenzophenone (**2**) and 4,4'-di-hydroxybenzophenone (**3**) and their biological evaluation against *Leishmania* and cytotoxicity.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Experimental

The reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) performed on silica gel 60 F254 (Merck®). Melting points (in °C) were determined using a Mettler melting point apparatus (Mettler–Toledo, Leicester, UK) and are uncorrected. Chromatography was performed on silica gel 60, 0,063-0,200 mm, ACROS®. NMR spectrum was recorded on a BRUKER Avance DPX 200 spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) with reference to tetramethylsilane (TMS). The coupling constants are reported in hertz (Hz) and signal multiplicities are reported as singlet (s), doublet (d), doublet of doublet (dd), multiplet (m).

#### General procedure for conduction of *O*-alkylation reactions:

To a stirred solution of hydroxylated benzophenones (1.0 mmol) in DMF/acetone (1:2 v/v) was added potassium carbonate (2.0 eq.) and alkyl chloride or bromide (1.5 to 3.0 eq.) at room temperature. The reaction mixture was kept at 60 °C monitored by TLC up to total consumption of starting benzophenone. Then, reaction mixture was partitioned between ethyl acetate and H<sub>2</sub>O, and the organic layers were combined, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure. The resulting crude residue was purified by silica gel column chromatography using hexane and ethyl acetate (8.5:1.5) as eluent to give the alkylated benzophenone derivative (Table 1).

**Table 1.** Chemical data for benzophenone derivatives **1a-3c**

$\text{Alkyl halide, K}_2\text{CO}_3$   
 $\xrightarrow[\text{r.t. - 60}^\circ\text{C}]{\text{Acetone, DMF}}$

Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	Yield (%)
LFQM-115 ( <b>1a</b> )	OH	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	51
LFQM-116 ( <b>1b</b> )	OH	OH	H	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	H	83
LFQM-117 ( <b>1c</b> )	OH	OH	H	OCH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	46
LFQM-118 ( <b>2a</b> )	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	48
LFQM-119 ( <b>2b</b> )	H	OH	H	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	H	63
LFQM-120 ( <b>2c</b> )	H	OH	H	OCH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	51
LFQM-121 ( <b>3a</b> )	H	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	91
LFQM-122 ( <b>3b</b> )	H	OH	OH	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	73
LFQM-123 ( <b>3c</b> )	H	OH	OH	OCH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	76

**2.1.1 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone** (LFQM-115, **1a**) yellow crystalline solid. **Mp** 58°C; **IR** (**KBr**)  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>) 1256 ( $\nu$  C-O-C); 1620 ( $\nu$  C=O); 2864 ( $\nu$  CH<sub>3</sub>). **CG-MS m/z** (%) 105(5); 77(14); 228(25); 31(100). **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>; **200 MHz**)  $\delta$  3.8(s; H-8); 6.3(d, *J* 2.4Hz; H-3); 6.4 (d; *J* 2.4Hz; H-5); 6.5 (t; *J* 2.4Hz; H-6); 7.5(t; *J* 0.8 Hz; H-3' and H-5'); 7.6 (d; *J* 2.0 Hz; H-2' and H-6'). **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>; **200 MHz**)  $\delta$  56.9 (C-3); 108.6 (C-5); 114.4 (C-1); 129.5 (C-2' and C-6'); 130.1 (C-3' and C-5'); 132.7 (C-4'); 136.5 (C-1'); 139.5 (C-6'); 167.5 (C-2); 167.6 (C-4); 201.3 (C-7).

**2.1.2 2-hydroxy-4-*O*-butylbenzophenone** (LFQM-116, **1b**) pale yellow crystalline solid. **Mp** 71°C; **UV** (EtOH; **0.1 %**)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 324 (0.24); 289 (0.15) and 243 (0.21) nm. **IR** (**KBr**)  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>) 2800 ( $\nu$  C-H); 1624 ( $\nu$  C=O); 1266 ( $\nu$  C-O-C). **CG-MS m/z** (%): 105 (5); 77 (14); 228 (25); 31(100). **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, **200MHz**)  $\delta$  0.98 (t; *J* 7.3Hz; H-11); 1.4 (sex.; *J* 7.2 Hz; H-10); 1.7 (q; *J* 7.5 Hz, H-9); 4.0 (t; *J* 6.5 Hz, H-8); 6.4 (H-3; H-5); 7.7 (d, *J* 2.4 Hz; H-6); 7.5 (d; *J* 6.2 Hz; H-2'; H6'); 7.7 (t; *J* 4.0 Hz; H-4). **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, **200 MHz**)  $\delta$  16 (C-11); 17.4 (C-10); 21.8 (C-9); 70.7 (C-8); 96.8 (C-3); 102.7 (C-5); 113.9 (C-1);

