

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CAMILA DE MORAIS COELHO

**DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS LEISHMANICIDAS: ESTUDOS
COMPUTACIONAIS POR MODELAGEM MOLECULAR, SÍNTESE QUÍMICA
E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS DO EUGENOL.**

Alfenas/MG

2017

CAMILA DE MORAIS COELHO

**DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS LEISHMANICIDAS: ESTUDOS
COMPUTACIONAIS POR MODELAGEM MOLECULAR, SÍNTESE QUÍMICA
E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS DO EUGENOL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração: Química Medicinal

Mestranda: Camila de Moraes Coelho

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Paranho Veloso

Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho

Colaborador: Prof. Dr. Ihosvany Camps Rodriguez.

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Coelho, Camila de Moraes

Desenvolvimento de protótipos leishmanicidas: estudos computacionais por modelagem molecular, síntese química e avaliação farmacológica de novos derivados do eugenol / Camila de Moraes Coelho. – Alfenas/MG, 2017.
173 f.

Orientadora: Marcia Paranho Veloso
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal de Alfenas, 2017.
Bibliografia.

1. Leishmaniose. 2. Biologia Computacional. 3. Ésteres. 4. Bases de Mannich. I. Veloso, Marcia Paranho. II. Título.

CDD-615.19

CAMILA DE MORAIS COELHO

“DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS LEISHMANICIDAS: ESTUDOS COMPUTACIONAIS POR MODELAGEM MOLECULAR, SÍNTESE QUÍMICA E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS DO EUGENOL”

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.

Aprovado em: 04/08/2017

Profa. Dra. Márcia Paranho Veloso

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 


Prof. Dr. Wagner Alves de Souza Júdice

Instituição: UMC

Assinatura: 

Profa. Dra. Danielle Ferreira Dias

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

RESUMO

A Leishmaniose consiste em uma patologia negligenciada com elevada incidência mundial, constituindo um problema de saúde pública em Minas Gerais e em todo Brasil por apresentar um alto grau de morbidade e mortalidade e um escasso arsenal terapêutico. Os parasitos da espécie *Leishmania* possuem enzimas essenciais ao crescimento e à viabilidade celular que podem ser investigadas como alvo de novos fármacos. Esta dissertação buscou identificar moléculas bioativas que apresentem um perfil de afinidade em alvos moleculares relacionados à Leishmaniose, utilizando as ferramentas da Modelagem Molecular e da Bioinformática, seguido de síntese destas substâncias candidatas a fármacos leishmanicidas e avaliação *in vitro*. Os estudos de Modelagem Molecular avaliaram os perfis de afinidade de uma série de derivados do eugenol proposta com alvos biológicos selecionados, entre elas as enzimas de *Leishmania* CRK3, tripanotiona sintetase, arginase e cisteíno protease rCPB2.8, por meio de ancoramento molecular. As enzimas CRK3 e cisteíno protease rCPB2.8 foram prevista pela técnica de modelagem por homologia utilizando um modelo e múltiplos modelos, respectivamente, devido à ausência de uma estrutura cristalográfica desta proteína em banco de dados. As estruturas cristalográficas das proteínas arginase e tripanotiona sintetase foram obtidas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB). Para a obtenção dessas novas substâncias químicas levou-se em consideração o planejamento de uma rota sintética simples e reprodutível. Foi obtido uma série de ésteres de base de Mannich do eugenol, compostos contendo como substituintes grupamentos doadores de elétrons bem como grupamentos retiradores de elétrons e de diferente eletronegatividade e volume. As novas substâncias foram elucidadas estruturalmente utilizando ferramentas espectroscópicas. O estudo de atividade farmacológica permitiu verificar que os compostos SBM2, SBM3, SBM4, SBM5, SBM8, SBM11 e SBM13 possuem atividade leishmanicida antipromastigota, e apenas o composto SBM3 apresentou atividade inibitória satisfatória sobre a enzima rCPB2.8 na concentração de 100 µM. Foi verificado também o aumento da atividade da enzima rCPB2.8 exercida pelos compostos intermediário 2, SBM4, SBM8 e

SBM9, que pode estar relacionada com a interação destes compostos em um sítio alostérico. Dentre as cavidades estudadas presentes na superfície da enzima rCPB2.8, uma possível região de interação com micromoléculas, localizada próxima ao resíduo de LYS159, apresentou um perfil de interação com os compostos similar ao observado nos estudos *in vitro*.

Palavras-chave: Leishmaniose. Modelagem molecular. Éster. Base de Mannich.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected pathology with a high incidence worldwide, constituting a governmental health problem in Minas Gerais and in the whole country as well, because of the high degree of morbidity and mortality and a scarce therapeutic arsenal. There are enzymes essential for cell growth and viability of *Leishmania* that are investigated as targets for new drugs. This thesis aimed to identify compounds that had leishmanicidal activity, using Molecular Modeling and Bioinformatics tools, followed by synthesis and *in vitro* evaluation of its pharmacological activity. The aim of the Molecular Modeling study is to evaluate the interaction of the compounds with some biological targets (CRK3, trypanothione synthetase, arginase and rCPB2.8 enzymes). The three-dimensional structures of the CRK3 and rCPB2.8 enzymes were predicted by homology modeling, since there are no crystal structures of these proteins deposited in a database. The crystallographic structures of the arginase and trypanothione synthase proteins were obtained from the Protein Data Bank (PDB). The planning of a simple and reproducible synthetic route was taken into account in the production of these substances. The Mannich base esters bearing different substituents at the para-disubstituted ring moiety were investigated, varying the substituents with electron donating groups as well as electron withdrawing groups of different electronegativity. The new substances were structurally elucidated using spectroscopic tools. The study of pharmacological activity made it possible to verify that the compounds SBM2, SBM3, SBM4, SBM5, SBM8, SBM11 and SBM13 have antipromastigote activity, and only the compound SBM3 showed inhibitory activity on the enzyme rCPB2.8 in the concentration of 100 μ M. Activation of the enzyme rCPB2.8 exerted by intermediates 2, SBM4, SBM8 and SBM9 was also verified, which may be related to the interaction of these compounds in an allosteric site. Among the studied binding pockets in the surface of the rCPB2.8, one presented an interaction profile similar to that observed by *in vitro* studies, located in the region of the lysine residue LYS159, close to the active site.

Key-words: Leishmaniasis. Molecular Modeling. Ester. Mannich Base.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp no inseto e no hospedeiro humano.....	25
Figura 2 - Taxa de incidência da Leishmaniose Cutânea no ano de 2013.	27
Figura 3 - Taxa de incidência da Leishmaniose Visceral por região do Brasil no ano de 2012.....	29
Figura 4 - Estrutura química do estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina.....	30
Figura 5 - Estrutura química da anfotericina B.	31
Figura 6 - Estrutura química da miltefosina.	32
Figura 7 - Estrutura química da paromomicina.....	33
Figura 8 - Estrutura química da sitamaquina.....	33
Figura 9 - Estrutura química da Pentamidina	34
Figura 10 - A) Número de patentes publicadas por ano no período entre 1980 e 2016. B) Número de publicações realizada por cada entidade solicitante de patente. Busca realizada no banco de dados Lens por patentes contendo os termos “ <i>Leishman*</i> ” e “ <i>drug</i> ”	35
Figura 11 - Estrutura química do fármaco delamanid.....	36
Figura 12 - Estrutura química dos compostos FM05 e FM09 da patente US9562037B2.	36
Figura 13 - Estrutura química do composto “ <i>Example 1</i> ” do pedido de patente WO2016/193111A1.	37
Figura 14 - Estrutura química do chavibetol.....	38
Figura 15 - Sobreposição das estruturas tridimensionais das proteínas CDC2 humana (azul) e CRK3 (cinza), obtida por modelagem por homologia.	41
Figura 16 - Mecanismo de hidrólise de peptídeos no sítio ativo de enzimas cisteíno proteases com a participação da tríade catalítica.	44
Figura 17 - Sítio ativo de enzimas cisteíno proteases.	45
Figura 18 - Estrutura química dos compostos E-64, tetrafluoro-fenoximetil cetona e A-705239.	47
Figura 19 - Estrutura molecular do eugenol.	48
Figura 20 - Estrutura molecular do O-benzoil-eugenol.....	48
Figura 21 - Série de ésteres de base de Mannich derivados do eugenol.	50
Figura 22 - Inibidor covalente <i>peptide-like</i> da cisteíno protease cruzaina de <i>T. cruzi</i> . .	51
Figura 23 - Esquema da rota sintética seguido para obtenção dos derivados de base de Mannich do eugenol.....	53

Figura 24 - Esquema sintético seguido para obtenção da base de Mannich do eugenol.....	54
Figura 25 - Esquema sintético seguido para tentativa de adição de um grupamento protetor à hidroxila fenólica do ácido 4-hidroxibenzoico.....	55
Figura 26 - Esquema sintético seguido para obtenção dos cloretos de ácido a partir de ácido carboxílico.	56
Figura 27 - Esquema sintético seguido para obtenção dos ésteres de base de Mannich do eugenol utilizando cloreto ácido.....	57
Figura 28 - Esquema sintético seguido para obtenção dos ésteres de base de Mannich do eugenol utilizando DCC, conforme método descrito por Westphal e colaboradores (2016).	59
Figura 29 - Esquema sintético de desproteção da hidroxila fenólica do éster <i>p</i> -(Triisopropilsiloxi)benzoato de base de Mannich.	69
Figura 30 - Esquema sintético seguido para obtenção do ésteres <i>p</i> -aminobenzoato de base de Mannich do eugenol por mecanismo de redução do grupamento nitro.	70
Figura 31 - Alinhamento global de múltiplas sequências entre a sequência alvo e os modelos de código PDB 3IUT e 2P7U realizados pelo programa Clustal Omega.....	77
Figura 32 - Mecanismo proposto para a reação de formação da base de Mannich do eugenol (2).	82
Figura 33 - Espectro de absorção (cm ⁻¹) na região do IV da substância 2	83
Figura 34 - Mecanismo proposto para a reação de formação dos cloretos ácidos (4a-h) a partir de ácido carboxílico <i>para</i> -dissubstituído.....	84
Figura 35 - Mecanismo proposto de esterificação utilizando cloreto ácido para a reação de formação dos compostos SBM2 a SBM13	85
Figura 36 - Mecanismo de esterificação de Steglish utilizando DCC e DMAP proposto para a reação de formação dos compostos SBM3, SBM7 e SBM9	87
Figura 37 - Mecanismo proposto para a reação de formação do composto SBM13 (éster <i>p</i> -aminobenzoato de base de Mannich).	88
Figura 38 - Espectro de absorção na região do IV da substância SBM3 (cm ⁻¹).....	89
Figura 39 - Espectro de RMN de ¹ H da substância SBM3 (CDCl ₃ , 300 MHz).	90
Figura 40 - Espectro de RMN de ¹³ C e Subespectro DEPT-135 de ¹³ C da substância SBM3 (CDCl ₃ , 75 MHz).	91
Figura 41 - Espectro de RMN de ¹³ C e Subespectro DEPT-135 de ¹³ C da substância SBM9 (CDCl ₃ , 75 MHz).	92

Figura 42 - Espectro de RMN de ¹³ C e Subespectro DEPT-135 de ¹³ C da substância SBM11 (CDCl ₃ , 75 MHz).	93
Figura 43 - Mecanismo proposto para a formação do composto ácido 4-[(triiisopropilsilil)oxi]benzóico.	94
Figura 44 - Espectro de RMN de ¹ H da substância éster <i>p</i> -(Triisopropilsiloxi) benzoato de base de Mannich (CDCl ₃ , 300 MHz).	95
Figura 45 - Gráfico de Z-score e de energia gerados pelo software ProSA-web do modelo da enzima rCPB2.8 obtido por modelagem por homologia.	103
Figura 46 - Perfil 3D da sequência de aminoácidos do modelo da enzima rCPB2.8 obtida pelo Verify3D.	104
Figura 47 - Gráfico de Ramachandran Geral da enzima rCPB2.8 gerado pelo pelo servidor online RAMPAGE.	105
Figura 48 - Gráfico de Ramachandran com as regiões favoráveis, separadas por geral, região de Glicina, região de pré-Prolina e região de Prolina, da enzima rCPB2.8 gerado pelo servidor online RAMPAGE.	106
Figura 49 - Sobreposição das estruturas tridimensionais das proteínas rCPB2.8 (azul), obtida por modelagem por homologia, e cruzaína código PDB 3IUT (cinza), utilizada como modelo.	107
Figura 50 - Alinhamento estrutural do domínio da amidase da enzima tripanotona sintetase de <i>E. coli</i> (GspS) e de <i>L. major</i> (TryS). A caixa entre os resíduos 30 e 43 indica a região de hélice flexível que não é encontrada na estrutura de <i>L. major</i> e os resíduos conservados entre as estruturas estão destacados em cinza.	108
Figura 51 - Alinhamento entre a estrutura cristalográfica (ligante apresentado com carbonos na cor verde), código PDB 3A2Y, e o complexo ligante (glutacionil espermidina, apresentado com carbonos na cor cinza) e proteína TS obtida pelo método de reancoramento proposto.	109
Figura 52 - Alinhamento entre a estrutura cristalográfica (ligante apresentado com carbonos na cor verde), código PDB 2R3I, e o complexo ligante (SCF, apresentado com carbonos na cor cinza) e proteína obtida pelo método de reancoramento proposto.	109
Figura 53 - Alinhamento entre a estrutura cristalográfica (ligante apresentado com carbonos na cor verde), código PDB 4IU0, e o complexo ligante (ABH, apresentado com carbonos na cor cinza) e proteína arginase obtida pelo método de reancoramento proposto.	110
Figura 54 - Gráfico indicando valores de logP e massa molecular ideais (verde), valores limites (laranja) e a linha de 50% de probabilidade de	

permeabilidade celular, de acordo com as regras de Waring, Gleeson e Lipinski.	111
Figura 55 - Estrutura 3D representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima arginase de <i>Leishmania</i> e as moléculas com melhor <i>GlideScore</i> : A) SBM10, B) SBM5 e C) SBM9.....	115
Figura 56 - Estrutura 3D representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada de cor laranja), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima arginase de <i>Leishmania</i> e as moléculas com melhor <i>GlideScore</i> : A) SBM13 e B) SBM4.	116
Figura 57 - Potencial de superfície eletrostática da enzima arginase ligada ao composto SBM10 (escala de -70,232 [negativo, vermelho] a 70,232 [positivo, azul]).....	118
Figura 58 - Estrutura tridimensional representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada de cor laranja), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima tripanotona sintetase e as moléculas com melhor <i>GlideScore</i> : A) SBM4, B) SBM10 e C) SBM3.	120
Figura 59 - Estrutura tridimensional representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada de cor laranja), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima tripanotona sintetase e as moléculas com melhor <i>GlideScore</i> : A) SBM9 e B) SBM2.	121
Figura 60 - Potencial de superfície eletrostática da enzima tripanotona sintetase ligada ao composto SBM4 (escala de -70,232 [negativo, vermelho] a 70,232 [positivo, azul]).....	122
Figura 61 - Estrutura tridimensional representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada de cor laranja), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima rCPB2.8 e as moléculas com melhor <i>GlideScore</i> : A) SBM13, B) SBM3 e C) SBM5.....	124
Figura 62 - Estrutura tridimensional representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada de cor laranja), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando	

interações entre resíduos da enzima rCPB2.8 e as moléculas com melhor <i>GlideScore</i> : A) SBM11 e B) SBM4.....	125
Figura 63 - Potencial de superfície eletrostática da enzima rCPB2.8 ligada ao composto SBM3 (escala de -70,232 [negativo, vermelho] a 70,232 [positivo, azul]).....	127
Figura 64 - Perfil de interação entre o composto SBM4 e uma das cavidades de interação da enzima rCPB2.8. A) Superfície da enzima rCPB2.8 demonstrando o sítio ativo e os 3 sítios de interação previstos pelo programa <i>SiteMap</i> da plataforma Schödingler destacados de verde, com ampliação do sítio com melhor perfil de interação de ancoragem do composto SBM4. B) Potencial de superfície eletrostática da enzima contendo o ligante SBM4 no sítio alostérico de melhor interação com o ligante (escala de -70,232 [negativo, vermelho] a 70,232 [positivo, azul]). C) Ligante SBM4 formando uma interação de hidrogênio com o resíduo LYS159 no sítio alostérico.	128
Figura 65 - Estrutura tridimensional representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada de cor laranja), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima CRK3 e as moléculas com melhor <i>GlideScore</i> : A) SBM2, B) SBM4 e C) SBM11.....	132
Figura 66 - Estrutura tridimensional representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada de cor laranja), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima CRK3 e as moléculas com melhor <i>GlideScore</i> : A) SBM13 e B) SBM8.....	133
Figura 67 - Potencial de superfície eletrostática da enzima CRK3 ligada ao composto SBM2 (escala de -70,232 [negativo, vermelho] a 70,232 [positivo, azul]).....	134
Gráfico 1 - Avaliação da atividade inibitória sobre a enzima rCPB2.8 das moléculas intermediário 2, SBM2-SBM13 demonstrada por gráfico em barras dos valores de porcentagem de atividade enzimática nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M de cada composto e condição controle.	98
Quadro 1 - Potenciais alvos moleculares para fármacos leishmanicidas.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados para a reação de formação do cloreto de ácido.....	56
Tabela 2 - Quantidades dos reagentes utilizados para a reação de formação dos ésteres de base de Mannich.....	58
Tabela 3 - Quantidades dos reagentes utilizados para a reação de formação dos ésteres de base de Mannich utilizando DCC.	60
Tabela 4 - Avaliação da atividade antipromastigotas das moléculas SBM2-SBM13 demonstrada por valores de CI_{50} de inibição do crescimento parasitário em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o intervalo de confiança a 95% encontrado pela análise estatística e R^2	96
Tabela 5 - Avaliação da atividade inibitória sobre a enzima rCPB2.8 das moléculas intermediário 2, SBM2-SBM13 demonstrada por valores de atividade enzimática em concentrações de 10 μM e 100 μM de cada composto e controle.	99
Tabela 6 - Avaliação da citotoxicidade em macrófagos e o intervalo de confiança a 95% encontrado pela análise estatística e o valor de índice de seletividade (IS).	101
Tabela 7 - Propriedades físico-químicas das moléculas estudados.	112
Tabela 8 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (<i>GlideScore</i>), em ordem decrescente, entre as moléculas da série proposta e a enzima arginase, o número de interações de hidrogênio e os resíduos que participam desta interação, boas interações de van der Waals, interações π - <i>stacking</i> e cátion- π	113
Tabela 9 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (<i>GlideScore</i>), em ordem decrescente, entre as moléculas da série proposta e a enzima tripanotona sintetase, o número de interações de hidrogênio e os resíduos que participam desta interação, boas interações de van der Waals, interações cátion- π e π - <i>stacking</i>	119
Tabela 10 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (<i>GlideScore</i>), em ordem decrescente, entre as moléculas da série proposta e a enzima rCPB2.8, o número de interações de hidrogênio e os resíduos que participam desta interação, boas interações de van der Waals, interações cátion- π e π - <i>stacking</i>	123

Tabela 11 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (<i>GlideScore</i>), em ordem decrescente, entre as moléculas da série proposta e um dos sítios alostérios da enzima rCPB2.8, número de interações de hidrogênio e os resíduos que participam desta interação, boas interações de van der Waals, interações cátion- π e π - <i>stacking</i>	129
Tabela 12 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (<i>GlideScore</i>), em ordem decrescente, entre as moléculas da série proposta e a enzima CRK3, o número de interações de hidrogênio e e os resíduos que participam desta interação, interações de van der Waals, interações tipos cátion- π e π - <i>stacking</i>	130
Tabela 13 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (<i>GlideScore</i>) entre as moléculas da série proposta e a enzima CDC2 humana, o número de interações de hidrogênio, número de interação iônica, interações de van der Waals, interações tipos cátion- π e π - <i>stacking</i>	135

LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	- Aminoácidos
ABH	- Ácido 2(S)-amino-6-borono-hexanóico
ASN	- Asparagina
ASP	- Ácido aspártico
ATP	- Adenosina trifosfato
ATR	- <i>Attenuated Total Reflectance</i>
BLAST	- Basic Local Alignment Search Tool
CC	- Cromatografia em coluna de sílica
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CC₅₀	- Concentração citotóxica para 50% das células
CDCl₃	- Clorofórmio delterado
CDC	- Cinase dependente de ciclina
CI₅₀	- Concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular
CI₅₀-PRO	- Concentração capaz de inibir 50% do crescimento de promastigotas
rCPB2.8	- Cisteína protease 2.8 recombinante
CRK3	- Cinase dependente de ciclina 3
CYS	- Cisteína
DM	- Dinâmica molecular
LogP	- Logaritmo do coeficiente de partição calculado
d	- Duplete
DEPT	- Intensificação sem distorção via transferência de polarização (<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)
DCC	- <i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCU	- 1,3-diciclohexil uréia
DMAP	- 4-dimetilaminopiridina
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DTN	- Doenças tropicais negligenciadas
DTT	- Ditioneitol
EC₅₀	- Concentração que resulta em uma mudança de resposta de 50%
EM	- Espectrometria de massas
F.F.	- Faixa de fusão

F.M.	- Fórmula molecular
GLU	- Ácido glutâmico
G2	- <i>Gap 2</i> (intervalo celular 2)
HIS	- Histidina
HIV	- Vírus da imunodeficiência adquirida
Hz	- Hertz
IL	- Isoleucina
IS	- Índice de Seletividade
IV	- Infravermelho
J	- Constante de acoplamento escalar
LC	- Leishmaniose Cutânea
LEU	- Leucina
LPKA	- Leishmaniose dermal post kala azar
LV	- Leishmaniose Visceral
m	- Multiplete
m/z	- Razão massa/carga
MHz	- MegaHertz
M.M.	- Massa molar
NF-kB	- Fator nuclear kappa B
nm	- Nanômetro
nM	- Nanomolar
OMS	- Organização Mundial da Saúde
ppm	- Partes por milhão
PDB	- <i>Protein Data Bank</i>
Rf	- Fator de retenção em placa cromatográfica
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	- Raiz do desvio quadrático médio das posições atômicas
RNA	- Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
SEAr	- Substituição Eletrofílica Aromática
Ser	- Serina
s	- Simpleto
t	- Tripleto
t.a.	- Temperatura ambiente
TIPSCI	- Cloreto de triisopropilsilano

THR	- Treonina
TRP	- Triptofano
TYR	- Tirosina
TS	- Tripanotiona sintetase
UV	- Ultravioleta
vDW	- Van der Waals
v/v	- Volume por volume
δ	- Deslocamento químico (ppm)
$\bar{\nu}_{\text{máx}}$	- Número de onda (cm^{-1})
W	- Watts
Z-FR-MCA	- Carbobenzoxi-phe-arg7-amida-4-metil cumarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1	PLANEJAMENTO RACIONAL	22
2.2	MODELAGEM MOLECULAR.....	23
2.2	LEISHMANIOSE.....	24
2.2.1	Leishmaniose tegumentar: Cutânea e Mucocutânea	26
2.2.2	Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Dérmica Pós Calazar	27
2.3	TRATAMENTOS	29
2.3.1	Antimoniais pentavalentes	29
2.3.2	Anfotericina B	30
2.3.3	Miltefosina.....	31
2.3.4	Paromomicina.....	32
2.3.5	Sitamaquina	33
2.3.6	Pentamidina	34
2.4	MERCADO DE PATENTES: BUSCA POR NOVOS FÁRMACOS LEISHMANICIDAS	34
2.5	ALVOS MOLECULARES PARA O COMBATE DA LEISHMANIOSE.....	38
2.5.1	Cinases dependentes de ciclina	39
2.5.2	Arginase.....	41
2.5.3	Tripanotona sintetase	42
2.5.4	Cisteíno protease	43
2.6	EUGENOL COMO SUBSTÂNCIA BIOATIVA	47
3	OBJETIVOS.....	49
4	PLANEJAMENTO ESTRUTURAL.....	50
5	MATERIAIS E MÉTODOS	52
5.1	MÉTODOS DE SÍNTESE	52
5.1.1	Síntese de ésteres de base de Mannich	53
5.1.1.1	Síntese do composto 4-alil-2-metoxi-6(morfolin-4ilmetil)fenol (2).....	53
5.1.1.2	Síntese do composto ácido 4-[(triaisopilsilil)oxi]benzóico.....	55
5.1.1.3	Síntese dos derivados cloretos de ácido	55
5.1.1.4	Síntese de ésteres de base de Mannich do eugenol.....	57

5.1.1.4.1	Dados de caracterização do éster benzoato de base de Mannich (SBM2).....	60
5.1.1.4.2	Dados de caracterização do éster <i>p</i> -nitrobenzoato de base de Mannich (SBM3).....	61
5.1.1.4.3	Dados de caracterização do éster <i>p</i> -toluol de base de Mannich (SBM4).....	62
5.1.1.4.4	Dados de caracterização do éster <i>p</i> -metoxibenzoato de base de Mannich (SBM5).....	63
5.1.1.4.5	Dados de caracterização do éster <i>p</i> -(Triisopropilsiloxi)benzoato de base de Mannich	64
5.1.1.4.6	Dados de caracterização do éster <i>p</i> -bromobenzoato de base de Mannich (SBM8).....	65
5.1.1.4.7	Dados de caracterização do éster <i>p</i> -trifluorometilbenzoato de base de Mannich (SBM9).....	66
5.1.1.4.8	Dados de caracterização do éster <i>p</i> -tercutilbenzoato de base de Mannich (SBM10).....	67
5.1.1.4.9	Dados de caracterização do éster <i>p</i> -fluorobenzoato de base de Mannich (SBM11).....	68
5.1.1.5	Síntese do composto éster <i>p</i> -hidroxibenzoato de base de Mannich do eugenol (SBM7).	68
5.1.1.5.1	Dados de caracterização do éster <i>p</i> -hidroxibenzoato de base de Mannich (SBM7).....	70
5.1.1.6	Síntese do composto éster <i>p</i> -aminobenzoato de base de Mannich do eugenol (SBM13).	70
5.1.1.6.1	Dados de caracterização do éster <i>p</i> -aminobenzoato de base de Mannich (SBM13).....	71
5.2	ETAPA DE AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA <i>IN VITRO</i>	72
5.2.1	Avaliação da atividade antipromastigota	72
5.2.2	Avaliação da atividade inibitória sobre a enzima rCPB2.8	73
5.2.3	Avaliação da citotoxicidade	74

5.3	ESTUDOS COMPUTACIONAIS POR MODELAGEM MOLECULAR	74
5.3.1	Desenho e preparo dos ligantes e avaliação do perfil de biodisponibilidade	75
5.3.2	Preparo das proteínas.....	75
5.3.2.1	Modelagem Molecular por Homologia, validação e dinâmica molecular da enzima rCPB2.8	76
5.3.2.1.1	<i>Modelagem Molecular por Homologia da enzima rCPB2.8</i>	<i>76</i>
5.3.2.1.2	<i>Validação e otimização do modelo rCPB2.8</i>	<i>77</i>
5.3.2.1.3	<i>Dinâmica molecular como método de relaxação da proteína obtida por modelagem por homologia</i>	<i>78</i>
5.3.3	Parâmetros utilizados no ancoramento molecular.....	79
5.3.4	Validação dos protocolos de ancoramento molecular	80
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
6.1	ETAPA SINTÉTICA	81
6.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA <i>IN VITRO</i>	95
6.2.1	Avaliação da atividade antipromastigota	96
6.2.2	Avaliação da atividade inibitória sobre a enzima rCPB2.8	97
6.2.3	Avaliação da citotoxicidade	100
6.3	ESTUDOS COMPUTACIONAIS POR MODELAGEM MOLECULAR	101
6.3.1	Validação da metodologia de Modelagem Molecular por Homologia da enzima rCPB2.8.....	102
6.3.2	Validação da metodologia de ancoramento molecular	107
6.3.3	Análise dos ligantes.....	110
6.3.4	Ancoramento molecular utilizando a proteína arginase	112
6.3.5	Ancoramento molecular utilizando a proteína tripanotona sintetase.....	118
6.3.6	Ancoramento molecular utilizando a proteína cisteíno protease (rCPB2.8).....	122
6.3.7	Ancoramento molecular utilizando a proteína CRK3.....	130
6.3.8	Estudo de ancoramento molecular utilizando a proteína CDC2 de humano.....	134
7	CONCLUSÃO	137

REFERÊNCIAS.....	139
APÊNDICES	150

1 INTRODUÇÃO

As Doenças tropicais negligenciadas (DTN) são doenças associadas com a pobreza, prevalentes em regiões tropicais e subtropicais, no qual a população mais afetada se encontra em contato próximo aos vetores infecciosos devido à falta de saneamento básico adequado, além de hábitos de higiene precários e baixa nutrição, os tornando mais vulneráveis à doença. A grave debilidade física causada pela maioria das doenças desta classe prejudica o desenvolvimento intelectual das crianças e limita a capacidade dos indivíduos infectados em trabalhar (DIAS et al., 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica 18 doenças parasitárias crônicas como DTN, dentre elas a Leishmaniose, doença de Chagas, doença do sono e úlcera de Buruli são patologias ainda sem tratamento adequado, que não dispõem de ferramentas suficientes de controle e necessitam de maiores investimentos em pesquisa e desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012a, 2017).

A Leishmaniose é uma doença causada por parasitos do gênero *Leishmania* que acomete principalmente a pele e outros órgãos como o fígado e baço, e que muitas vezes leva à lesões, mutilações e até mesmo à morte, se não houver tratamento adequado. A alta virulência do parasito, o estado nutricional inadequado, a idade (risco muito agravado em crianças e idosos), a imunodeficiência e alguns fatores genéticos do hospedeiro contribuem para um prognóstico desfavorável da doença (FRADE et al., 2011). Atualmente, as infecções causadas pelo protozoário *Leishmania* sp. são preocupantes devido ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos, principalmente no Brasil e na Índia, e estes serem muito propícios a tal parasitemia sistêmica, sendo a imunossupressão o maior fator de risco por alterar a manifestação clínica da doença e a resposta do paciente ao tratamento (GRIENSVEN, 2014).

Estima-se que de 700 a 1 milhão de casos novos de Leishmaniose e de 20.000 a 30.000 mortes ocorrem ao ano. Quase a totalidade dos casos registrados de Leishmaniose Visceral (90%) no mundo em 2015, a manifestação mais séria da doença, provém dos países Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão e Sudão do Sul, demonstrando a concentração dos casos nos países ditos como em desenvolvimento e subdesenvolvidos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Durante a reunião da OMS sobre o esboço de um quadro estratégico para o controle da Leishmaniose, realizado na Geórgia em 2013, foram firmadas metas a serem concluídas até o ano de 2020 para a eliminação da mortalidade por Leishmaniose Visceral, redução das morbidades por Leishmaniose Visceral e tegumentar, buscando minimizar as perdas socioeconômicas provocadas pela doença. Entre as intervenções prioritárias estabelecidas estão um sistema de detecção precoce de casos, diagnóstico confiável e tratamento apropriado e acessível; o desenvolvimento de um sistema vigilância de saúde em funcionamento adequado; controle de reservatórios zoonóticos; controle do vetor e controle ambiental; educação em saúde à população e esforços em pesquisa; entre outros (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Uma das grandes dificuldades no controle da doença é o acesso restrito aos medicamentos e rupturas regulares de estoque em países endêmicos, somado a este fator, os fármacos disponíveis para o tratamento da Leishmaniose possuem elevada toxicidade, baixa eficácia, custo elevado, via de administração indesejável, janela terapêutica estreita e desenvolvimento de resistência do parasito em resposta ao medicamento, fazendo-se necessário pesquisas de novos fármacos com tal finalidade, que sejam de baixa toxicidade e acessíveis à toda a população (WALKER et al., 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010a).

A possibilidade de estudos *in silico* propiciou o desenvolvimento de estratégias de estudo racional de novos fármacos pela possibilidade de identificação e otimização de moléculas pequenas com capacidade de interação com o alvo molecular de interesse (SANT'ANNA, 2009; SINGH; JHA; KESWANI, 2016).

Estudos têm demonstrado que a enzima rCPB2.8 é essencial para a virulência e sobrevivência do parasito da espécie *Leishmania* e o entendimento do mecanismo de sua inibição e entidades químicas que interagem com sítio ativo da enzima faz dela um alvo potencial a ser explorado (AZIZI et al., 2009).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A Química Medicinal tem um papel importante no desenvolvimento racional de fármacos por estudar a origem molecular da modulação à nível celular exercida por micromoléculas bioativas e abranger conhecimentos multidisciplinares como a química orgânica, farmacologia, bioquímica, bioinformática, entre outros, possibilitando estabelecer uma relação estrutura e atividade de fármacos, além do conhecimento de propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e mecanismos metabólicos, objetivando-se o desenvolvimento de compostos mais potentes, seletivos e menos tóxicos (ANDRICOPULO; SALUM; ABRAHAM, 2009; BARREIRO et al., 1997; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

A possibilidade de estudos *in silico* propiciou o desenvolvimento de estratégias de estudos racional de novos fármacos pela exploração de produtos naturais, entidades químicas com mecanismo de ação conhecidos e de interesse, otimização de fármacos existentes ou o estudo de análogos. Estes avanços foram possíveis devido ao conhecimento da sequência genética do parasito e da existência de banco de dados de proteínas, além da possibilidade do uso da ferramenta de triagem virtual (*high-throughput screening*) para a avaliação computacional de um grande número de possíveis inibidores enzimáticos e a criação de banco de dados de moléculas de origem sintética e produtos naturais (SANT'ANNA, 2009; SINGH; JHA; KESWANI, 2016).

2.1 PLANEJAMENTO RACIONAL

O planejamento racional de fármacos busca a identificação e otimização de moléculas pequenas, avaliando a capacidade de interação entre os compostos estudados e o alvo molecular de interesse, resultando no estabelecimento de grupamentos funcionais essenciais para a atividade biológica no alvo e posterior seleção dos compostos líderes de maior potência e seletividade.

O conhecimento do comportamento “*drug-like*” ou “*fragment-like*” de moléculas ou de grupamento funcionais separadamente, no qual o composto pode se comportar de modo semelhante ao substrato conhecido da enzimas no sítio ativo, o conhecimento das propriedades físico-química e farmacocinética, a ausência de grupamentos toxicofóricos e o uso de ferramentas de seleção de compostos, como

a regra dos cinco de Lipinski, podem fundamentar a escolha de uma série de compostos que possam ter atividade com o alvo enzimático proposto em um estudo (ANDRICOPULO; SALUM; ABRAHAM, 2009).

Estratégias de modificação molecular fornecem ferramentas para a otimização de protótipos à fármaco por alterar propriedades que tornam o composto em estudo menos efetivo, sem resultar na diminuição da afinidade entre o composto e o alvo enzimático, como a melhora de sua absorção e distribuição ou a potencialização da sua ação no sítio de interação com a enzima. Entre as ferramentas utilizadas pelo químico medicinal está o bioisosterismo, que busca a alteração de grupos funcionais do composto por grupamentos que apresentem propriedades físico-químicas, volume e distribuição eletrônica semelhantes, porém que melhore o perfil farmacocinético ou farmacodinâmico desejado. A hibridização molecular é uma ferramenta que busca a associação de dois padrões moleculares com atividades biológicas distintas em uma única estrutura para obter uma ação sinérgica entre elas. A simplificação molecular parte do conhecimento da relação estrutura atividade para modificar os compostos em estudo reduzindo-o a uma estrutura mínima essencial para a sua atividade. A simplificação de compostos leva à redução do peso molecular, facilitando a sua absorção, diminuição de centros estereogênicos e tornando o processo de síntese mais simples (BARREIRO, 2002; BARREIRO; FRAGA, 2008; SETHY et al., 2013).

2.2 MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem molecular é uma ferramenta computacional que tem sido utilizada para o planejamento de novos fármacos a fim de simular as interações de moléculas em seus alvos biomacromoleculares. Na modelagem molecular, as interações dipolo-dipolo, íon-íon, por ligações de hidrogênio e forças de dispersão são determinadas, possibilitando estabelecer uma relação quantitativa da estrutura-atividade. Os métodos de modelagem molecular estão divididos em métodos clássicos, métodos quânticos e métodos comparativos (SANT'ANNA, 2009).

Estudos computacionais por meio de ancoramento molecular buscam identificar a posição energeticamente favorável no alvo molecular posicionando pequenas moléculas em diferentes orientações e conformações de acordo com as interações intermoleculares, fornecendo uma resposta que prediz a afinidade da

molécula pelo alvo (pontuação ou score). A estrutura tridimensional dos alvos moleculares podem ser obtidas por cristalografia de raio X ou por ressonância magnética nuclear, e são depositadas em bancos de dados. Métodos comparativos tem sido utilizados para a obtenção da estrutura tridimensional de proteínas ainda não resolvidas que possuem uma relação entre sua sequência de aminoácidos com pelo menos uma proteína registrada no banco de dados e que tenha sua sequência de aminoácidos elucidada (KROEMER, 2007).

A construção de um modelo tridimensional de uma proteína é realizada por programas que buscam regiões semelhantes entre duas ou mais proteínas, que serão mantidas entre as estruturas, e que aplicam regras de restrições espaciais à sequência alvo (restrições angulares entre três átomos e diedrais, restrições químicas e estereoquímicas). O método de modelagem por homologia baseia-se no fato de que regiões semelhantes entre proteínas apresentam conformações internas conservadas, principalmente com relação ao arranjo da estrutura secundária da proteína (α -hélices e folhas- β); proteínas de uma mesma família ou homólogas possuem semelhanças estruturais e funcionais, diferindo principalmente em regiões externas (*loops*), que são importantes para a formação da estrutura terciária da proteína (PACHECO, 2009).