130.1 (C-3'; C-5'); 129.7 (C-2'; C-6'); 129.5 (C-6); 135.3 (C-1'); 151.2 (C-2); 167.6 (C-4); 202.3 (C-7).

**2.1.3 2-hydroxy-4-*O*-(3,3-dimethyl)-allylbenzophenone** (LFQM-117, **1c**) white crystalline solid. **Mp** 88°C; **UV** (EtOH; **0.1 %**)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 322 (0.25); 288 (1.70) and 243 (0.22) nm. **IR** (**KBr**)  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>) 2914 ( $\nu$  C-H); 1600 ( $\nu$  C=O); 1271 ( $\nu$  C-O-C). **CG-MS m/z** (%) 282 (1); 77 (5); 105 (5); 137 (6); 69 (50); 213 (60); 41 (100). **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>; **200 MHz**)  $\delta$  1.8 (s; H-11); 1.8 (s; H-12); 4.5 (d; *J* 6.8 Hz; H-8); 5.4 (m; H-9); 6.4 (d; *J* 2.0 Hz; H-3); 6.5 (d; H-5); 6.6 (d; H-6); 7.5 (m; H-4'); 7.6 (t; *J* 2.9 Hz; H-3'; H-5'); 7.7 (d; *J* 1.6 Hz, H-2'; H-6'). **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>; **200 MHz**):  $\delta$  18.9 (C-11); 23.0 (C-12); 66.1 (C-8); 120.1 (C-9); 141.9 (C-10); 104.3 (C-3); 105.7 (C-5); 110.7 (C-1); 129.1 (C-3'; C-5'); 129.7 (C-6); 163.8 (C-4); 130.1 (C-2' and C-6'); 133.4 (C-4'); 137.4 (C7).

**2.1.4 4-methoxybenzophenone** (LFQM-118, **2a**) yellow crystalline solid. **Mp**. 183°C; **UV** (EtOH; **0.1 %**)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 416 (25); 288 (0.13), 252 (0.24); 224 (0.20); 204 (0.09) nm. **IR** (**KBr**)  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>) 2968; 2935; 2845 ( $\nu$  C-H); 1649 ( $\nu$  C=O); 1259 ( $\nu$  C-O-C). **CG-MS m/z** (%) 69 (50); 31 (90); 41 (100); 212

(100).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz)  $\delta$  3.8 (s; H-8); 6.9 (d;  $J$  8.6 Hz; H-3; H-5); 7.4 (d;  $J$  6.8 Hz; H-2; H-6); 7.5 (t;  $J$  6.5 Hz; H-3'; H-5'); 7.8 (t;  $J$  8.8 Hz; H-4').  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz)  $\delta$  56.9 (C-8); 117.7 (C-3; C-5); 129.2 (C-2; C-6); 131.4 (C-2; C-6); 129.8 (C-2'; C-6') 138.7 (C-4'); 143.5 (C-1'); 169.4 (C-4); 201.5 (C-7)

**2.1.5 4-butoxybenzophenone** (LFQM-119, **2b**) pale yellow crystalline solid. **Mp.** 65°C; **UV** (**EtOH**; 0.1 %)  $\lambda_{\text{max}}$  (**log  $\epsilon$** ) 416 (-0.0005); 290 (0.09); 226 (0.09); 204 (0.2) nm. **IR** (**KBr**)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2962; 2926 ( $\nu$  C-H); 1635 ( $\nu$  C=O); 1247 ( $\nu$  C-O-C). **CG-MS** **m/z** (%): 77(30), 105(25), 121(100), 254(1).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz)  $\delta$  1.0 (t;  $J$  7.3 Hz; H-11); 1.5 (sex;  $J$  7.2 Hz, H-10); 1.7 (q,  $J$  8 Hz; H-9); 4.0 (t;  $J$  6.5 Hz; H-8); 6.9 (d;  $J$  8.8 Hz; H-3; H-5); 7.7 (d;  $J$  2.4 Hz, H-2; H-6); 7.5 (d;  $J$  7.4 Hz; H-2'; H-6'); 7.4 (t;  $J$  7.1 Hz; H-3'; H-5'); 7.5 (t;  $J$  6.5 Hz; H-4').  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz)  $\delta$  14.3 (C-11); 20.4 (C-10); 32.4 (C-9); 66.9 (C-8); 115.2 (C-3; C-5); 129.4 (C-2; C-6); 130.9 (C-3'; C-5'); 132.8 (C-4'); 133.6 (C-1'); 166.4 (C-4); 195.5 (C-7).

**2.1.6 4-O-(3,3-dimethyl)-allylbenzophenone** (LFQM-120, **2c**) white crystalline solid. **Mp.** 179°C; **UV** (**EtOH**; 0.1 %)  $\lambda_{\text{max}}$  (**log  $\epsilon$** ) 416 (-0.0005); 290 (0.02); 250 (0.01) nm. **IR** (**KBr**)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2976; 2943 ( $\nu$  C-H); 1598 ( $\nu$  C=O); 1255 ( $\nu$  C-O-C). **CG-MS** **m/z** (%) 266 (1); 41(15); 105(20); 198(55); 121(65); 69(73).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz)  $\delta$  1.7 (s; H-11 or H-12); 4.5 (d;  $J$  6.8 Hz; H-8); 5.5 (t;  $J$  6.8 Hz; H-9); 6.9 (d;  $J$  8.8 Hz; H-3; H-5); 7.4 (d;  $J$  7.2 Hz; H-2; H-6); 7.5 (d;  $J$  7.2 Hz; H-2'; H-6'); 7.5 (d;  $J$  7.2 Hz; H-3; H-5); 7.7 (t;  $J$  3.3 Hz; H-4').  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz)  $\delta$  19.5 (C-11); 27.1 (C-12); 66.3 (C-8); 120.2 (C-9); 139.1 (C-10); 115.5 (C-3; C-5); 129.4 (C-2; C-6); 133.0 (C-1); 131.2 (C-2'; C-6); 133.1 (C-4'); 163.8 (C-4); 195.9 (C-7).

**2.1.7 4,4'-di-methoxybenzophenone** (LFQM-121, **3a**) yellow crystalline solid. **Mp.** 68°C; **IR** (**KBr**)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2924 ( $\nu$  C-H); 1637 ( $\nu$  C=O); 1253 ( $\nu$  C-O-C). **CG-MS** **m/z** (%): 242 (1); 77 (10); 135 (25); 31 (100).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz)  $\delta$  3.8 (s; H-8; H-8'); 6.9 (d;  $J$  8.8 Hz; H-3; H-5; H-3'; H-5'); 7.8 (d;  $J$  8.8 Hz; H-2; H-6; H-2'; H-6').  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz)  $\delta$  56.7 (C-11); 114.4 (C-3; C-5; C-3'; C-5'); 131.7 (C-2; C-6; C-2'; C-6'); 133.4 (C-4; C-4'); 195.7 (C-7).

**2.1.8 4,4'-di-butoxybenzophenone** (LFQM-122, **3b**) pale yellow crystalline solid. **Mp.** 151°C; **IR** (**KBr**)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2933 ( $\nu$  C-H); 1637 ( $\nu$  C=O); 1249 ( $\nu$  C-O-C).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz)  $\delta$  0.9 (t;  $J$  7.3 Hz; H-11; H-11'); 1.4 (sex;  $J$  7.3 Hz; H-10; H-10'); 1.8 (d;  $J$  7.2 Hz; H-9; H-9'); 4.0 (t;  $J$  6.4 Hz; H-8; H-8'); 6.9 (d;  $J$  8.8 Hz; H-3; H-5; H-3'); 7.0 (d;  $J$  8.8 Hz; H-2; H-6; H-2' and H-6').  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz)  $\delta$  14.6 (C-11 e C-11'); 19.9 (C-10 e C-10'); 31.4 (C-9 e C-9'); 68.7 (C-8 e C-8'); 114.6 (C-3; C-5; C-3'; C-5'); 131.3 (C-2; C-6; C-2' and C-6'); 132.9 (C-1 e C-1'); 163.2 (C-4 and C-4'); 195.2 (C-7).