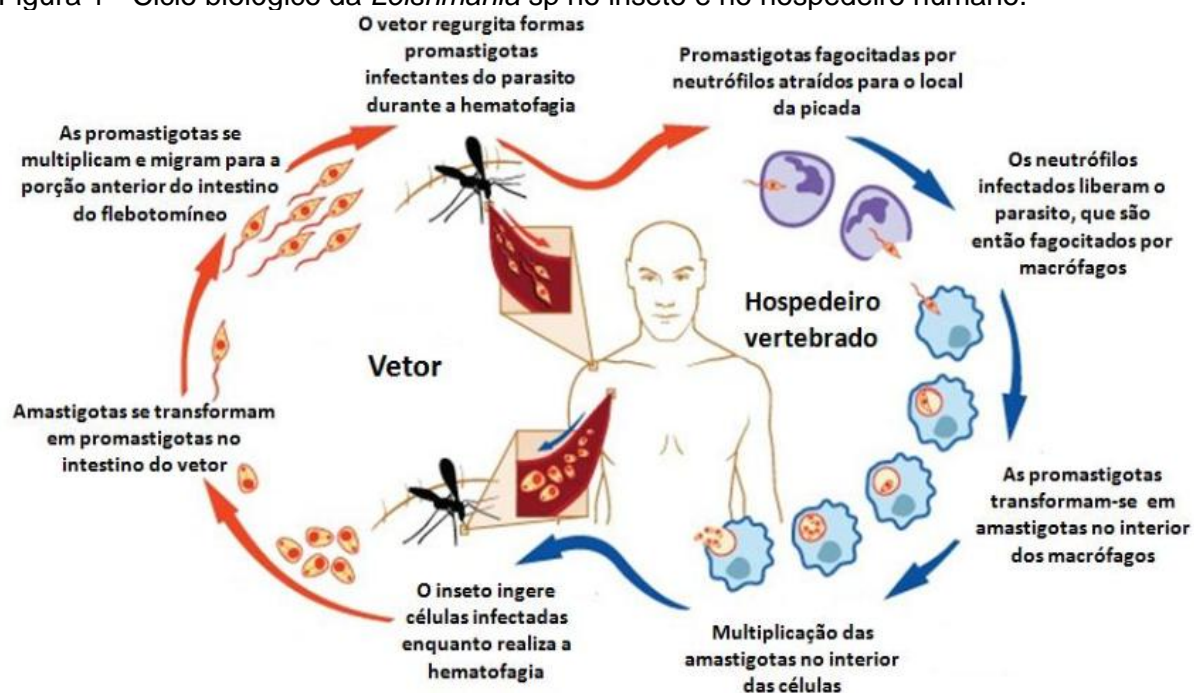
O estudo de dinâmica molecular é uma ferramenta utilizada na modelagem molecular que se baseia nos princípios de Mecânica Clássica e descreve as propriedades dinâmicas dos átomos por forças newtonianas, permitindo o cálculo das propriedades macroscópicas (pressão, energia interna, volume, temperatura, entropia, energia livre, entre outras) de um sistema que pode ser solvatado e que tem relação temporal, se aproximando de uma situação laboratorial real (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

2.2 LEISHMANIOSE

A Leishmaniose é uma doença parasitária com diferentes formas clínicas causada por mais de 20 espécies de protozoários intracelulares da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e Gênero *Leishmania*. A infecção pelo protozoário se dá após a picada pela fêmea do inseto do gênero *Lutzomyia* e *Plebotomus*, sendo conhecida mais de 30 espécies deste vetor (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

O ciclo de vida do protozoário no homem, exemplificado na Figura 1, se inicia após a picada do vetor infectado, que libera a forma promastigota no local da picada, e que leva a uma resposta inflamatória com presença de macrófagos. Estes macrófagos fagocitam a forma promastigota e induzem seu desenvolvimento e proliferação à forma amastigota dentro de fagolisossomos; após a lise destes macrófagos, outros macrófagos podem ser infectados de forma disseminada acometendo principalmente órgãos como fígado, baço, linfonodos e medula óssea. O homem e alguns animais podem agir como reservatório do parasito, e após a sucção de seu sangue pelo mosquito vetor transmite a este a forma amastigota, que se desenvolve a promastigota no meio extracelular do intestino (GRIENSVEN; DIRO, 2012). Além da transmissão via picada do inseto, raros casos de transmissão via congênita e por transfusão sanguínea ou compartilhamento de seringas podem ocorrer. (PEARSON; SOUSA, 1996). Cães, gatos e outros animais vertebrados também podem ser infectados por parasitos do gênero *L. chagasi*, caracterizando uma zoonose (GRIENSVEN, 2014). No continente Americano, a presença de um reservatório animal é necessária para manter o parasito na natureza e dar continuidade ao ciclo de transmissão de Leishmaniose.

Figura 1 - Ciclo biológico da *Leishmania* sp no inseto e no hospedeiro humano.



Fonte: Adaptado de SOUSA (2012).

Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e da resposta do hospedeiro frente a esta infecção a Leishmaniose pode se manifestar por formas clínicas diferentes, entre elas as principais são: Leishmaniose Cutânea, mais comum e que leva lesões na pele; Mucocutânea; Visceral ou calazar e Leishmaniose Dérmica Pós Calazar.

2.2.1 Leishmaniose tegumentar: Cutânea e Mucocutânea

A Leishmaniose Tegumentar é classificada de acordo com as manifestações clínicas como Cutânea localizada, Cutânea difusa, Leishmaniose disseminada, Leishmaniose recidiva cútis e Leishmaniose mucosa, acometendo principalmente a pele. Inicialmente é manifestada por uma mácula no local da picada do inseto, que progride em duas ou três semanas em lesões em forma de nódulo ou pápula eritromatosa e pruriginosa e pode acometer linfonodos. A doença pode se desenvolver a um granuloma ou a uma úlcera, que pode persistir por meses ou anos, ou se transformar em uma forma crônica (GOTO; LINDOSO, 2012).

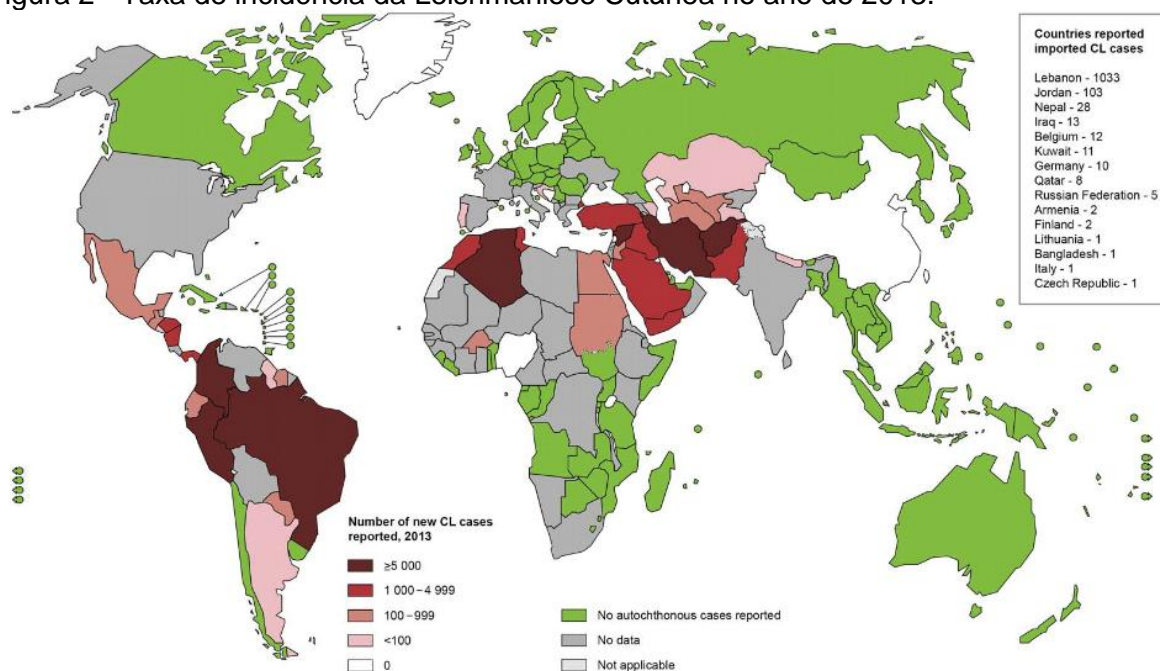
A Leishmaniose mucosa está associada a desfigurações devido a ulcerações resultantes da hiperatividade da resposta imunológica podendo acometer os lábios, nariz, bochechas, palato, faringe, laringe e raramente a traqueia e a genital. Casos de mortes estão associados com infecções secundárias (PEARSON; SOUSA, 1996; PISCOPO; AZZOPARDI, 2006). Entre as espécies responsáveis por ocasionar a manifestação mucosa da Leishmaniose, destaca-se a *L. braziliensis* (SANGSHETTI et al., 2015).

A Leishmaniose recidiva é causada principalmente pela espécie *L. tropica* e se manifesta com o reaparecimento de resposta inflamatório em lesões de Leishmaniose Cutânea não tratada adequadamente. O grau de parasitismo em biopsias pode variar de ausentes, escasso ou frequentes (BITTENCOURT et al., 1993; SANGSHETTI et al., 2015).

No continente americano a Leishmaniose Cutânea e Mucocutânea é causada pelas espécies *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. brasiliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* e *L. chagasi* por meio da transmissão do vetor da espécie *Lutzomyia* que habitam o solo ou árvores, sendo endêmica em muitas áreas da América Central e América do Sul. Os humanos são infectados quando trabalham ou vivem em áreas florestais nos quais os organismos são endêmicos, sendo um

problema encontrado para aqueles que possuem atividades militares nestes locais (PEARSON; SOUSA, 1996). A Leishmaniose Cutânea possui uma incidência de 0,6 a 1 milhão de casos por ano em 82 países (FIGURA 2) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Figura 2 - Taxa de incidência da Leishmaniose Cutânea no ano de 2013.



Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION (2013).

2.2.2 Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Dérmica Pós Calazar

A forma disseminada da Leishmaniose, conhecida por Leishmaniose Visceral (LV) ou Kala-azar, é causada principalmente pelas espécies *L. donovani* e *L. Infantum* (sinônimo de *L. chagasi* na América do Sul) e possui uma incidência estimada de 50.000 a 90.000 novos casos ao ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Após o período de incubação, que pode durar de 2 a 6 meses ou por anos, a doença é manifestada por alguns sintomas como: febre, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, escurecimento da pele, anemia, trombocitopenia e neutropenia, devido à supressão da medula óssea e sequestro esplênico, disfunção hepática, sangramentos, edemas, entre outros, e é fatal se não tratada em 95% dos casos (GRIENSVEN; DIRO, 2012).

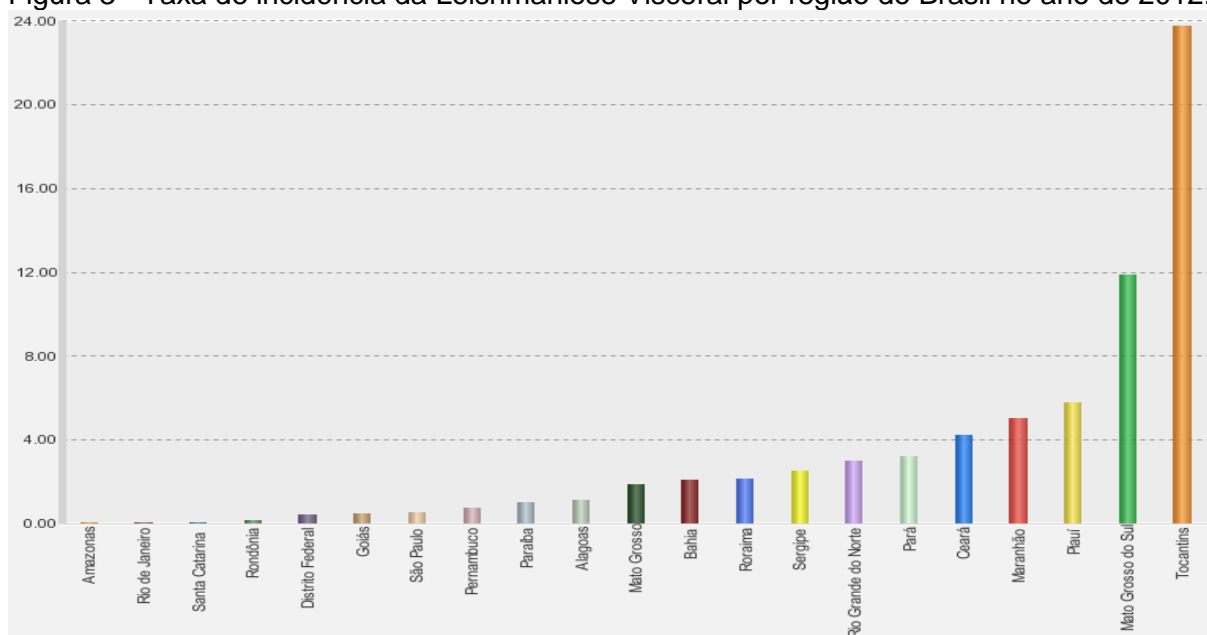
Erupções cutâneas em forma de pápulas, máculas ou nódulos, ricos em parasitos, podem aparecer como uma forma crônica após o término do tratamento

aparentemente efetivo da Leishmaniose Visceral, ou em paciente sem o histórico desta doença, sendo prevalente em áreas onde a espécie *Leishmania donovani* é endêmica. Esta forma de manifestação da Leishmaniose é conhecida como a Leishmaniose dermal post kala azar (LPKA) e está associada de forma significativa a tratamentos com medicamentos antimoniais (MUKHOPADHYAY et al., 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). A possibilidade da persistência do parasito após a cura clínica e a associação da forma LPKA com uma reinfecção deste parasito também é evidenciada (ZIJLSTRA, 2016).

Estudos levantaram outras hipóteses para poder explicar o aparecimento da forma LPKA e demonstraram uma possível relação entre a LPKA e a luz ultravioleta do sol, devido sua ação imunossupressora, sua habilidade em destruir as células apresentadoras de antígeno epidermal, as células de Langerhan, e sua inibição da hipersensibilidade de contato e respostas à aloantígeno. Ainda a falha no desenvolvimento de uma memória imunológica específica de células T, levando uma susceptibilidade a reativação de formas latentes do parasito, e fatores de susceptibilidade genética do hospedeiro, como a falha na resposta adequada do mediador inflamatório IFN- γ e IFN- γ R1 poderiam facilitar o crescimento e a multiplicação do parasito (MUKHOPADHYAY et al., 2014).

A Leishmaniose Visceral possui alta letalidade principalmente em indivíduos não tratados, crianças desnutridas e em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). No Brasil, a LV teve modificações nos seus aspectos geográficos e sociais, aproximadamente noventa por cento dos casos notificados de LV ocorriam na Região Nordeste na década de 90; a medida que a doença se expandiu houve uma redução deste número, e os casos começaram a atingir áreas urbanas do país (FIGURA 3) (BRASIL, 2014).

Figura 3 - Taxa de incidência da Leishmaniose Visceral por região do Brasil no ano de 2012.



Fonte: BRASIL (2012)

2.3 TRATAMENTOS

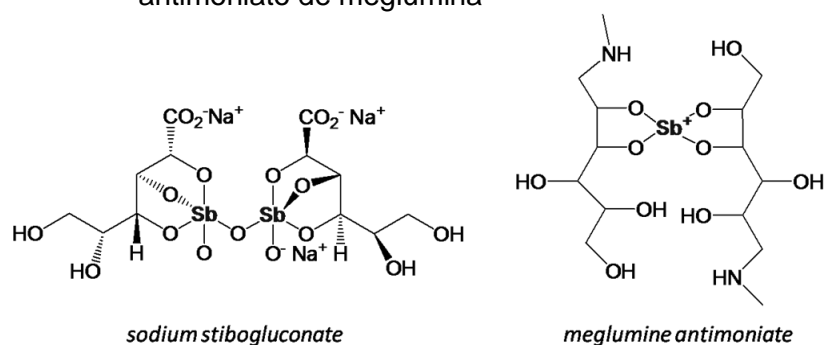
Entre os fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose estão a pentamidina, antimoniais pentavalentes, paromomicina, anfotericina b, sitamaquina e miltefosina.

2.3.1 Antimoniais pentavalentes

Os medicamentos estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina, ilustrados na Figura 4, são pró-fármacos da classe dos antimônios pentavalente usados no tratamento da Leishmaniose Visceral e post-kala-azar em alguns países da África (SANGSHETTI et al.,2015). O mecanismo de ação dos medicamentos antimoniais não é estabelecido ao certo, porém supõe-se que inicialmente ocorre seu transporte para o interior do parasito por transportadores de aquaporina 1, aquagliceroporina e transportadores de fosfato da forma amastigota. No interior do macrófago ou no parasito, o antimoniato pentavalente (Sb^V) são convertidos a antimoniato trivalente (Sb^{III}) e ambas as formas agem por fragmentar o DNA levando a β -oxidação dos ácidos graxos, fosforilação da adenosina difosfato e apoptose. Além disto, os antimoniais inibem a glicólise, aumentam o efluxo de tióis intracelulares e inibem a ação da enzima tripanotona redutase, responsável pela

proteção de espécies reativas de oxigênio do hospedeiro e espécies de nitrogênio do parasito. Devido ao uso indiscriminado e sua ampla utilização em regiões endêmicas, foram identificados mecanismos de resistência do parasito frente a ação deste medicamento, entre eles a diminuição da atividade redutase do parasito para a conversão do Sb^V a Sb^{III} , redução da acumulação de metais devido ao alto efluxo e baixo influxo de substâncias, superexpressão do gene da proteína de choque térmico (HSP70), expressão de transportadores da família ABC, MRPA e proteína de resistência a Pentamidina 1 (PRP1) que atuam como bomba de efluxo para antimoniais (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

Figura 4 - Estrutura química do estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina



Fonte: CABALLERO; SALAS; SÁNCHEZ-MORENO (2015).

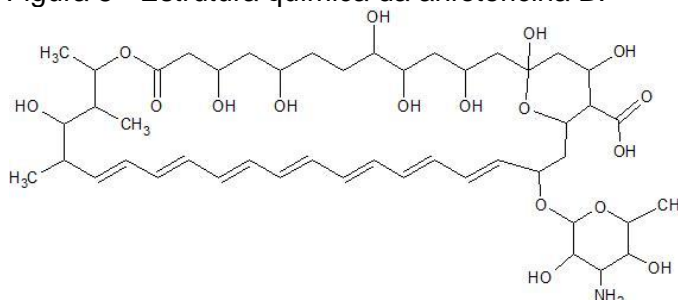
O antimônio possui elevada toxicidade, sendo considerado um agente clastogênico e possível carcinógeno humano, pelo IARC (*International Agency for Research on Cancer*). Mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos são frequentes, como batimentos ventriculares prematuros, taquicardia ventricular, prolongamento do intervalo QT, associados com arritmias sérias ou fatais (RATH et al., 2003). Casos de toxicidade e mortalidade são mais frequentes em pacientes HIV-positivos tratados com antimoniais quando comparados com aqueles tratados com miltefosina ou anfotericina B incorporada a lipossomas (NAGLE et al., 2014).

2.3.2 Anfotericina B

A anfotericina B é um fármaco poliênico, inicialmente utilizado como agente antifúngico, que possui ação leishmanicida devido sua interação com o ergosterol de membrana da *Leishmania*, levando a um aumento de sua permeabilidade, alteração

osmótica e lise celular (FIGURA 5). As alterações da expressão do ergosterol de membrana foi evidenciado como mecanismo de resistência da *Leishmania*, entretanto, casos de resistência não são frequentes (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

Figura 5 - Estrutura química da anfotericina B.



Fonte: Adaptado de PUBCHEM (2005a).

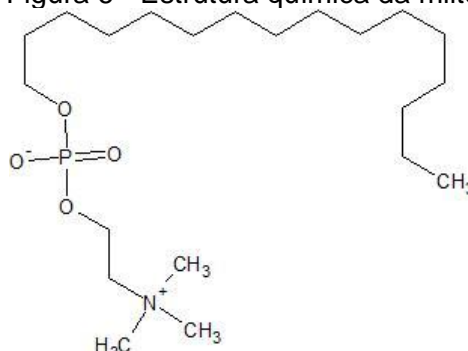
Em regiões endêmicas onde a *Leishmania* se mostra resistente aos medicamentos antimoniais, a anfotericina B é comumente utilizada como medicamento de escolha, possuindo alta eficiência, porém apresenta muitos efeitos adversos como, principalmente, a nefrotoxicidade, e necessita de acompanhamento hospitalar. Estudos de fase II confirmaram que a anfotericina B incorporada a lipossomas é consideravelmente menos tóxica que a forma convencional, possuindo eficiência em baixas doses pelo aumento de sua biodisponibilidade e farmacocinética, sendo absorvida preferencialmente pelas células do retículo endotelial, porém seu alto custo limita seu uso (RATH et al., 2003). O custo de um tratamento com duração de dois a quatro dias para um paciente pesando 70 Kg é de aproximadamente US\$ 504 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010b).