**2.1.9 4,4'-di-O-(3,3-dimethyl)-allylbenzophenone** (LFQM-123, **3c**) white crystalline solid. **Mp.** 99°C; **IR** (**KBr**)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2933 ( $\nu$  C-H); 1637 ( $\nu$  C=O); 1249 ( $\nu$  C-O-C).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz)  $\delta$  1.7 (s; H-11; H-11'; H-12; H-12'); 4.5 (d;  $J$  6.8 Hz; H-8; H-8'); 5.5 (t; H-9; H-9'); 6.9 (d;  $J$  8.8 Hz; H-3; H-5 and H-3'; H-5'); 7.7 (d;  $J$  8.8 Hz, H-2; H-2'; H-6 and H-6').  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz)  $\delta$  18.8 (C-11; C-11'); 26.4 (C-12; C-12'); 65.5 (C-8; C-8'); 119.6 (C-9; C-9'); 139.3 (C-10; C-10'); 114.6 (C-3; C-5 and C-3'; C-5'); 131.2 (C-2; C-6; C-2' and C-6'); 132.7 (C-1; C-1'); 162.7 (C-4; C-4'); 195.0 (C-7).

## 2.2 Biological Evaluation

### 2.2.1 Culture of *Leishmania* and *in vitro* assay

Promastigote forms of *L. amazonensis* (MHOM/BR/71973/ M2269) were grown on a 24-wells plate in Schneider's Drosophila medium (SIGMA®, USA) supplemented with 10.0% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and 1.0% penicillin (10000 UI/ mL)/streptomycin (10.0 mg/mL) (SIGMA®, USA). Cells were harvested in the log phase, re-suspended in fresh medium, counted in Neubauer's chamber and adjusted to a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL. Compounds **1-3** and **1a-3c** were added to promastigote cultures, at  $1 \times 10^6$  cells/mL, solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) (the concentration used was 0.6%, v/v in all wells) and incubated at 25°C. After 72 h of incubation, the surviving parasites were counted in a Neubauer's chamber and compared with controls and DMSO in a concentration of 0.6% v/v, for the determination of 50.0% inhibitory growth concentration ( $\text{IC}_{50}$ ). All tests were performed in triplicate and Amphotericin B (Eurofarma) was used as the reference drug.

### 2.2.2 Evaluation of cytotoxicity

For the cytotoxicity assay a suspension of  $8 \times 10^5$  cells/mL of murine peritoneal macrophages, in RPMI 1640 medium, supplemented with 10.0% heat-inactivated fetal bovine serum and 1.0% penicillin (10000 UI/mL)/streptomycin (10mg/mL) were added to each well in 24-well plates, on the glass slides of 13 mm. The plates were incubated in a 5.0% CO<sub>2</sub> air mixture at 37 °C to adhesion of the cells. After 24 h, the non-adherent cells were removed by washing with the RPMI 1640 medium. Thus, several concentrations of compounds **1-3** and **1a-3c** (in the range of 0.05 to 160.0 µg/mL) were added to the wells containing the cells. All target compounds were solubilized in DMSO at a final concentration of 0.6% v/v and the plates were incubated for more 72 h. Then, the non-adherent cells were removed by washing with the RPMI 1640 medium and 50.0 µL of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was added to each well at concentration of 5.0 mg/mL, followed by incubation for more 4 h, as described by Mossman.<sup>11</sup> After this, the medium was retired and 1 mL of DMSO was added to each well and it was homogenized for 15 min. Next, the absorbance of each individual well, minus the control value, was calculated in according to the next formula at 570 nm.

$$\%inhibition = \left( \frac{OD_{control} - OD_{drugs}}{OD_{control} \times 100} \right)$$

Each experiment was performed in triplicate, and the percentage of viable cells was calculated in relation to control cultures in the medium with just DMSO at the concentration of 0.6% v/v.