2.3.3 Miltefosina

A miltefosina, mostrada na Figura 6, é um fármaco que apresenta um grupamento alquilfosfocolina em sua estrutura, inicialmente utilizado como agente anticâncer, que age acumulando-se no interior do parasito e causando sua apoptose, além disto, reduz o teor de lipídios na membrana de promastigotas e aumenta o teor de fosfatidiletanolamina, sugerindo uma inibição da fosfatidiletanolamina-*N*-metiltransferase e diminuição da proliferação parasitária. Este medicamento apresentou ser teratogênico, abortivo, possui alta meia vida no

organismo e em poucos casos apresentou recidiva após 9 a 12 meses. Possui baixa toxicidade quando comparada com os medicamentos antimoniais, sendo raros os casos de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (NAGLE et al., 2014; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Cepas resistentes e falha no tratamento já foram relatadas em tratamentos da Leishmaniose Visceral com a miltefosina (TRINCONI et al., 2016).

Figura 6 - Estrutura química da miltefosina.

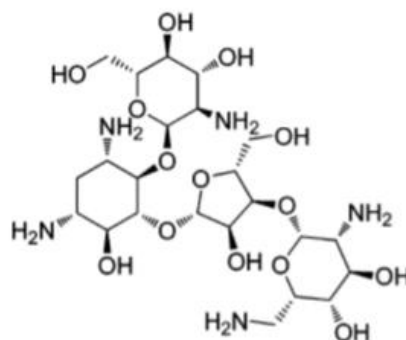


Fonte: Adaptado de PUBCHEM (2005b).

2.3.4 Paromomicina

A Paromomicina, ilustrada na Figura 7, é um aminoglicosídeo que age contra bactérias e contra a Leishmaniose com alta tolerabilidade, baixa toxicidade, baixo custo e boa eficiência, porém menor que nos tratamentos com medicamentos antimoniais. Seu mecanismo de ação ainda não é claro, porém a mitocôndria foi apontada como seu alvo principal, além de agir também na síntese proteica, alteração no RNA ribossomal, modificação da fluidez de membrana e metabolismo lipídico. A paromomicina é efetiva em casos de Leishmaniose Visceral e Cutânea, porém seu uso é maior para o tratamento de Leishmaniose Cutânea em regiões endêmicas (SANGSHETTI et al., 2015; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

Figura 7 - Estrutura química da paromomicina

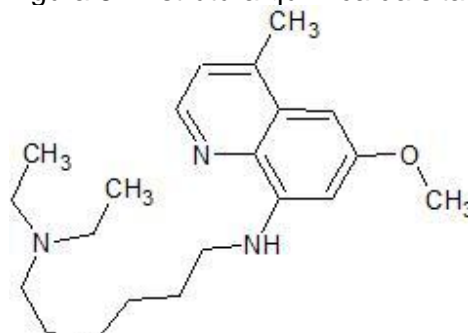


Fonte: NAGLE et al. (2014).

2.3.5 Sitamaquina

A sitamaquina, demonstrada na Figura 8, é uma aminoquinolina desenvolvida para o tratamento da Leishmaniose Visceral que interage com a membrana, por atração eletrostática entre fosfolipídios aniônicos e as cargas positivas do fármaco, e se acumula no citosol da Leishmaniose, afetando a motilidade, morfologia e o crescimento do parasito, além de levar ao colapso no potencial de membrana mitocondrial. Alguns efeitos colaterais conhecidos são vômito, dispepsia, cianose, síndrome nefrótica e glomerulonefrite. Estudos de fase II demonstraram eficiência e tolerabilidade contra Leishmaniose Visceral, porém estudos mais aprofundados são necessários para um melhor conhecimento de sua eficácia e toxicidade. Sua meia-vida de eliminação é curta, impedindo um mecanismo de resistência emergente. (LOISEAU; COJEAN; SCHRÉVEL, 2011; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

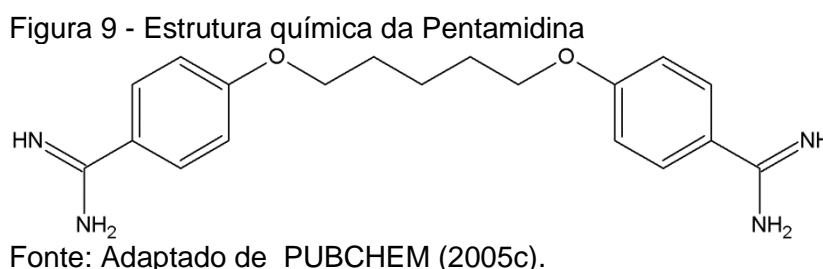
Figura 8 - Estrutura química da sitamaquina.



Fonte: Adaptado de PUBCHEM (2005d).

2.3.6 Pentamidina

A Pentamidina, demonstrada na Figura 9, foi utilizada em alguns países como terapia de segunda escolha em casos de Leishmaniose Visceral, porém sua toxicidade e o desenvolvimento de mecanismos de resistência pelo parasito levou à sua substituição. Seu uso é indicado em casos de Leishmaniose Cutânea causada por *L. guyanensis* e em países onde ela é o único medicamento leishmanicida disponível. Casos de toxicidade podem levar a hipoglicemia, hipotensão, febre, miocardites, toxicidade renal e ao surgimento da síndrome de diabetes *mellitus* insulino dependente (NAGLE et al., 2014).

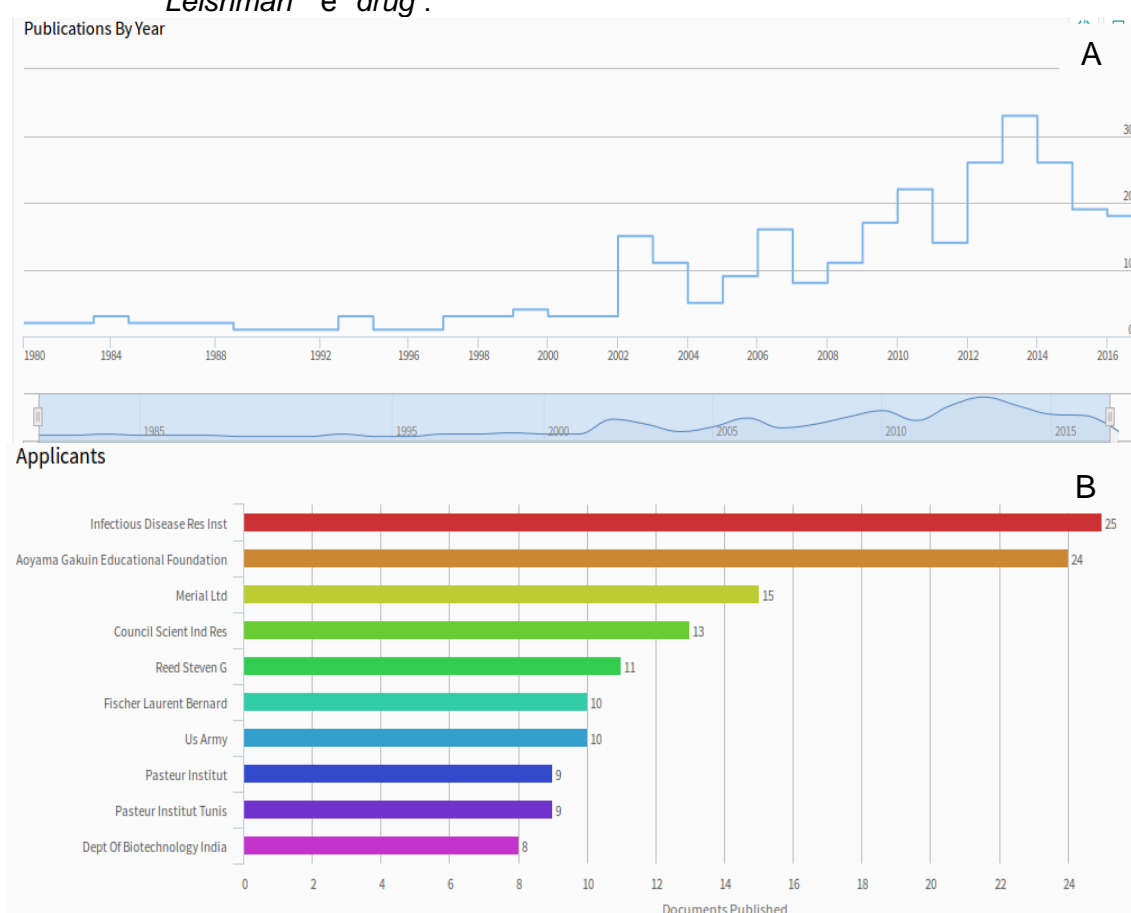


O mecanismo de ação da Pentamidina ainda não foi esclarecido, porém, sabe-se que esta se liga ao DNA mitocondrial (kDNA) do parasito e leva a sua clivagem, além de interagir de modo inibitório com a Topoisomerase I, afetando a replicação e transcrição celular. Estudos demonstram que o desenvolvimento de resistência do parasito ao fármaco está relacionado ao aumento de seu efluxo para o exterior da mitocôndria (denominada cinetoplasto) e produção de sequências de kDNA pobres em adenosina e timidina, que são sítios de ligação com o fármaco (JEAN-MORENO et al., 2006). A ação da Pentamidina sobre a biossíntese de poliaminas ainda não foi determinada, sendo que alguns estudos demonstraram poucas evidências entre a atividade leishmanicida da Pentamidina e a inibição da maquinaria biossintética da poliamina (BASSELIN et al., 1997; ROBERTS et al., 2007).

2.4 MERCADO DE PATENTES: BUSCA POR NOVOS FÁRMACOS LEISHMANICIDAS

O mercado de patentes para busca de tratamentos leishmanicidas teve um crescimento gradual desde 1974, e tem os institutos de pesquisa como principais depositantes de pedidos de patentes (FIGURA 10). Dentre os documentos depositados 17% envolvem produtos imunomoduladores, 16% envolvem o desenvolvimento de vacinas e 67% se tratam de agentes leishmanicidas (SINGH; JHA; KESWANI, 2016).

Figura 10 - A) Número de patentes publicadas por ano no período entre 1980 e 2016. B) Número de publicações realizada por cada entidade solicitante de patente. Busca realizada no banco de dados Lens por patentes contendo os termos “*Leishman**” e “*drug*”.

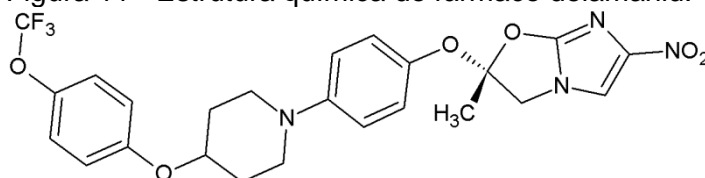


Fonte: SINGH; JHA; KESWANI (2016).

Em um pedido de patente de número WO2017072523A1 publicada em 2017, Alan Fairlamb e colaboradores evidenciaram a ação do fármaco Delamanid, demonstrado na Figura 11, um composto nitroaromático, e compostos relacionados no tratamento da Leishmaniose. Os valores de EC_{50} de Delamanid frente a amastigota axênica e promastigota de *L. donovani* foram $5,4 \pm 0,05$ nM e $15,5 \pm 0,07$

nM, respectivamente, agindo seletivamente em células do parasito devido à baixa citotoxicidade em macrófagos humanos HepG2 ($EC_{50} = > 5000$ nM).

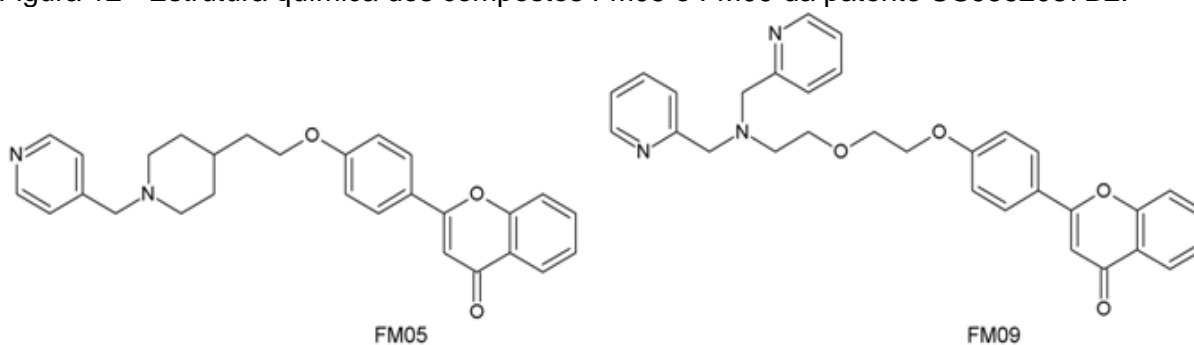
Figura 11 - Estrutura química do fármaco delamanid.



Fonte: Adaptado de FAIRLAMB et al. (2017).

A ação anti-leishmania de derivados sintéticos de flavonóides contendo um grupamento amina foi registrada por Larry Ming-Cheung Chow e colaboradores na patente US9562037B2 (2017). Dentre os compostos que se destacaram estão o FM05, ilustrado na Figura 12, com CI_{50} em promastigotas de *L. donovani* cepa Ld39 de $0,3 \pm 0,1$ μ M e amastigotas >10 μ M e citotoxicidade em células L929 de fibroblastos de rato com $CI_{50} >100$ μ M; bem como o composto FM09, ilustrado na Figura 12, que apresentou CI_{50} em promastigotas de *L. donovani* cepa Ld39 de $0,5 \pm 0,1$ μ M e amastigotas $<0,37$ μ M e citotoxicidade em células L929 com $CI_{50} >33$ μ M. Foi indicado a ação indutora de estresse oxidativo em macrófagos, que levam a morte de amastigotas, pelo composto FM09 a uma exposição de 46 horas em concentração de 30 μ M.

Figura 12 - Estrutura química dos compostos FM05 e FM09 da patente US9562037B2.

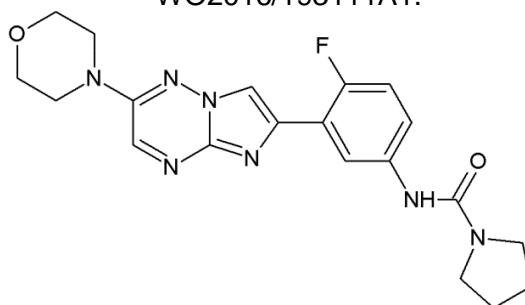


Fonte: Adaptado de CHOW et al. (2017)

No estudo de imidazotriazinas realizado por Stephen Brand e colaboradores (2016) descrito no pedido de patente de número WO2016/193111A1 foi demonstrado atividade leishmanicida intramacrófago em amastigotas da espécie *L. donovani*, porém também foi encontrado citotoxicidade contra células THP-1 humanas, com um valor de índice de seletividade (pEC_{50} células THP-1 / pEC_{50}

parasito) para o composto “*Example 1*”, demonstrado na Figura 13, de 0,69 para o ensaio 1 e de 0,63 para o ensaio 5, descritos no pedido de patente. O perfil de toxicidade se repetiu para todos os compostos estudados.

Figura 13 - Estrutura química do composto “*Example 1*” do pedido de patente WO2016/193111A1.



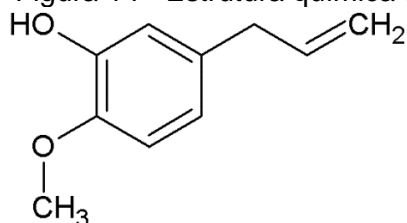
"Example 1"

Fonte: Adaptado de BRAND et al. (2016).

Na busca de extratos obtidos de produtos vegetais com atividade leishmanicida encontra-se uma variedade de compostos que demonstram eficácia e segurança em estudos realizados e também por conhecimentos da medicina popular e que fornecem informações importantes para o desenvolvimento de novos fármacos. Entre os estudos conduzidos, encontram-se patentes que evidenciam a ação biológica, processos de extração e purificação de produtos naturais. Entre as primeiras publicações descrevendo a ação leishmanicida de extratos vegetais [busca realizada no banco de dados OMPI (Organização Mundial de Propriedade Intelectual) com as palavras chave “*leishmani*” e “*extract*”] está o estudo da atividade do extrato de raiz de *Cochlospermum angolense*, que inibiu 100% do crescimento de *Leishmania* numa concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (PRESBER et al., 1991).

As propriedades leishmanicidas da folha de betel foi descrita no pedido de patente de número WO2002045731A1 e publicada em 2002. Na sua composição de seu óleo essencial estão presentes fenóis, terpenos e o constituinte característico conhecido como chavibetol, um isômero do eugenol representado na Figura 14, que demonstrou reduzir a viabilidade *in vitro* de 57 a 79% de promastigotas de *Leishmania donovani* e a carga parasitária de 93 a 95% de baço e fígado de hamsters golden (BANDYOPAD-HYAY et al., 2002).

Figura 14 - Estrutura química do chavibetol.



Fonte: Adaptado de BANDYOPAD-HYAY et al. (2002).

Atividade leishmanicida também já foi evidenciada em extratos fúngicos, como das espécies *Drechslera rostrata* e *Eurotium tonophilum* (pedido de patente EP2735339A1, 2014), cogumelos *Agaricus blazei* (pedido de patente WO2011140623A1, 2014), entre outras.

2.5 ALVOS MOLECULARES PARA O COMBATE DA LEISHMANIOSE

A busca por fármacos leishmanicidas menos tóxicos, mais eficazes e que causem o mínimo de efeitos colaterais, faz com que alvos moleculares conhecidos do parasito e que são ausentes no hospedeiro humano sejam mais atraentes e tidos como alvos ideais. As enzimas relacionadas com a rota metabólica da tripanotona, essenciais para a modulação do estresse oxidativo no parasito, têm sido objeto de estudos em alguns artigos; entre elas, as enzimas tripanotona sintetase e tripanotona peroxidase são destacadas como possíveis alvos de inibidores mais seletivos, pois estão ausentes no hospedeiro humano. As enzimas DNA topoisomerasas, envolvidas no processo de replicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA do parasito, possuem fatores que distinguem estas enzimas das do hospedeiro (NAGLE et al., 2014).

O Quadro 1 cita alguns dos alvos moleculares que têm sido objeto de estudos para possíveis fármacos leishmanicidas.

Quadro 1 - Potenciais alvos moleculares para fármacos leishmanicidas.

Enzimas alvo	Ação biológica
Escaleno sintase e delta 24(25) esterol metiltransferases	Envolvidos na biossíntese do esterol que é essencial na manutenção da estrutura de membrana e na sinalização celular
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Regulação da glicólise realizada em glicossomos
Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase	Envolvido na captação de purinas do hospedeiro, essencial na síntese de nucleotídeos
Enzimas biossintéticas de glicosilfosfatidilinositol	Protege o parasito de hidrolases e do sistema imunológico do hospedeiro, mediada pelo complemento via alternativa, devido os glicolipídeos glicosilfosfatidil-inositol agir fixando-se a glicolipídeos de membrana
Sistema glioxalase	Possui ação desintoxicante
Sistema tripanotiona	Protege o parasito de moléculas NO, espécies reativas de oxigênio com ação potencialmente letal
Proteína dissulfito isomerase	Protege o parasito no meio intracelular do hospedeiro
Topoisomerases	Envolvidas no processo de replicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA do parasito
Metacaspases	É essencial para a separação do núcleo e do cinetoplasto do parasito
Enzimas biossintéticas da poliamina	Relacionada na diferenciação do parasito de promastigota a amastigota e regula a peroxidação lipídica (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).
Fe- superóxido dismutase	Protege as enzimas glicossomais da toxicidade de radicais superóxido. Esta enzima é ausente no hospedeiro (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).
proteínas-cinase ativadas por mitógenos (MAPK)	Envolvida na transformação e proliferação do parasito (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

Fonte: Adaptado de DAS et al. (2013).

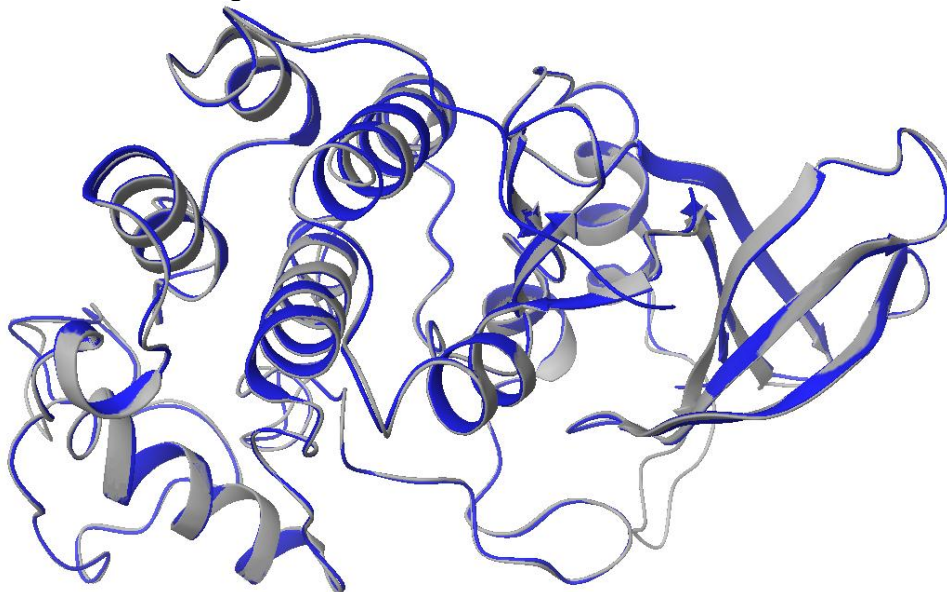
2.5.1 Cinases dependentes de ciclina

As proteínas cinases catalisam reações de fosforilação pela transferência do grupo fosfato do ATP para um grupo hidroxila da cadeia lateral de aminoácidos de serina, treonina ou tirosina em uma proteína. Existem diversos tipos de proteínas cinases diferentes, entre elas destacam-se as cinases dependentes de ciclina, que são inativas na forma de monômeros e se tornam ativas na presença de uma proteína regulatória, a ciclina, que tem uma concentração variável durante o ciclo celular (SARAIVA et al., 2011). As cinases dependentes de ciclina (CDC) possuem um papel importante no ciclo celular de eucariontes pois estão presentes no

mecanismo de divisão celular, transcrição, diferenciação e apoptose. A CRK3, uma proteína serina/treonina cinase dependente de ciclina da família das CDC isolada em *Leishmania*, é essencial para a transição pela fase G2 (fase na qual a célula se prepara para a mitose) a M (mitótica), regulando o ciclo celular do parasito; sua inibição leva a morte celular por apoptose. Inibidores da atividade da CRK3 se mostram alvos potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicida, entre eles inibidores substrato específico, inibidores ATP-competidores, inibidores de ativação e inibidores irreversíveis (PEREIRA et al., 2013; WYATT et al., 2011; NO et al., 2003).

A CRK3 contém resíduos e domínios que são encontrados também em outros organismos como o domínio *PSTAIRE*, envolvido na ligação da ciclina; THR14 e TYR15, os quais são necessários com a ligação de ATP; e THR161, o resíduo de T-loop, fosforilado por uma cinase de ativação CDC (WALKER, 2011). Esta proteína possui uma homologia a proteína CDC2 (cinase dependente de ciclina 2) visualizada em mamíferos, sendo evidenciado em estudo que 58% da sequência de aminoácidos é comum a sequência da proteína humana, além disto, uma comparação do sítio ativo de ligação de ciclina demonstrou uma similaridade quanto a polaridade e carga nesta região (PEREIRA et al., 2013). O alinhamento entre das estruturas tridimensionais das proteínas CDC2 humana e CRK3 está demonstrado na Figura 15. Foi demonstrado também que 78% de sua sequência é comum a proteína CRK3 do *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* (ALI et al., 2012).

Figura 15 - Sobreposição das estruturas tridimensionais das proteínas CDC2 humana (azul) e CRK3 (cinza), obtida por modelagem por homologia.



Fonte: Adaptado de PEREIRA et al. (2013).

A análise estrutural da CRK3 da espécie *L. donovani* demonstrou que se trata de uma proteína com uma composição de 37% de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, rico em resíduos de leucina (12,5%). As regiões de fosforilação em resíduos de treonina e tirosina, que regulam a atividade da enzima, são mantidas em relação à enzima encontrada em humanos, demonstrando a similaridade do controle desta enzima no ciclo celular (ALI et al., 2012).

A identificação de inibidores ATP-competidor mostra-se um campo promissor no estudo de novos fármacos, já que o ATP é o cofator legítimo de uma CDC (PEREIRA et al., 2013). Mudanças pequenas em sequência de aminoácidos em locais de ligação de ATP da CRK3 de *Leishmania* com relação a CDC2 humana, evidenciadas em estudos, podem ser utilizados como alvos para a inibição seletiva da CRK3. A principal divergência em cadeias laterais de aminoácidos da CRK3 com a CDC2 humana é substituição de PHE82 e LEU83 com tirosina e valina na CRK3, GLN85 é substituído por alanina e HIS84 por glutamato (CLEGHORN et al., 2011).

2.5.2 Arginase

As enzimas que participam da via de síntese da poliamina (PA) em *Leishmania* estão envolvidas em processos como a proliferação e diferenciação celular e em mecanismos antioxidantes de espécies reativas de nitrogênio e de

oxigênio produzidas pelo sistema de defesa do hospedeiro. Dentre estas enzimas, a arginase é uma metaloenzima binuclear com função molecular de hidrolase, presente nos glicossomos, sendo a primeira enzima da via sintética de PA, responsável pela conversão da arginina em L-ornitina. Toda a arginina utilizada pelo parasito é obtida de seu hospedeiro, levando a redução de sua concentração no local da infecção, reduzindo a produção de óxido nítrico derivado da arginina por macrófagos. A diminuição do nível desta enzima está correlacionada com um aumento do nível de óxido nítrico, colaborando para a morte do parasito (D'ANTONIO et al., 2013; REIS et al., 2013).

O mecanismo de inibição enzimática exercido pela interação entre a enzima arginase e compostos ácidos derivados de boro, como o ligante ácido 2(S)-amino-6-borono-hexanóico (ABH), está relacionado com o ataque nucleofílico realizado pela enzima ao inibidor e formação de um intermediário tetraédrico do ânion boronato, de modo similar ao que ocorre com o substrato natural (D'ANTONIO et al., 2013). Átomos de manganês e moléculas de água são essenciais para a atividade enzimática máxima da arginase por formar uma ponte metálica entre esta enzima e o substrato (SILVA et al., 2008).

2.5.3 Tripanotiona sintetase

A via de síntese da tripanotiona utiliza as moléculas espermidina, produto da via sintética da poliamina, e a glutatona para a síntese de seu produto, a tripanotiona, que é responsável pela modulação do estresse oxidativo do parasito. A enzima tripanotiona sintetase (TS) se mostra um alvo promissor desta rota sintética para o desenvolvimento de fármacos leishmanicidas devido à ausência de estruturas homólogas presentes no humano, e por ser uma enzima essencial para a viabilidade e para a infectividade do parasito (NAGLE et al., 2014).

A enzima tripanotiona sintetase é uma enzima bifuncional que catalisa 4 reações relacionadas com a biossíntese e a hidrólise da tripanotiona, que além de proteger o parasito contra o estresse oxidativo regula os níveis de poliaminas, essenciais para a proliferação e diferenciação celular. A estrutura da enzima tripanotiona sintetase é composta por dois sítios catalíticos, o domínio nitrogênio-terminal (resíduos situados na posição entre 1-215 e 634-652) constitui-se de uma amidase amidohidrolase/peptidase dependente de cisteína e histidina, uma cisteíno

protease da família da papaína, que catalisa a hidrólise da tripanotiona e da glutathionilperimidina; e o domínio sintetase carbono-terminal (resíduos situados na posição entre 216–633), responsável pela biossíntese de tripanotiona com a hidrólise moléculas de ATP. O domínio amidase é composto por duas α -hélices e uma folha β contendo a tríade catalítica Cys-59, His-130 e Asp-146 (FYFE et al., 2008).

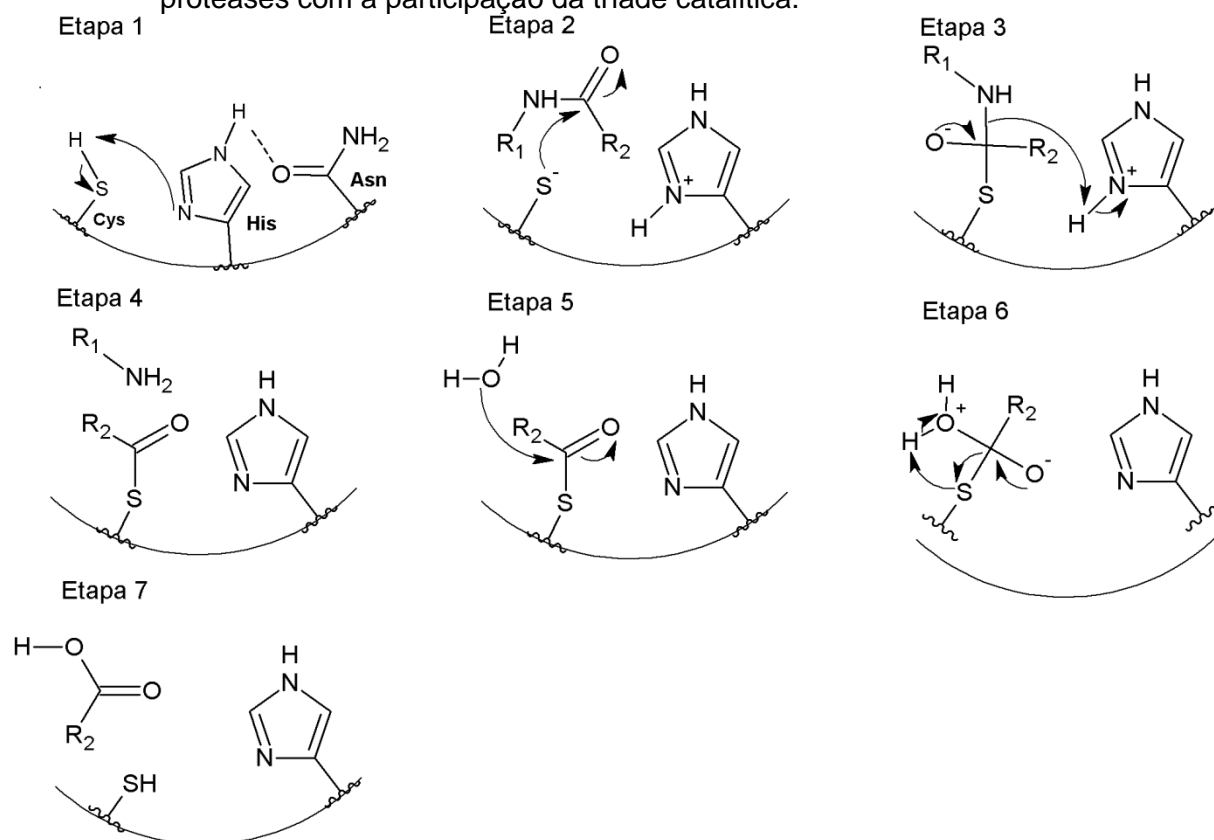
Experimentos indicaram que ausência da atividade da enzima TS no parasito levaram ao aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo e perda da proliferação e viabilidade celular (FYFE et al., 2008).

2.5.4 Cisteíno protease

As enzimas da classe das cisteíno proteases (CP) são encontradas em diferentes espécies de *Leishmania* spp. no estágio metacíclico e em amastigotas intracelulares, sendo essencial na infectividade do parasito durante a sua interação com o hospedeiro, na invasão de promastigotas à macrófagos, na evasão do sistema imune, em sua propagação por degradar componentes da matriz extracelular do hospedeiro, na transformação das formas promastigotas à amastigotas do parasito e sua nutrição (AZIZI et al., 2009; JUDICE et al., 2013; MOTTRAM et al., 1997).

Sua função está relacionada com metabolismo de proteínas levando à hidrólise irreversível de ligações peptídicas pelo ataque nucleofílico realizado pelo resíduo de cisteína, e posterior formação de um intermediário tetraédrico. Os resíduos catalíticos desta classe de enzimas são os aminoácidos cisteína, histidina e asparagina situados entre dois subdomínios, sendo um deles um feixe de hélices, com o resíduo de cisteína ao final de um deles, e o outro uma folha beta com os resíduos histidina e aspartato. A desprotonação do grupamento sulfidríla da cadeia lateral da cisteína pelo anel imidazólico da histidina no sítio catalítico leva à hidrólise de peptídeos pelo ataque da cisteína desprotonada ao substrato (FIGURA 16). Um resíduo de glutamina também auxilia estabilizando o intermediário tetraédrico acil que se forma durante a catálise no sítio ativo (GROVES et al., 1996).

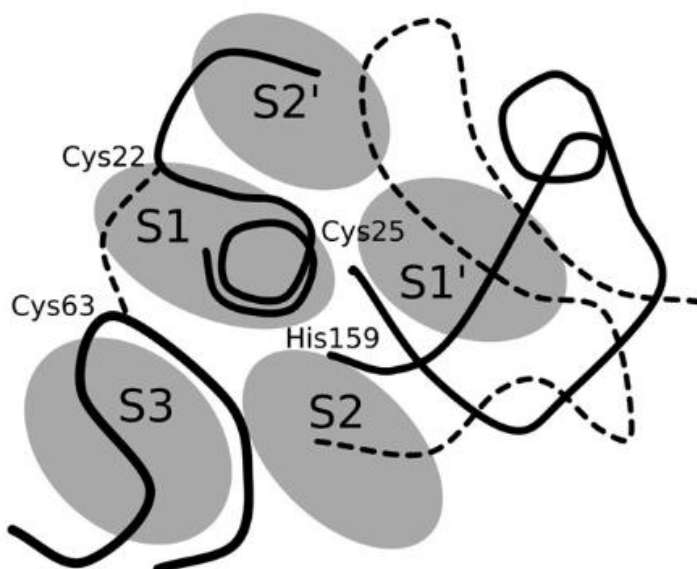
Figura 16 – Mecanismo de hidrólise de peptídeos no sítio ativo de enzimas cisteíno proteases com a participação da tríade catalítica.



Fonte: Adaptado de GOMES et al. (2013).

O sítio ativo das cisteíno proteases é dividido em subsítios de interação com o substrato, denominados S1, S1', S2, S2' e S3 (FIGURA 17). Os substratos peptídicos hidrolisados por esta classe de enzima são altamente básicos, tal afinidade é demonstrada pelos sítios S1, S1', S2' e S3; já o sítio S2 demonstra maior afinidade por substratos hidrofóbicos, além de permitir a interação com grupamentos carregados positivamente devido a presença de um aminoácido glutamato (Glu205) flexível. O sítio S2 é o principal subsítio responsável pela especificidade da enzima (GILLMOR; CRAIK; FLETTERICK, 1997; HILAIRE et al., 2000; TURK et al., 2012).

Figura 17 - Sítio ativo de enzimas cisteíno proteases.



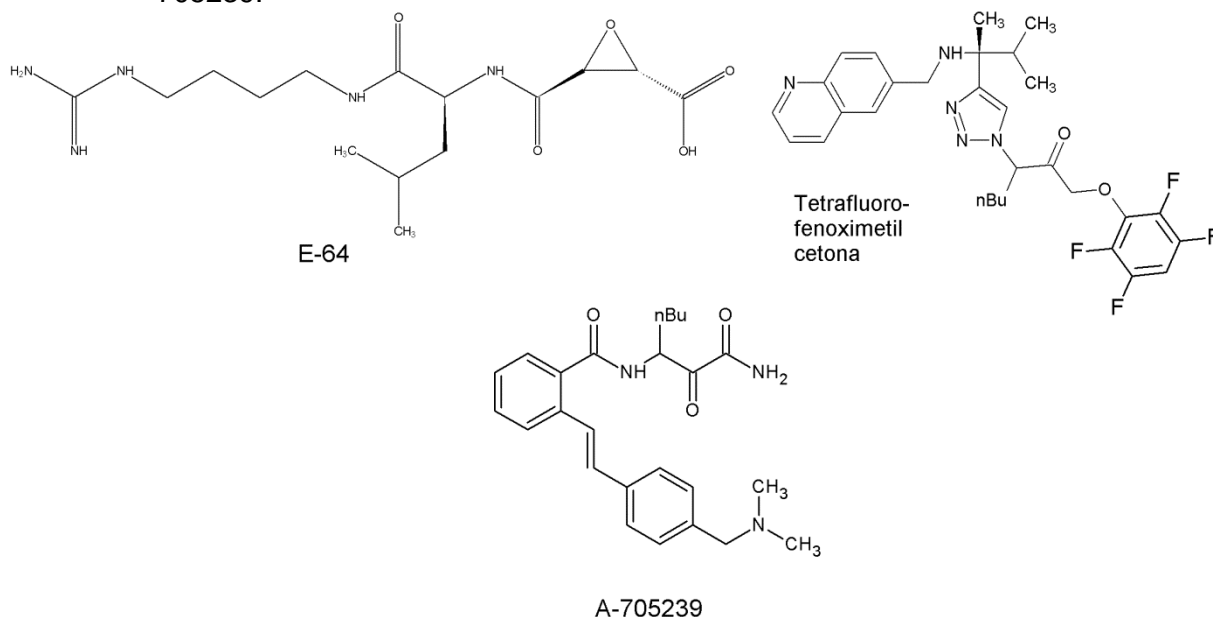
Fonte: TURK et al. (2012).

As cisteíno proteases do tipo B (CPB) são essenciais para a sobrevivência do parasito nos fagolisossomos por inibir a cascata de produção do fator de transcrição nuclear NF- κ B e por quebrar moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, evitando a produção da citocina IL-12 e levando a produção de IL-4, demonstrado em estudos com *L. mexicana* (AZIZI et al., 2009). A cisteíno protease do tipo B, rCPB2.8, similar à família da catepsina L de *L. mexicana* é abundante e estágio-regulada, sendo mais expressa em amastigotas, podendo ocorrer também na superfície do parasito. Sua forma precursora inativa, o *zymogen*, é expressa contendo uma pré-região de 18 aminoácidos, que é removida por uma peptidase após a transferência para o retículo endoplasmático, uma pró-região de 106 aminoácidos (terminado nas sequência de aminoácidos AVPDVDW), importante para a estabilidade da enzima e seu *foldíng* correto; um domínio contendo o sítio ativo com 219 aminoácidos e uma região carbono-terminal com um número variável de aminoácidos, que se mostra não essencial para o funcionamento desta enzima, mas está envolvido com seu direcionamento até o local de sua ação. A ativação da enzima em uma forma madura é realizada após clivagem da pró-região e parte de região carbono-terminal, em um processo autocatalítico sob condições ácidas ou na presença de glicosaminoglicanas (SANDERSON et al., 2000).

Os inibidores de cisteíno proteases podem se ligar de modo reversível ou irreversível no local do sítio ativo, de modo competitivo, ou em outro local da enzima, de modo não-competitivo. A inibição reversível da enzima é um processo de equilíbrio no qual ocorre a formação e dissociação do complexo enzima e substrato, levando à diminuição de sua atividade dependendo da concentração no meio dos componentes envolvidos (enzima, substrato e inibidor) (DUGGLEBY, 1994; SANDERSON, 2000). Inibições de modo irreversíveis por ligação covalente entre a enzima e o composto levam à inibição permanente da enzima e pode configurar riscos já que o restabelecimento de sua atividade só ocorre após a reexpressão desta, entre os risco estão: a inibição irreversível não específica de proteínas do hospedeiro (interações *off-target*), levando à toxicidade, e a possível formação de proteínas modificadas que geram um processo alergênico (SIKLOS et al., 2015).