### 2.2.3 Statistical analysis

The leishmanicidal activities of compounds were expressed as the concentration that inhibits the growth of 50.0% of protozoan form. Statistical analysis was performed using nonlinear regression to obtain the values of IC<sub>50</sub> and CC<sub>50</sub> (cytotoxic concentration for 50.0% of macrophages), followed by variance analyses and Tukey's test. Differences were significant when the p value was lower than 0.05.

### 2.3. Evaluation of lipophilicity by cLogP (oct/water)

Lipophilicity values were estimated through theoretical determination of cLogP (oct/wat) by using the QikProp

program.<sup>10</sup> The QikProp program calculates the cLogP (oct/wat) values from regression equations using experimental data and molecule physical descriptors (hydrogen bond counts, atom types and charges, rotor counts, etc.) through Monte Carlo statistical mechanics simulations.<sup>11</sup> Calculated lipophilicity expressed by cLogP (oct/wat) of compounds **1-3** and **1a-3c** are showed on Table 2.

## 3 Results and Discussion

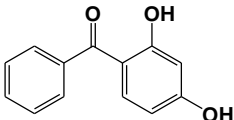
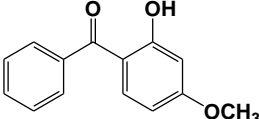
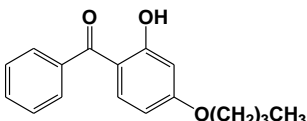
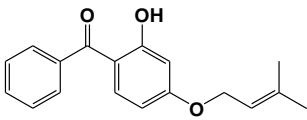
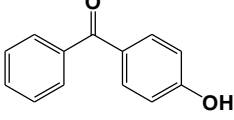
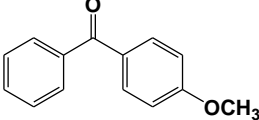
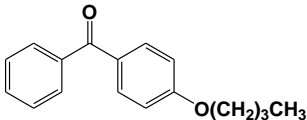
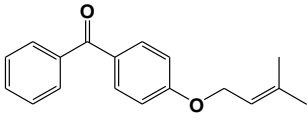
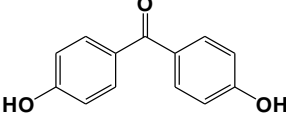
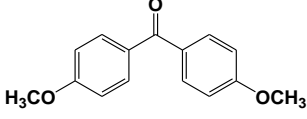

Considering that there is no vaccine available to prevent leishmaniasis, discovery of new effective and low toxic drugs for the treatment this neglected disease is an urgent need.<sup>12</sup> Despite natural and synthetic benzophenones are not commonly reported for their leishmanicidal properties, in the last years some works from literature have showed that many benzophenone-derivatives could be interesting for the development of new anti-protozoan agents.<sup>13</sup> In our work, we could confirm that benzophenone derivatives **1a-3c** with one or two hydroxyl groups in positions C-4 and/or C-4' on the benzophenone skeleton exhibit a marked inhibitory activity against *Leishmania*, being more active than the starting hydroxylated benzophenones **1-3**, and with low toxicity.

Antiprotozoal activity of compounds **1-3** and **1a-3c** were evaluated *in vitro* against promastigote forms, and also for cytotoxicity in macrophages. Biological data evidenced that methylation, butylation and prenylation on the hydroxyl groups in C-4 and/or C-4' position in the original hydroxybenzophenones **1-3** resulted in more active and low toxic compounds, compared to their precursors **1-3** (Table 2).