Epoxisuccinatos, vinilsulfonatos, diazometilcetonas, halometilcetona e aciloximetil cetonas são exemplos de inibidores eletrofílicos que agem de forma peptidiomimética e se ligam covalentemente à proteases. O primeiro composto descoberto que demonstrou atividade por ligar-se irreversivelmente ao resíduo Cys do sítio ativo foi o composto E-64, ilustrado na Figura 18, um epoxisuccinato obtido de *Aspergillus japonicus*. Cetonas ativadas, como o composto tetrafluoro-fenoximetil cetona demonstrado na Figura 18, também são exemplos de inibidoras potentes da enzima cruzaina por um mecanismo provável semelhante, que permite a ligação covalente com o resíduo Cys e deslocamento de um grupo de saída. α -cetoácidos, α -cetoésteres e α -cetoamidas, exemplificado pelo composto A-705239, ilustrado na Figura 18, são compostos eletrofílicos que formam um estado de transição tetraédrico ao interagir com resíduos nucleófilos da enzima (Cys, Ser ou Thr) similar ao que ocorre na ligação covalente, porém a interação ocorre de forma reversível (SIKLOS et al., 2015).

Figura 18 - Estrutura química dos compostos E-64, tetrafluoro-fenoximetil cetona e A-705239.



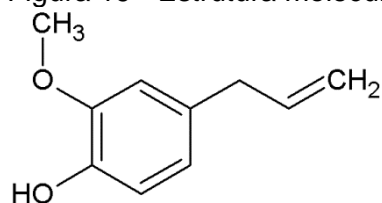
Fonte: Adaptado de SIKLOS et al. (2015).

Cisteíno proteases de *Trypanosoma cruzi* já foram cristalografadas e encontram-se depositadas no banco de dados PDB; entre elas a enzima cruzaina (código ID: 1EWP e 1AIM), que contém 215 aminoácidos em sua sequência primária, possui 60% de identidade, em alinhamento global realizado pela plataforma BLAST, com a enzima rCPB2.8 de *Leishmania mexicana*.

2.6 EUGENOL COMO SUBSTÂNCIA BIOATIVA

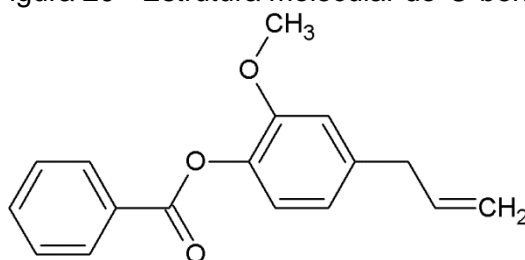
Os óleos essenciais, produtos voláteis presentes em alguns vegetais, têm sido bastante estudados devido à sua riqueza química em fenóis, aldeídos e álcoois. Estudos com o eugenol, representado na Figura 19, (4-alil-2-metoxi-fenol), componente majoritário do óleo essencial do cravo-da-índia, presente também no manjeriço, louro e outros vegetais, têm mostrado diversas atividades biológicas, entre elas a ação fungicida, bactericida, anti-inflamatório, ação antioxidante, leishmanicida, entre outras (HUANG et al., 2015; MODJINOU et al., 2016; PEREIRA; MENDES; LIMA, 2013).

Figura 19 - Estrutura molecular do eugenol.



Fonte: Adaptado de HUANG et al. (2015).

O óleo essencial do cravo-da-índia demonstrou ter ação leishmanicida contra a *Leishmania donovani* por levar a lise da membrana mitocondrial, fragmentação do DNA e por induzir a apoptose (ISLAMUDDIN; SAHAL; AFRIN, 2014). Em estudo de Cl_{50} de promastigotas foi encontrado um valor de 80 $\mu\text{g/mL}$ (UEDA-NAKAMURA et al., 2006). O éster derivado do eugenol *O*-benzoil-eugenol, ilustrado na Figura 20, demonstrou atividade leishmanicida em promastigotas de *L. infantum chagasi* com EC_{50} de 10,58 $\mu\text{g/mL} \pm 0,18$ em estudos realizados por Selene Maia de Moraes e colaboradores (2014).

Figura 20 - Estrutura molecular do *O*-benzoil-eugenol.

Fonte: Adaptado de MORAIS et al. (2014).

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo estudar uma série de novos ésteres derivados de base de Mannich (**SBM2-SBM13**) sintetizados a partir do eugenol, por meio do uso de estratégia da Grande Área da Química Medicinal, como a Modelagem Molecular, Síntese Orgânica Medicinal e Avaliação Farmacológica, visando a obtenção de novos protótipos de fármacos leishmanicidas.

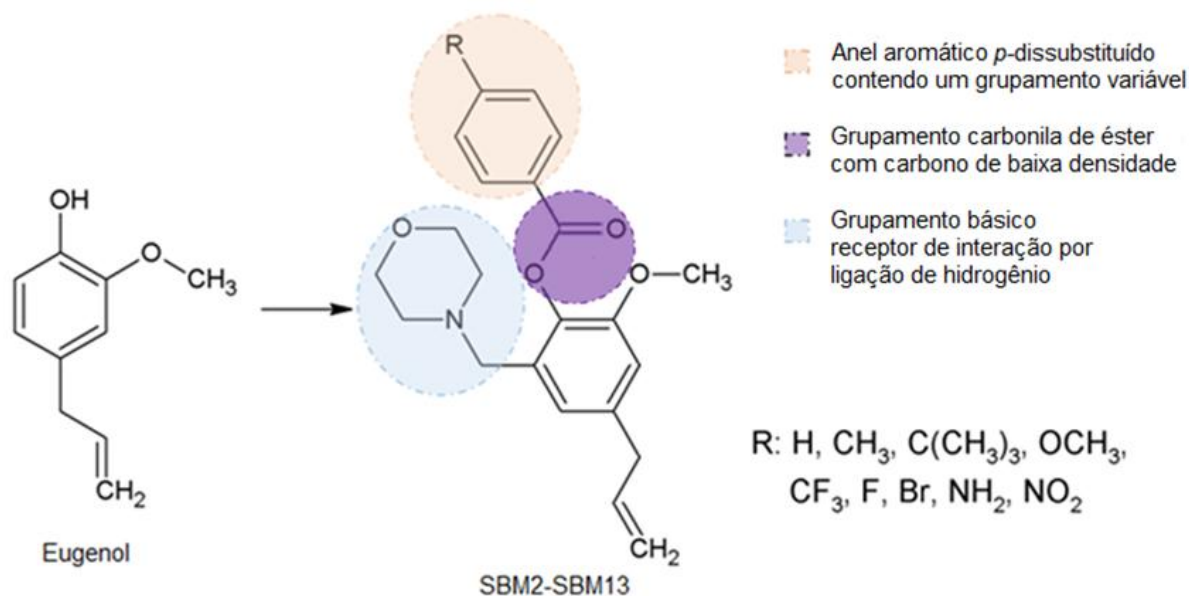
Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Realizar o estudo de Modelagem Molecular por Homologia a fim de obter a estrutura tridimensional da proteína rCPB2.8 de *Leishmania mexicana*. Estudar, por meio de técnicas de Ancoramento Molecular (*Molecular Docking*) visando avaliar os perfis de afinidade e parâmetros físico-químicos da série de derivados do eugenol, com alvos biológicos selecionados as enzimas da *Leishmania*: rCPB2.8, CRK3, tripanotona sintetase e arginase.
- b) Sintetizar, por meio de estratégias da Síntese Orgânica Medicinal, os derivados da série de Bases de Mannich a partir do eugenol.
- c) Identificar e caracterizar estruturalmente as substâncias sintetizadas, utilizando os métodos espectroscópicos usuais (Espectroscopia no UV/VIS e no Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono¹³ e Espectrometria de Massas).
- d) Determinar o potencial leishmanicida por estudo da atividade antipromastigota, in vitro, dos produtos obtidos.
- e) Determinar o potencial inibitório sobre a enzima rCPB2.8, in vitro.
- f) Determinar a citotoxicidade dos compostos sobre macrófagos de camundongos.
- g) Estabelecer uma relação entre estrutura química e atividade leishmanicida apresentada in vitro e nos resultados dos estudos computacionais das interações das moléculas sintetizadas.

4 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

O padrão estrutural da série, demonstrando as modificações realizadas na molécula do eugenol está ilustrada na Figura 21:

Figura 21 - Série de ésteres de base de Mannich derivados do eugenol.

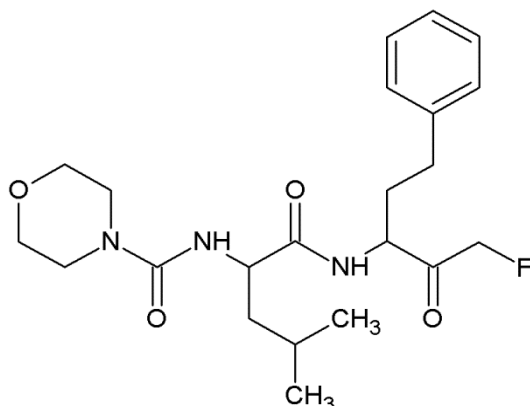


Fonte: Da autora.

Os ésteres de base de Mannich foram eleitos como possíveis candidatos a protótipos de fármacos leishmanicidas após o levantamento bibliográfico do modo de ação e características estruturais de alvos enzimático essenciais para a sobrevivência do parasito do gênero *Leishmania* no hospedeiro humano.

A interação entre as moléculas propostas neste trabalho e a enzima rCPB2.8 foi estudada devido à sua afinidade preferencial por substratos de caráter básico, característica encontrada nos compostos da série pela presença do grupamento morfolina, e também pela possibilidade dos compostos apresentados neste trabalho agirem como inibidores *peptide-like*, pela presença de um grupamento carbonila de éster com um carbono de baixa densidade eletrônica, possibilitando sua interação com resíduo Cys25, de modo semelhante à ligação entre a enzima e seu substrato natural (peptídeos). A presença de grupos funcionais semelhantes entre os compostos da série e um inibidor *peptide-like* conhecido, ilustrado na Figura 22, da cisteína protease cruzaina de *T. cruzi*, que possui 60% de identidade com a enzima rCPB2.8, pode ser um indicativo de uma possível interação desejada.

Figura 22 – Inibidor covalente *peptide-like* da cisteíno protease cruzaina de *T. cruzi*.



Fonte: Adaptado de

Outros três alvos moleculares presentes em espécies de *Leishmania* também foram selecionados para a realização de estudos de modelagem molecular com a finalidade de se estabelecer uma comparação de modo de interação entre a série e enzimas essenciais para o parasito. A escolha dos alvos enzimáticos baseou-se em alguns fatores, como a sua importância para a viabilidade do parasito; a ausência de estruturas semelhantes em humanos, como é o caso da enzima tripanotona sintetase (TS) de *Leishmania*; a existência de uma estrutura cristalográfica em banco de dados bem resolvida com a presença de uma substância inibidora, como é o caso da enzima arginase; e a semelhança de grupos funcionais de fármacos conhecidos que interajam com esta classe de enzimas, como é o caso do gefitinib, um inibidor ATP-competitivo de uma proteína tirosina cinase, que possui um grupamento metóxido, um grupo morfolina e presença de halogênios (cloro e flúor) semelhantes às moléculas aqui propostas, buscando assim a inibição da enzima cinase dependente de ciclina 3 presente em espécies de *Leishmania* (CRK3) (PAO et al., 2014).

Alterações no anel aromático na posição *para* ao grupamento carbonila do éster da série foi proposta para se investigar o perfil de interação entre os compostos e a enzima, além de obter uma relação com a atividade leishmanicida apresentada por estes. Entre as variações propostas estão: alterações de hidrossolubilidade; a adição de grupamentos volumosos; adição de grupamentos doadores de elétrons ao anel aromático e retiradores de elétrons; grupamentos receptores de interações de hidrogênio e doadores de interação de hidrogênio e adição de grupamento de caráter básico.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas de síntese e caracterização dos ésteres derivados da base de Mannich do eugenol propostos e as etapas para a realização do estudo de modelagem molecular são descritas a seguir.

5.1 MÉTODOS DE SÍNTESE

A etapa sintética foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) da UNIFAL-MG e os derivados propostos foram obtidos utilizando técnicas clássicas de química orgânica ou por adaptações destas.

A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel em suporte de alumínio com detector de fluorescência (Macherey-Nagel, DC-Fertigfolien ALUGRAM[®] Xtra Sil G/UV₂₅₄). As purificações por cromatografia em coluna (CC) foram realizadas com sílica gel 60, 70-230 mesh (Sorbline). As purificações por placa preparativa foram realizadas com sílica gel 60 com detector a UV 254 nm (Macherey-nagel).

As determinações das faixas de fusão foram obtidas em aparelho Bücher 535 (0-300°C), calibrado com vanilina P.A. Merck[®] (F.F.: 80 – 81 °C, LAYEK et al., 2011).

As análises de espectroscopia na região do infravermelho (IV) foram realizadas no Laboratório de Análise Química de Fármacos da UNIFAL-MG em espectrômetro Thermo Fisher Scientific Nicolet-iS50 e processados com o software OMNIC 9.2.41 com valores de bandas descritos em número de onda (cm⁻¹).

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UNIFAL-MG, em espectrômetro Bruker AC-300 (¹H: 300 MHz; ¹³C: 75 MHz). Foi utilizado clorofórmio deuterado (CDCl₃) como solvente de amostra em tubos de 5 mm e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Foi utilizado o software MestreNova[®] versão 6.0.2-5475 (Mestrelab Research L.S[®]) para o processamento dos espectros e obtenção dos valores de deslocamento químico (δ , ppm).

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais da

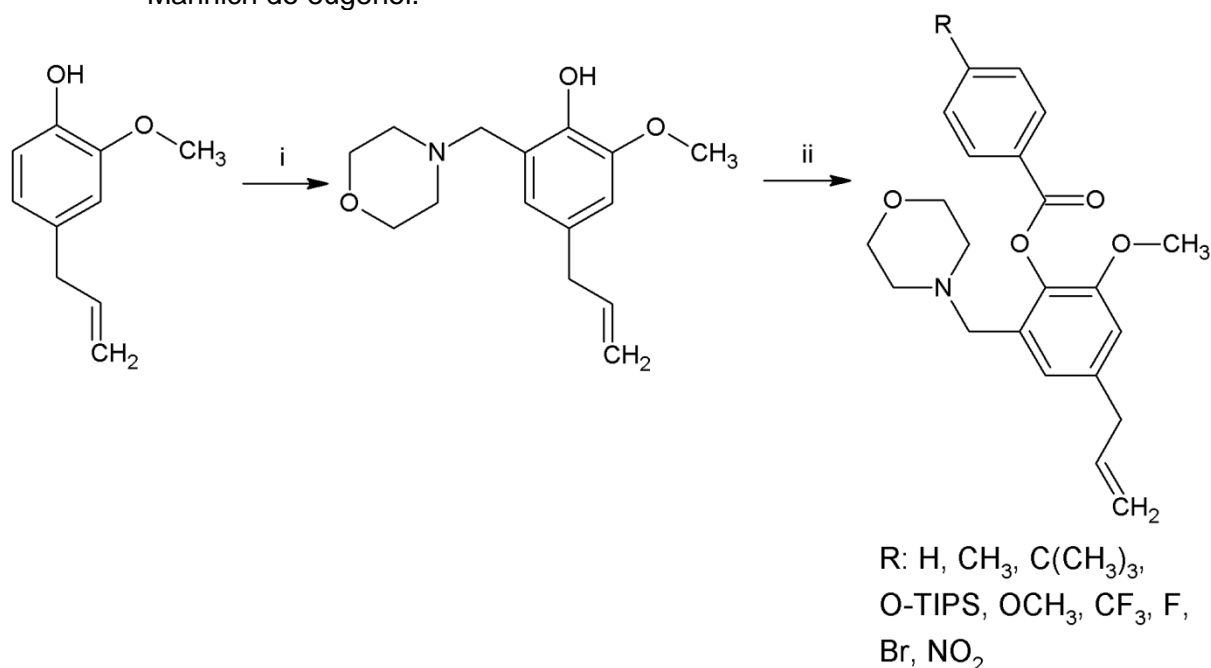
Universidade Federal do Triângulo Mineiro no equipamento espectrômetro de massas Shimadzu Biotech Axima Performance MALDI-TOF.

Os esquemas reacionais e os mecanismos de reação propostos foram desenhados utilizando o programa ACD/CHEMSKETCH versão C30E41 (ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT, 2016).

5.1.1 Síntese de ésteres de base de Mannich

A série de moléculas proposta como protótipos a candidatos a fármaco, ésteres derivados do produto natural eugenol, foi planejada baseando-se em uma série anteriormente obtida em nosso grupo de pesquisa de Química Medicinal no Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica - Unifal-MG (LQFar). Alterações no anel aromático ligado ao grupamento éster foram feitas a fim de poder se estabelecer uma relação entre a estrutura e a atividade farmacológica obtida. O esquema de rota sintética está demonstrado na Figura 23.

Figura 23 - Esquema da rota sintética seguido para obtenção dos derivados de base de Mannich do eugenol.



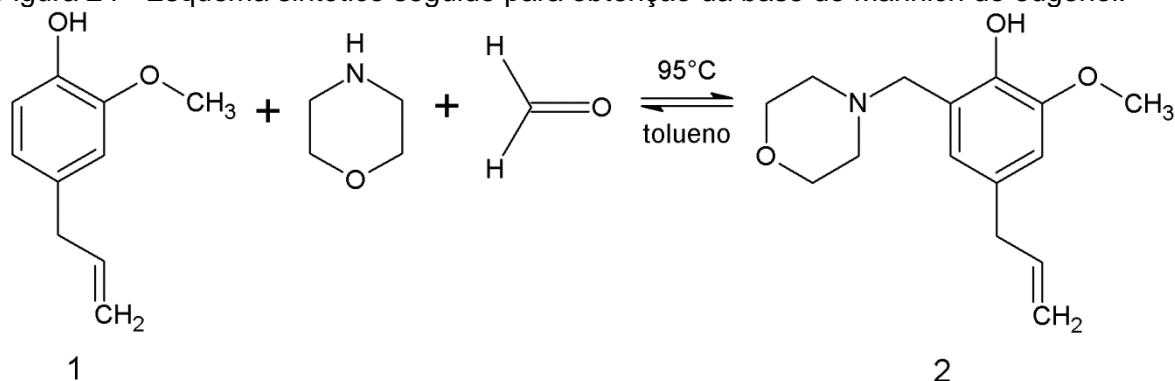
Fonte: Da autora.

Nota: i) morfolina, formaldeído, tolueno, 95°C. ii) DMAP, CH₂Cl₂, cloreto de ácido *p*-dissubstituído (Método 1) ou ácido benzóico *p*-dissubstituído + DCC (Método 2), t.a.

5.1.1.1 Síntese do composto 4-aliil-2-metoxi-6(morfolin-4-ilmetil)fenol (**2**)

A síntese do composto **2**, exemplificada na Figura 24, foi realizada conforme método descrito por Abrão e colaboradores (2015).

Figura 24 - Esquema sintético seguido para obtenção da base de Mannich do eugenol.



Fonte: Da autora.

O procedimento de síntese foi realizado em um balão de fundo redondo com um volume total de 250 mL contendo 50 mL de tolueno, onde foram adicionados 5 mL de eugenol (**1**, 32,17 mmol), 5,62 mL de morfolina (63,62 mmol) e 4,85 mL de formaldeído (82,74 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética vigorosa e refluxo à 95°C, por cerca de 24 horas. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente hexano e acetato de etila (3,5:6,5, v/v). Após o consumo total do material de partida e formação de um produto majoritário com Rf diferente deste, a mistura reacional foi extraída com HCl 1 mol.L⁻¹ (5 x 30 mL). O pH da fase aquosa foi elevado até aproximadamente 6 pela adição de solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio e foi extraída novamente com CH₂Cl₂ (5 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e foi filtrada em papel de filtro. Em seguida, o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório e o produto foi purificado por CC (acetato de etila/hexano, 3,5:6,5, v/v).