Among the twelve compounds tested, compound **1a** showed to be the most active one with an IC<sub>50</sub>= 4.90 µg/mL, but also exhibiting the highest toxicity (CC<sub>50</sub>= 24.60 µg/mL), with comparable values of potency and cytotoxicity to Amphotericin B (IC<sub>50</sub>= 4.70 µg/mL; CC<sub>50</sub>= 25.00 µg/mL), despite the weaker activity when compared to Pentamidine (IC<sub>50</sub>= 0.44 µg/mL). Besides derivative **1a**, compounds **1c** (IC<sub>50</sub>= 7.05 µg/mL; CC<sub>50</sub>= 140.00 µg/mL), **2a** (IC<sub>50</sub>= 5.05 µg/mL; CC<sub>50</sub>= 28.00 µg/mL) and **3c** (IC<sub>50</sub>= 5.94 µg/mL; CC<sub>50</sub>= 160.00 µg/mL) also showed significant inhibitory properties against promastigote forms of *L. amazonensis*, with a relatively high toxicity observed for **2a**. Considering a security index (SI), expressed by the ratio between cytotoxicity (CC<sub>50</sub>) and anti-leishmanial potency (IC<sub>50</sub>), compound **3c** exhibited the best biological profile, with a SI= 26.93, followed by compound **1c** (SI= 19.86) in comparison to all

other benzophenone derivatives and to standard drugs Amphotericin B (SI= 5.32) and Pentamidine (SI= 8.68).

**Table 2.** Chemical structure, biological and cLog P data for benzophenone derivatives **1-3** and **1a-3c**, compared to Amphotericin B and Pentamidine.

Compound	Chemical Structure	IC <sub>50</sub> (μg/mL) <sup>a</sup>	Cytotoxicity <sup>b</sup>	cLog P <sup>c</sup>
<b>1</b>		29.00 ± 6.66	> 160.00	3.46
LFQM-115 ( <b>1a</b> )		4.90 ± 0.72 <sup>*</sup>	24.60 ± 1.94 <sup>**</sup>	3.79
LFQM-116 ( <b>1b</b> )		9.80 ± 1.83 <sup>*</sup>	40.60 ± 1.85 <sup>**</sup>	5.04
LFQM-117 ( <b>1c</b> )		7.05 ± 0.44 <sup>*</sup>	140.06 ± 2.80	5.29
<b>2</b>		40.92 ± 1.67	> 160.00	3.07
LFQM-118 ( <b>2a</b> )		5.05 ± 0.21 <sup>*</sup>	28.00 ± 2.08 <sup>**</sup>	3.40
LFQM-119 ( <b>2b</b> )		8.56 ± 0.18 <sup>*</sup>	28.90 ± 1.50 <sup>**</sup>	4.60
LFQM-120 ( <b>2c</b> )		7.82 ± 0.50 <sup>*</sup>	87.10 ± 2.52	4.73
<b>3</b>		121.36 ± 6.33	> 160.00	2.71
LFQM-121 ( <b>3a</b> )		21.30 ± 0.70 <sup>*</sup>	116.20 ± 2.18 <sup>**</sup>	3.57
LFQM-122 ( <b>3b</b> )		23.80 ± 8.90 <sup>*</sup>	> 160.00	5.71

LFQM-123 ( <b>3c</b> )		$5,94 \pm 1.31^*$	> 160	6,21
Amphotericin B		4.70	25.00	---
Pentamidine		0.44	3.82	---

<sup>a</sup> anti-leishmanicidal activity against promastigote forms of *L. amazonensis*

<sup>b</sup> Cytotoxicity against murine macrophages

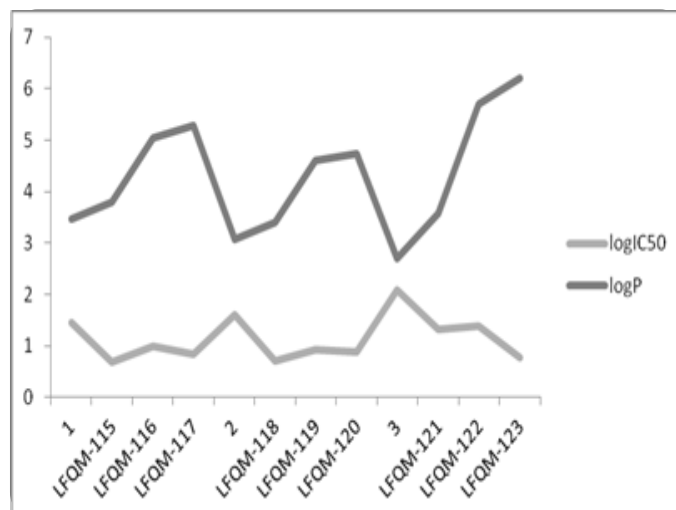
<sup>c</sup> Calculated lipophilicity expressed by cLogP (oct/wat) by using QikProp program version 3.2

\* Values marked with one asterisk means that the derivative differs statistically from their starting compound when  $p < 0,05$  by Tukey's test.

\*\* Values marked with two asterisk means that the derivative differs statistically from their starting compound when  $p < 0,05$  by Tukey's test.

A comparative analysis of biological data set also showed that molecular modifications led to more cytotoxic compounds, as evidenced by almost all monoalkylated derivatives in comparison to the starting hydroxybenzophenones **1** and **2**. As shown in table 2, except for compound **1c** ( $CC_{50} = 140.00 \mu\text{g/mL}$ ), all other monoalkylated derivatives showed a significant increase in cytotoxicity, ranging from 1.8 to 6.5-fold toxic in macrophages when alkyl substituents were introduced in C-4 position of benzophenones **1** and **2**. Probably this observation could be explained by an increase in lipophilicity as a consequence of alkylation of hydroxyl groups, as evidenced by cLog P values estimated by QikProp program (Table 2). An increase in lipophilicity could explain the marked increase in leishmanicidal and cytotoxic activity by facilitate the passage of active molecules through the cell membrane barrier. A close relation between lipophilicity and antioxidant activity was also reported by Úrzua and co-workers<sup>12</sup> when they evaluated the antimicrobial activity of a series of spiro-benzofuran derivatives. On the other hand, an increase in molecular volume and lipophilicity seems to have a synergistic important role in cellular selectivity as evidenced by di-alkylated compounds **3a-3c** that showed to be active against *Leishmania* with low cytotoxicity. This observation was more evident for compound **3c**, substituted by two prenyl moieties at C-4 and C-4' position and with a cLog P = 6,21, that exhibited the best biological profile, showing the be 20-fold more potent than original benzophenone **3**, against promastigote forms of *L. amazonensis*, along with the lowest cytotoxicity. This compound also showed anti-leishmanial activity comparable to Amphotericin B, despite of the weaker activity related to Pentamidine.

In our study it was evidenced that an increase in the size of side chain substituents led to a proportional increase in lipophilicity and anti-leishmanial potency, as showed in Figure 1.



**Figure 1.** Comparative analysis between variation in cLog P and anti-leishmanial activity of compounds **1-3** and **1a-3c**.

#### 4. Conclusions

Nine alkylated-benzophenone derivatives (compounds **1a-3c**) were prepared in good chemical yields from commercial 2,4-dihydroxybenzophenone (**1**), 4-hydroxybenzophenone (**2**) and 4,4'-dihydroxybenzophenone (**3**). All synthetic derivatives **1a-3c** exhibited a remarkable inhibition of the growth of promastigote forms of *L. amazonensis* with the highest anti-leishmanial activity evidenced for compounds **1a**, **1c**, **2a** and **3c**. The most highlighted results seems to be for compound **3c** that showed the best relationship between anti-leishmanial and cytotoxicity against macrophages, with represent a good indicative for therapeutic index for the development of a new drug candidate prototype. In a comparative analysis of all results,

it was evidenced that variation in lipophilicity of the target molecules was an important requisite for modulation of antileishmanial activity and toxic effects in macrophages. In early studies, Pereira and co-workers<sup>9</sup> showed that benzophenones with higher lipophilicity present highest activities against *Leishmania* species, which could in fact be related to the ease to come in the macrophage and to reach the parasite. In this context, further studies should be conducted to better understand the mechanism of action of these molecules and their effectiveness against amastigote forms of *Leishmania*. For both, will be used compounds with low cytotoxicity and increased activity in *Leishmania* promastigotes forms. Thus, these series of benzophenone derivatives could be explored as new drug prototype candidates to antileishmanial agents with easy access from commercial starting materials, good lead to new bioactive chemical entities with low toxicity and good selectivity.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from Universal Project (CNPq, Brazil, #477876/2011-0) and Universal Projects (Fapemig, Brazil, #CEX-APQ-01072-08 and). The authors are also grateful for the fellowships granted by CAPES, CNPq, FAPEMIG.