Foi obtido um sólido branco como produto (**2**) com 50% de rendimento (16,4 mmol) que apresentou faixa de fusão entre 48-49°C.

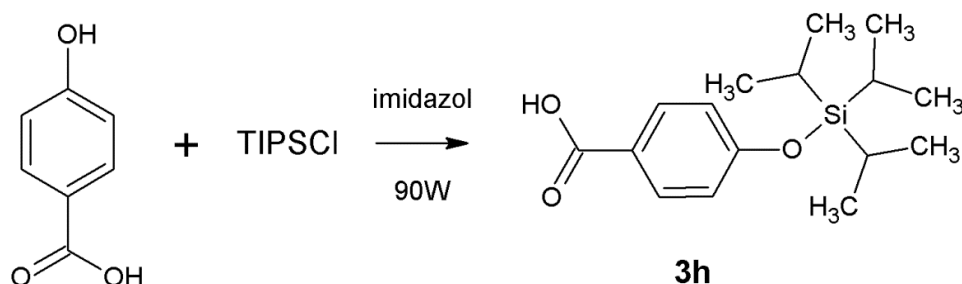
Dados de caracterização do derivado morfólico do eugenol:

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3297 (O-H); 3013 (C-H sp²); 2962 e 2817 (C-H sp³); 1659 (C=C alifático); 1589, 1493, 1457 (C=C aromático); 1397 (CH₃); 1234 e 1072 (éter alquil-arílico); 1111 (C-N alifático); 989 e 906 (RCH=CH₂).

5.1.1.2 Síntese do composto ácido 4-[(triisopropilsilil)oxi]benzóico.

Com o objetivo de síntese do éster *p*-hidroxibenzoato de base de Mannich do eugenol, inicialmente foi realizada a proteção da hidroxila fenólica do ácido *p*-hidroxibenzoico, demonstrado na Figura 25, conforme método descrito na patente de número WO2005077124A2 por Molteni e colaboradores (2005).

Figura 25 - Esquema sintético seguido para tentativa de adição de um grupamento protetor à hidroxila fenólica do ácido 4-hidroxibenzoico.



Fonte: Da autora.

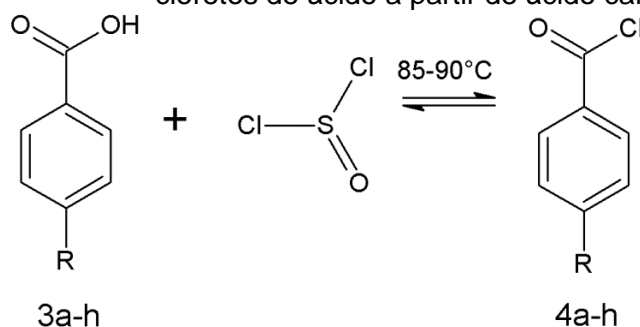
Foi adicionado a um balão de fundo redondo e gargalo longo de 100 mL 0,466 g de imidazol (6,84 mmol), 0,315 g de ácido 4-hidroxibenzoico (2,28 mmol) e 0,732 mL cloreto de triisopropilsilano (TIPSCI, 3,42 mmol). O balão foi mantido dentro de um béquer e a reação foi conduzida em microondas com uma potência de 90 W por 7 minutos, de modo pausado a cada 25 segundos.

A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente hexano e acetato de etila (8:2, v/v). Após completar a reação, o produto obtido foi solubilizado em acetato de etila, descartando-se o óleo de coloração marrom contendo o imidazol. Uma filtração em coluna contendo sílica foi realizada com a solução de acetato de etila, onde o produto se encontrava solubilizado, para a retirada de substâncias polares. Em seguida, o solvente foi retirado em evaporador rotatório e obteve-se um óleo transparente.

5.1.1.3 Síntese dos derivados cloretos de ácido

A síntese dos cloretos de ácido *p*-dissubstituídos, exemplificada na Figura 26, foi realizada conforme método, com adaptações, descrito por Zhang e colaboradores (2010).

Figura 26 - Esquema sintético seguido para obtenção dos cloretos de ácido a partir de ácido carboxílico.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo o ácido benzóico *para*-dissubstituído foi adicionado cloreto de tionila. Deixou-se a mistura reacional sob agitação magnética vigorosa e sob refluxo à uma temperatura de 85 a 90°C, por cerca de 2 horas. A reação foi acompanhada por CCD, solubilizando-se o cloreto de ácido em metanol para a identificação de seu éster, utilizando como eluente hexano e acetato de etila (7:3, v/v). Após 2 horas de reação, o produto foi concentrado em evaporador rotatório. O cloreto de ácido (**4**) obtido foi solubilizado em CH₂Cl₂ anidro e utilizado imediatamente após a rotaevaporação do cloreto de tionila.

Tabela 1 - Reagentes utilizados para a reação de formação do cloreto de ácido.

Material de partida	Cloreto de tionila	Aspecto físico do produto
3a (ácido <i>p</i> -toluilbenzóico; 0,310 g; 2,27 mmol)	1,5 mL (20,68 mmol)	Líquido marrom claro
3b (Ácido <i>p</i> -metoxibenzóico; 0,347 g; 2,27 mmol)	1,5 mL (20,68 mmol)	Líquido marrom claro
3c (Ácido <i>p</i> -trifluorometilbenzóico; 0,433 g; 2,27 mmol)	1,5 mL (20,68 mmol)	Líquido marrom claro
3d (Ácido <i>p</i> -nitrobenzóico; 0,381 g; 2,27 mmol)	1,5 mL (20,68 mmol)	Líquido marrom claro
3e (Ácido <i>p</i> -bromobenzóico; 0,344 g; 1,71 mmol)	1,5 mL (20,68 mmol)	Líquido marrom claro
3f (Ácido <i>p</i> -fluorobenzóico; 0,160 g; 1,14 mmol)	1,0 mL (13,78 mmol)	Líquido marrom claro
3g (Ácido <i>p</i> - <i>tert</i> -butilbenzóico; 0,135 g; 0,76mmol)	1,0 mL (13,78 mmol)	Líquido marrom claro
3h (Ácido <i>p</i> -(Triisopropilsiloxi)benzóico; 0,195 g; 0,66mmol)	1,0 mL (13,78 mmol)	Líquido marrom claro

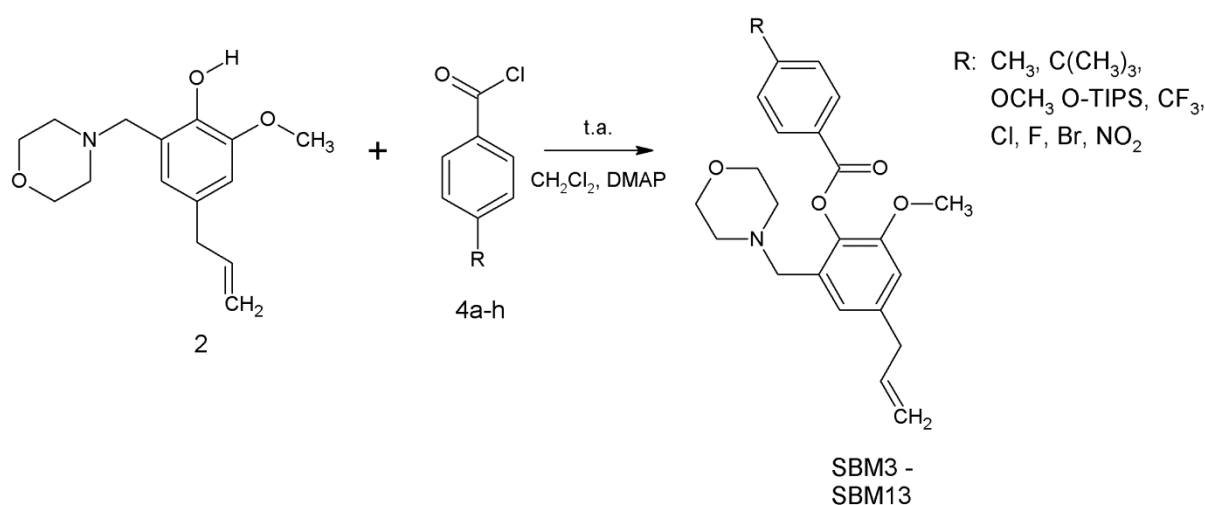
Fonte: Da autora.

5.1.1.4 Síntese de ésteres de base de Mannich do eugenol

A síntese dos ésteres de base de Mannich do eugenol foi realizada por dois métodos distintos. O primeiro método foi realizado de acordo com os procedimentos descritos por Abrão e colaboradores (2015) e Zhang e colaboradores (2010), exemplificada na Figura 27, com adaptações.

Figura 27 - Esquema sintético seguido para obtenção dos ésteres de base de Mannich do eugenol utilizando cloreto ácido.

MÉTODO 1



Fonte: Da autora.

Método 1:

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo base de Mannich de eugenol (**2**) e 20 mL de CH₂Cl₂ anidro foi adicionado 4-dimetilaminopiridina (DMAP), sob agitação magnética vigorosa e banho de gelo. Após 10 minutos de reação, o produto concentrado obtido da síntese do cloreto de ácido (**4**, método descrito em 5.1.1.3) foi solubilizado em CH₂Cl₂ anidro e adicionado à mistura reacional gota a gota, sob agitação magnética vigorosa e banho de gelo. Posteriormente, a reação foi mantida sob agitação magnética vigorosa e à temperatura ambiente por cerca de 24 horas.

A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente hexano e acetato de etila (8:2, v/v). Após o término, a mistura reacional foi extraída com NaOH 0,5 mol.L⁻¹ (5 x 30 mL) e gelo triturado. A fase orgânica foi extraída novamente com água destilada até o pH da fase aquosa atingir o valor aproximado de 7. A fase

orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e foi filtrada em papel de filtro. Em seguida, o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório e o produto foi purificado por CC (acetato de etila/hexano, 2:8, v/v).

Tabela 2 - Quantidades dos reagentes utilizados para a reação de formação dos ésteres de base de Mannich.

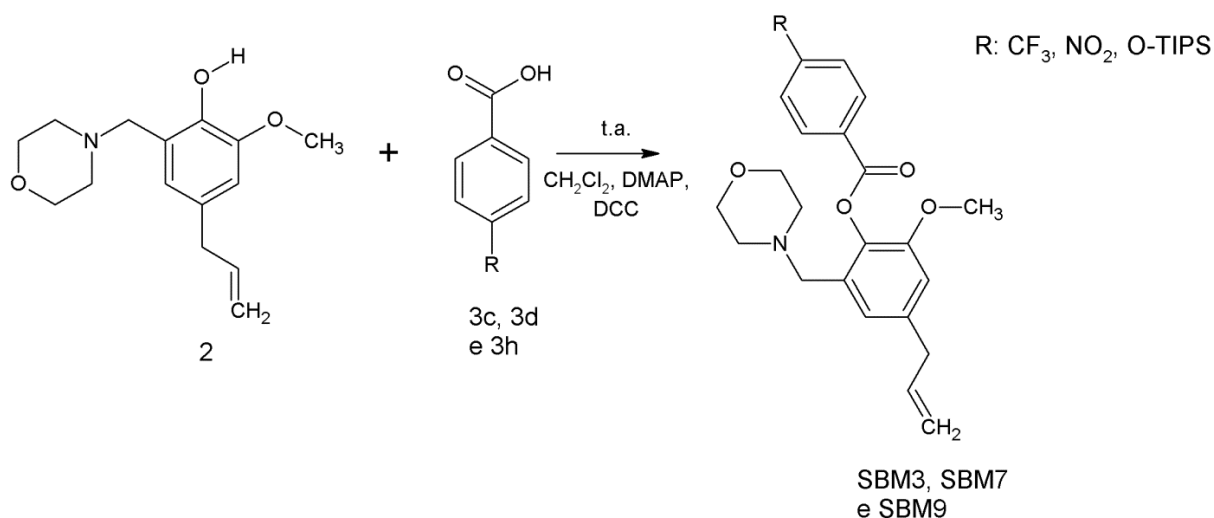
Material de partida (2)	Cloreto de ácido	Proporção base de Mannich/ cloreto ácido	DMAP
0,10 g (0,38 mmol)	4g ([R: <i>terc</i> -butil]; 0,76 mmol)	1:2	0,093 g (0,76 mmol)
0,10 g (0,38 mmol)	4f ([R: F]; 1,14 mmol)	1:3	0,139 g (1,14 mmol)
0,15 g (0,57 mmol)	4e ([R: Br]; 1,71 mmol)	1:3	0,209 g (1,71 mmol)
0,20 g (0,76 mmol)	4a, 4b, 4c, 4d ([R: CH ₃ , OCH ₃ , CF ₃ , NO ₂]; 2,28 mmol)	1:3	0,278 g (2,28 mmol)
0,174 g (0,66 mmol)	4h ([R: OTIPS]; 0,66 mmol)	1:1	0,081 g (0,66 mmol)

Fonte: Da autora.

O segundo método foi realizado para a obtenção de maior massa e para a avaliação do rendimento de reação para três compostos, o éster *p*-trifluorometilbenzoato, o éster *p*-hidroxibenzoato e o éster *p*-nitrobenzoato. O procedimento foi realizado conforme descrito por Westphal e colaboradores (2016) (FIGURA 28).

Figura 28 - Esquema sintético seguido para obtenção dos ésteres de base de Mannich do eugenol utilizando DCC, conforme método descrito por Westphal e colaboradores (2016).

MÉTODO 2



Fonte: Da autora.

Método 2:

Em um balão de fundo redondo de 25 mL contendo base de Mannich de eugenol e 10 mL de CH₂Cl₂ anidro foi adicionado DMAP e ácido benzóico *para*-dissubstituído, sob agitação magnética vigorosa e em ambiente inerte contendo argônio. Após 10 minutos do início da reação, foi adicionado à mistura reacional *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) solubilizado em CH₂Cl₂ anidro. Posteriormente, a reação foi mantida sob agitação magnética vigorosa em ambiente inerte contendo argônio, à temperatura ambiente por cerca de 24 horas.

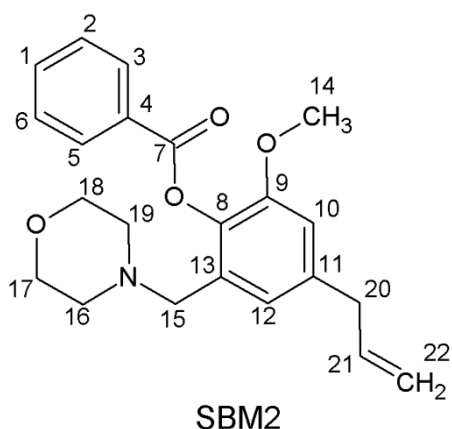
A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente hexano e acetato de etila (7:3, v/v). Após o término, a mistura reacional foi concentrada em evaporador rotatório para a retirada do solvente e foi adicionado um volume mínimo de dioxano gelado. Com o objetivo de se retirar a 1,3-diciclohexil uréia (DCU), um subproduto da reação com DCC, foi feita uma filtração em papel de filtro, já que este composto é insolúvel em dioxano gelado. Em seguida, o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por CC para a retirada do DCU residual (acetato de etila/hexano, 2:8, v/v, contendo 20% de clorofórmio).

Tabela 3 - Quantidades dos reagentes utilizados para a reação de formação dos ésteres de base de Mannich utilizando DCC.

Material de partida (2)	Ácido <i>p</i> -disubstituído	Proporção base de Mannich/ácido	DMAP	DCC
0,20 g (0,76 mmol)	3c ([R: CF ₃]; 0,144 g; 0,76 mmol)	1:1	0,01 g (83,6 μmol)	0,172 g (0,84 mmol)
0,20 g (0,76 mmol)	3d ([R: NO ₂]; 0,127 g; 0,76 mmol)	1:1	0,01 g (83,6 μmol)	0,172 g (0,84 mmol)
0,20 g (0,76 mmol)	3h ([R: OTIPS]; 0,224 g; 0,76 mmol)	1:1	0,01 g (83,6 μmol)	0,172 g (0,84 mmol)

Fonte: Da autora.

5.1.1.4.1 Dados de caracterização do éster benzoato de base de Mannich (**SBM2**)



4-alil-2-metoxi -6(morfolin-4ilmetil)fenil benzoato

Sólido amarelo claro

F.M.: C₂₂H₂₅NO₄ **M.M.:** 367,44 g.mol⁻¹

F.F.: 84-85 °C **Rf (hex./acet., 8:2):** 0,370

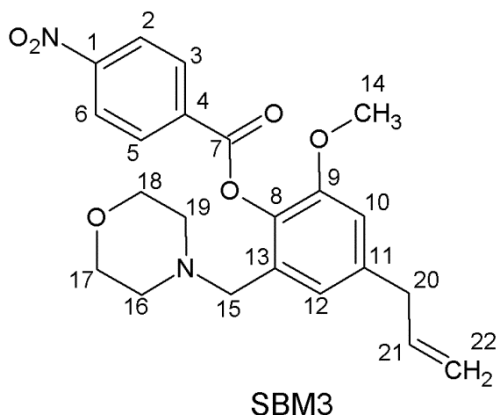
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2972, 2924, 2868 e 2807 (C-H sp³); 1733 (C=O éster); 1599 e 1496 (C=C aromático); 1201 (C-O éster); 1267 e 1060 (C-O éter alquil-arílico); 1113 (C-N alifático); 1026 e 908 (RCH=CH₂).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 8,23-8,20 (dd, 2H, H3 e H5); 7,63-7,60 (m, 1H, H1); 7,53-7,48 (m, 2H, H2 e H6); 6,83-6,78 (m, 2H, H12 e H10); 6,03-5,91 (m, 1H, H21, $J_{\text{H21-H20}}$ = 6,69 Hz, $J_{\text{H21-H22cis}}$ = 10,11 Hz, $J_{\text{H21-H22trans}}$ = 16,91 Hz); 5,15-5,09 (m, 2H, H22); 3,80 (s, 3H, H14); 3,47-3,39 (m, 8H, H17, H18, H20, H15, $J_{\text{H20-H21}}$ = 6,69 Hz); 2,35 (m, 4H, H16 e H19).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz): 40,14 (C20); 53,28 (C19 e C16); 55,99 (C14); 58,32 (C15); 66,54 (C17 e C18), 111,96 (C12); 116,20 (C22); 122,74 (C10); 128,50 (C2 e C6); 129,84 (C4 ou C8); 130,18 (C3 e C5); 133,28 (C1); 137,08 (C21); 137,47 (C9); 138,35 (C11); 151,71 (C13); 164,40 (C7).

EM MALDI-TOF (m/z): calculado para (M - H)⁻: 366,17 ; encontrado: 366,32.

5.1.1.4.2 Dados de caracterização do éster p-nitrobenzoato de base de Mannich (SBM3)



4-aliil-2-metoxi -6(morfolin-4ilmetil)fenil 4-nitrobenzoato

Sólido amarelo claro

Massa obtida pelo método 1: 0,092 g
(0,223 mmol, 29%)

Massa obtida pelo método 2: 0,157 g
(0,381 mmol, 50%)

F.M.: C₂₂H₂₄N₂O₆ **M.M.:** 412,44 g.mol⁻¹

F.F.: 112-118°C Rf (hex./acet., 8:2): 0,217

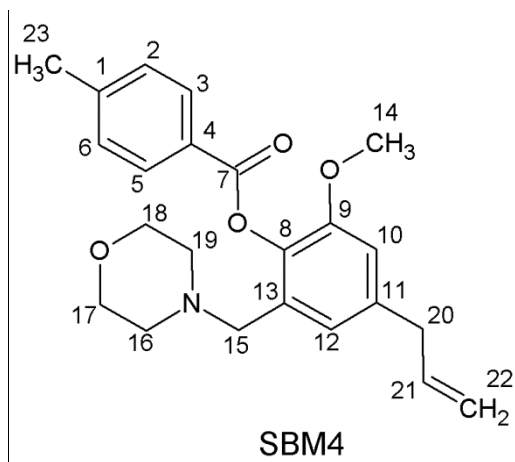
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3077 (C-H sp²); 2971, 2917, 2856 e 2807 (C-H sp³); 1742 (C=O éster); 1598, 1493 e 1454 (C=C aromático); 1524 e 1347 (NO₂); 1454 (CH₂); 1196 (C-O éster); 1263 e 1071 (C-O éter alquil-arílico); 1111 (C-N alifático); 1009 e 898 (RCH=CH₂).