#### References and notes

- Desjeux, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Com. Immunol. Microbiol. Infect Dis.* 2004, 27, 305-18.
- Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R. W.; Alvar, J.; Boelaert, M. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007, 5, 873-82.
- Modabber, F. Leishmaniasis. *Tropical Diseases Research Progress World Health Organization. Geneve.* 1993, 77-87.
- Soong, L. Subversion and Utilization of Host Innate Defense by *Leishmania amazonensis*. *Front Immunol.* 2012, 3, 58.
- França-Costa, J. et al. Exposure of Phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* Isolates Is Associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis and Parasite Infectivity. *PLoS One.* 2012, 7.
- Carvalho, G.J.A.; Carvalho, M. G.; Ferreira, D.T.; Faria, T.J.; Braz-Filho, R. Diterpenos, triterpenos e esteroides das flores de *Wedelia paludosa*. *Quim Nova.* 2001, 24, 24-26.
- Rocha, L. G.; Almeida, J.R.G.S.; Macedo, R.O.; Barbosa-Filho, J.M.A. Review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine.* 2005, 12, 514-35.
- Pereira, O. I., Marques, M. J., Pavan A.I., Codonho, B.S., Barbieri, C.L., Beijo, L.A., Doriguetto, A.C., D'Martin, E.C., dos Santos, M.H. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garciniabrasiliensis* Mart. *Fruits. Phytomedicine.* 2010, 17, 339-45.
- Luque-Ortega, J.R. et al. New Benzophenones-derived Bisphosphonium Salts as Leishmanicidal Leads Targeting Mitochondria through inhibition of Respiratory Complex II. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2010, 53, 1788-98.
- Urzúa, A., Echeverría, J., Rezende, M.C., Wilkens, M., 2008. Antibacterial properties of 3 H-Spiro[1-benzofuran-2,10-cyclohexane] derivatives from *Heliotropium filifolium*. *Molecules.* 2008, 13, 2385-93.
- Jorgensen, W. L.; Du, E. M. *Bioorg. Med. Chem.* 2000, 10, 1155-58.
- Croft, S.L.; Sundar, S.; Fairlamb, A.H., Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19, 111-26.
- Chan-Bacab; M.J., Peña-Rodríguez, L.M.; Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep.* 2001, 18, 674-88.
- Larregina, A.T., L.D. Falo, Jr. Dendritic cells in the context of skin immunity. In *Dendritic Cells*, 2nd Ed. M. T. Lotze and A.T. Thomson, eds. Academic Press. London. 2001, 301-14.

**ANEXO 4 – Artigo em Preparo para Submissão**

Antibacterial, antifungal and leishmanicidal activity of the hydroethanolic extracts of the stems, leaves, inflorescence and roots from *Leonotis nepetifolia* (L.) Br.

Diego Pinto de Oliveira<sup>a</sup>, Letícia de Almeida<sup>b</sup>, Marcos José Marques<sup>b</sup>, Roberta Ribeiro de Carvalho<sup>c</sup>, Amanda Latércia Dias Tranches<sup>c</sup>, Marcelo José Dias Silva<sup>d</sup>, Marcelo Aparecido da Silva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> College of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas-MG, 37130-000 Alfenas, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Biological Sciences, Laboratory of Molecular Biology, Federal University of Alfenas-MG, 37130-000, Alfenas, Brazil.

<sup>c</sup> Department of Biological Sciences, Laboratory of Microbiology, Federal University of Alfenas-MG, 37130-000, Alfenas, Brazil.

<sup>d</sup> University Julio de Mesquita Filho - UNESP. Chemical Institute, Araraquara, SP. Brazil.

\*Corresponding author at: Marcelo Aparecido da Silva, Federal University of Alfenas-MG, Street Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Alfenas, Minas Gerais, Brazil. Telephone: 35 3291-1346, CEP: 37130-000,

E-mail adress: marcelo.silva@unifal-mg.edu.br