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 300 MHz): 8,41-8,33 (m, 4H, H2, H3, H5 e H6); 6,80 (s, 1H, H10); 6,79 (s, 1H, H12); 6,04-5,91 (m, 1H, H21, $J_{\text{H21-H20}} = 6,72$ Hz, $J_{\text{H21-H22cis}} = 10,26$ Hz, $J_{\text{H21-H22trans}} = 16,76$ Hz); 5,15-5,10 (m, 2H, H22); 3,81 (s, 3H, H14); 3,41-3,39 (m, 8H, H17, H18, H20, H15, $J_{\text{H20-H21}} = 6,69$ Hz); 2,28 (m, 4H, H16 e H19).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 75 MHz): 40,11 (C20); 53,37 (C19 e C16); 55,99 (C14); 58,93 (C15); 66,86 (C17 e C18), 112,00 (C12); 116,36 (C22); 122,88 (C10); 123,67 (C2 e C6); 130,60 (C8); 131,20 (C3 e C5); 135,47 (C9); 136,91 (C4); 137,01 (C21); 138,85 (C11); 150,69 (C1); 151,52 (C13); 162,62 (C7).

EM MALDI-TOF (m/z): calculado para (M + H)⁺: 413,44 ; encontrado: 413,49.

5.1.1.4.3 Dados de caracterização do éster p-toluil de base de Mannich (**SBM4**)



4-aliil-2-metoxi -6(morfolin-4ilmetil)fenil 4-metilbenzoato

Sólido amarelo claro

Massa obtida pelo método 1: 0,270 g

(0,708 mmol, 93%)

F.M.: C₂₃H₂₇NO₄ **M.M.:** 381,47 g.mol⁻¹

F.F.: 70-73°C **Rf (hex./acet., 8:2):** 0,267

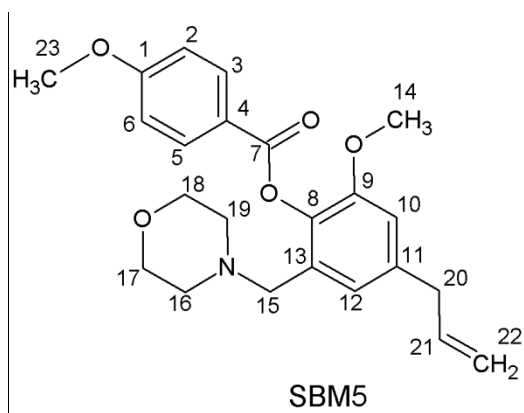
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3001 (CH sp²); 2852 e 2802 (CH sp³); 1738 (C=O éster); 1610 (C=C alifático); 1595, 1490, 1463 (C=C aromático); 1463 (CH₂); 1350 (CH₃); 1261 e 1062 (C-O éter alquil-arílico); 1197 (C-O éster); 1113 (C-N alifático); 1010 e 910 (RCH=CH₂).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 8,12-8,09 (m, 2H, H3 e H5); 7,31-7,29 (m, 2H, H2 e H6); 6,80 (s, 1H, H10); 6,77 (s, 1H, H12); 6,05-5,91 (m, 1H, H21, $J_{\text{H21-H20}} = 6,72$ Hz, $J_{\text{H21-H22cis}} = 10,11$ Hz, $J_{\text{H21-H22trans}} = 16,91$ Hz); 5,15-5,10 (m, 2H, H22); 3,80 (s, 3H, H14); 3,47-3,38 (m, 8H, H17, H18, H20, H15, $J_{\text{H20-H21}} = 6,69$ Hz); 2,45 (s, 3H, H23); 2,32 (m, 4H, H16 e H19).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz): 21,74 (C23); 40,15 (C20); 53,37 (C19 e C16); 55,99 (C14); 58,37 (C15); 66,71 (C17 e C18), 111,82 (C12); 116,13 (C22); 122,49 (C10); 127,11 (C4); 129,20 (C2 e C6); 130,23 (C3 e C5); 130,87 (C8); 137,16 (C21); 137,49 (C9); 138,17 (C11); 143,98 (C1); 151,74 (C13); 164,47 (C7).

EM MALDI-TOF (m/z): calculado para (M + H)⁺: 382,20 ; encontrado: 382,48.

5.1.1.4.4 Dados de caracterização do éster p-metoxibenzoato de base de Mannich (SBM5)



4-álil-2-metoxi -6(morfolin-4ilmetil)fenil 4-metoxibenzoato

Sólido branco

Massa obtida pelo método 1: 0,272 g
(0,685 mmol, 90%)

F.M.: C₂₃H₂₇NO₅ **M.M.:** 397,46 g.mol⁻¹

F.F.: 86-89°C Rf (hex./acet., 8:2): 0,167

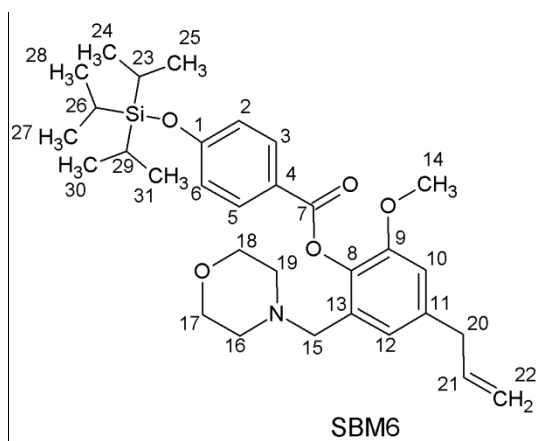
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3000 (CH sp²); 2957 e 2837 (CH alifático); 1723 (C=O éster); 1601, 1508 e 1489 (C=C aromático); 1462 (CH₂); 1253 e 1068 (C-O éter alquil-arílico); 1160 (C-O éster); 1115 (C-N alifático); 1007 e 915 (RCH=CH₂).

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 300 MHz): 8,19-8,15 (m, 2H, H3 e H5); 6,99-6,96 (m, 2H, H2 e H6); 6,80 (s, 1H, H10); 6,76 (s, 1H, H12); 6,05-5,91 (m, 1H, H21, $J_{\text{H21-H20}} = 6,69$ Hz, $J_{\text{H21-H22cis}} = 10,11$ Hz, $J_{\text{H21-H22trans}} = 13,91$ Hz); 5,15-5,08 (m, 2H, H22); 3,89 (s, 3H, H23); 3,80 (s, 3H, H14); 3,47-3,38 (m, 8H, H17, H18, H20, H15, $J_{\text{H20-H21}} = 6,69$ Hz); 2,32 (m, 4H, H16 e H19).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 75 MHz): 40,15 (C20); 53,40 (C19 e C16); 55,49 (C23); 55,99 (C14); 58,38 (C15); 66,75 (C17 e C18), 111,78 (C12); 113,74 (C2 e C6); 116,11 (C22); 122,25 (C4); 122,45 (C10); 130,99 (C8); 132,26 (C3 e C5); 137,18 (C21); 137,50 (C9); 138,11 (C11); 151,79 (C13); 163,63 (C7); 164,14 (C1).

EM MALDI-TOF (m/z): calculado para (M + H)⁺: 398,20; encontrado: 398,57.

5.1.1.4.5 Dados de caracterização do éster p-(Triisopropilsiloxi)benzoato de base de Mannich



4-alil-2-metoxi -6(morfolin-4ilmetil)fenil 4-(Triisopropilsiloxi)benzoato

Óleo marrom

Massa obtida pelo método 1: 0,046 g

(85,34 μ mol, 11%)*

Massa obtida pelo método 2: 0,278 g

(0,52 mmol, 68%)**

F.M.: C₃₁H₄₅NO₅Si **M.M.:** 539 g.mol⁻¹

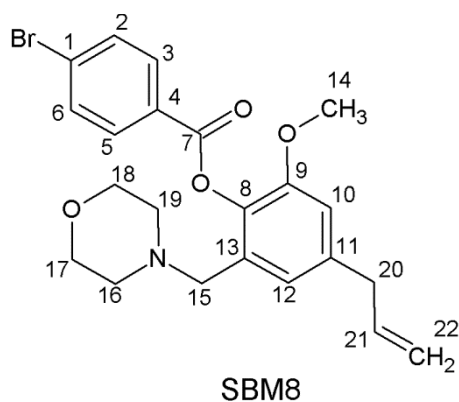
RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 8,04-7,96 (m, 2H, H3 e H5); 7,07-6,79 (m, 4H, H2, H6, H12 e H10); 5,95-5,86 (m, 1H, H21); 5,15-5,06 (m, 2H, H22); 3,90 (s, 3H, H14); 3,51-3,32 (m, 4H, H17, H18); 1,31-1,23 (m, 10H, H15, H16, H19 e H20); 1,13 (m, 19H, H24, H25, H27, H28, H30 e H31); 1,03 (m, 3H, H23, H26 e H29)

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz): 12,67 (C23, C26 e C29); 17,84 (C24, C25, C27, C28, C30 e C31); 39,58 (C20); 56,18 (C14); 60,96 (C19 e C16); 63,74 (C15); 67,46 (C17 e C18), 111,97 (C4); 113,58 (C12); 116,38 (C22); 119,74 (C2 e C6); 120,18 (C10); 122,07 (C8); 132,23 (C3 e C5); 132,54 (C21); 132,72 (C9); 136,93 (C11); 144,08 (C13); 161,11 (C7); 170,59 (C1).

* A desproteção não foi realizada posteriormente no produto obtido pelo método 1 devido ao baixo rendimento reacional.

** Verificou-se a presença de um cheiro característico similar ao do reagente TIPSCI no produto obtido após CC (método 2), que pode indicar a presença de impureza proveniente deste reagente.

5.1.1.4.6 Dados de caracterização do éster p-bromobenzoato de base de Mannich (SBM8)



4-ailil-2-metoxi -6(morfolin-4ilmetil)fenil 4-bromobenzoato

Sólido amarelo claro alaranjado

Massa obtida pelo método 1: 0,194 g

(0,435 (0,435 mmol, 76%)

F.M.: C₂₂H₂₄NO₄Br **M.M.:** 446,33 g.mol⁻¹

F.F.: 85-111°C **Rf (hex./acet., 8:2):** 0,300

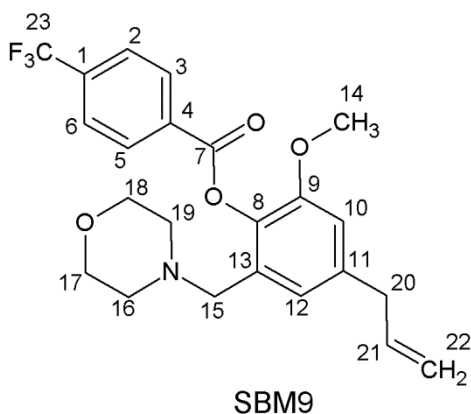
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3072 (CH sp²); 2953, 2853 e 2803 (CH alifático); 1737 (C=O éster); 1589 e 1492 (C=C aromático); 1452 (CH₂); 1396 (CH₃); 1262 e 1072 (C-O éter alquil-arílico); 1144 (C-O éster); 1113 (C-N alifático); 1009 e 909 (RCH=CH₂); 747 (C-Br).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 8,09-8,06 (m, 2H, H3 e H5); 7,67-7,64 (m, 2H, H2 e H6); 6,78 (s, 2H, H10 e H12); 6,04-5,92 (m, 1H, H21, $J_{\text{H21-H20}} = 6,72$ Hz, $J_{\text{H21-H22cis}} = 10,14$ Hz, $J_{\text{H21-H22trans}} = 16,88$ Hz); 5,15-5,09 (m, 2H, H22); 3,80 (s, 3H, H14); 3,40-3,38 (m, 8H, H17, H18, H20, H15, $J_{\text{H20-H21}} = 6,72$ Hz); 2,29 (m, 4H, H16 e H19).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz): 40,14 (C20); 53,40 (C19 e C16); 55,99 (C14); 58,70 (C15); 66,71 (C17 e C18), 111,87 (C12); 116,23 (C22); 122,55 (C10); 128,38 (C1); 128,89 (C4); 130,86 (C8); 131,66 (C2 e C6); 131,86 (C3 e C5); 137,06 (C21); 137,24 (C9); 138,45 (C11); 151,65 (C13); 163,90 (C7).

EM MALDI-TOF (m/z): calculado para [M+H]⁺: 446,10 ; encontrado: 446,33.

5.1.1.4.7 Dados de caracterização do éster p-trifluorometilbenzoato de base de Mannich (**SBM9**)



4-allyl-2-metoxi -6(morfolin-4ilmetil)fenil 4-(trifluorometil)benzoato

Sólido branco

Massa obtida pelo método 1: 0,272 g
(0,625 mmol, 82%)

Massa obtida pelo método 2: 0,231 g
(0,531 mmol, 70%)

F.M.: C₂₃H₂₄NO₄F₃ **M.M.:** 435,44 g.mol⁻¹

F.F.: 82-87°C **Rf (hex./acet., 8:2):** 0,367

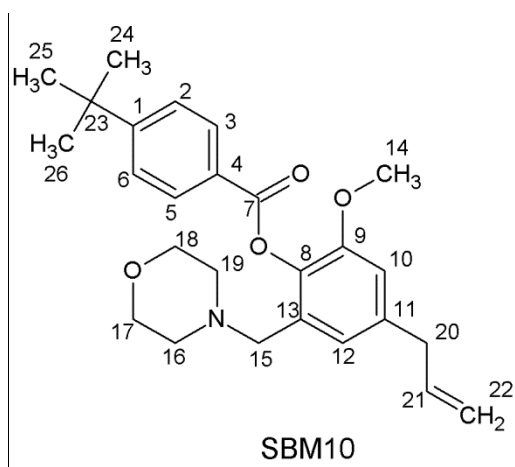
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3078 (CH sp²); 2969 e 2855 (CH alifático); 1743 (C=O éster); 1598 e 1491 (C=C aromático); 1456 (CH₂); 1351 (CH₃); 1263 e 1063 (C-O éter alquil-arílico); 1166 (C-O éster); 1115 (C-N alifático); 1015 e 911 (RCH=CH₂).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 8,35-8,32 (d, 2H, H3 e H5, $J = 8,07$ Hz); 7,79-7,76 (d, 2H, H2 e H6, $J = 8,16$ Hz); 6,79 (s, 2H, H12 e H10); 6,05-5,91 (m, 1H, H21, $J_{\text{H21-H20}} = 6,72$ Hz, $J_{\text{H21-H22cis}} = 10,17$ Hz, $J_{\text{H21-H22trans}} = 16,85$ Hz); 5,16-5,10 (m, 2H, H22); 3,81 (s, 3H, H14); 3,41-3,39 (m, 8H, H17, H18, H20, H15); 2,29 (m, 4H, H16 e H19).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz): 40,13 (C20); 53,40 (C19 e C16); 55,97 (C14); 58,78 (C15); 66,66 (C17 e C18), 111,91 (C12); 116,26 (C22); 121,83 (C4); 122,59 (C10); 125,56 (C2 e C6); 127,02; 130,77, 134,91 e 138,62 (C23, $J = 290,07$ Hz); 130,52 (C3 e C5); 133,26 (C8); 134,48 (C9); 137,00 (C21); 137,15 (C11); 151,59 (C13); 163,25 (C7).

EM MALDI-TOF (m/z): calculado para (M + H)⁺: 436,17 ; encontrado: 436,43.

5.1.1.4.8 Dados de caracterização do éster p-tercutilbenzoato de base de Mannich (SBM10)



4-álil-2-metoxi -6(morfolin-4ilmetil)fenil 4-
tercutilbenzoato

Sólido branco

Massa obtida pelo método 1: 0,085 g
(0,201 mmol, 53%)

F.M.: C₂₆H₃₃NO₄ **M.M.:** 423,55 g.mol⁻¹

F.F.: 79-85°C **Rf (hex./acet., 8:2):** 0,333

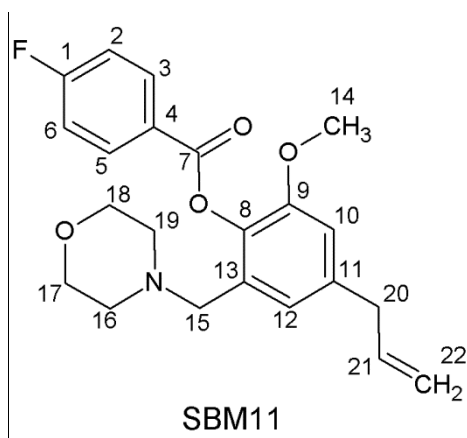
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2959, 2865 e 2804 (CH alifático); 1736 (C=O éster); 1608 e 1489 (C=C aromático); 1454 (CH₂); 1351 (CH₃); 1265 e 1065 (C-O éter alquil-arílico); 1183 (C-O éster); 1110 (C-N alifático); 1012 e 910 (RCH=CH₂).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 8,15-8,13 (d, 2H, H3 e H5, $J = 7,14$ Hz); 7,53-7,50 (m, 2H, H2 e H6, $J = 7,02$ Hz); 6,82 (s, 1H, H10); 6,76 (s, 1H, H12); 6,02-5,94 (m, 1H, H21); 5,15-5,08 (m, 2H, H22); 3,79 (s, 3H, H14); 3,47-3,39 (m, 8H, H17, H18, H20, H15); 2,33 (m, 4H, H16 e H19); 1,37 (s, 9H, H24, H25 e H26).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz): 31,15 (C24, C25 e C26); 35,18 (C23); 40,16 (C20); 53,41 (C19 e C16); 55,98 (C14); 58,21 (C15); 66,71 (C17 e C18), 111,77 (C12); 116,11 (C22); 122,42 (C10); 125,47 (C2 e C6); 127,02 (C4); 130,09 (C3 e C5); 130,93 (C8); 137,18 (C21); 137,47 (C9); 138,17 (C11); 151,71 (C13); 157,01 (C1); 164,41 (C7).

EM MALDI-TOF (m/z): calculado para (M + H)⁺: 424,25; encontrado: 424,55.

5.1.1.4.9 Dados de caracterização do éster *p*-fluorobenzoato de base de Mannich (**SBM11**)



4-aliil-2-metoxi -6(morfolin-4ilmetil)fenil 4-fluorobenzoato

Sólido branco amarelado

Massa obtida pelo método 1: 0,117 g

(0,304 mmol, 80%)

F.M.: C₂₂H₂₄NO₄F **M.M.:** 385,43 g.mol⁻¹

F.F.: 95-98°C **Rf (hex./acet., 8:2):** 0,233

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2955, 2921, 2850 e 2812 (CH alifático); 1738 (C=O éster); 1596 e 1505 (C=C aromático); 1263 e 1068 (C-O éter alquil-arílico); 1197 (C-O éster); 1110 (C-N alifático); 1010 (RCH=CH₂).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 8,26-8,21 (m, 2H, H3 e H5); 7,26-7,15 (m, 2H, H2 e H6); 6,79 (s, 1H, H10); 6,78 (s, 1H, H12); 6,05-5,92 (m, 1H, H21, $J_{\text{H21-H20}} = 6,75$ Hz, $J_{\text{H21-H22cis}} = 10,11$ Hz, $J_{\text{H21-H22trans}} = 16,88$ Hz); 5,16-5,09 (m, 2H, H22); 3,80 (s, 3H, H14); 3,44-3,38 (m, 8H, H17, H18, H20, H15, $J_{\text{H20-H21}} = 6,72$ Hz); 2,30 (m, 4H, H16 e H19).

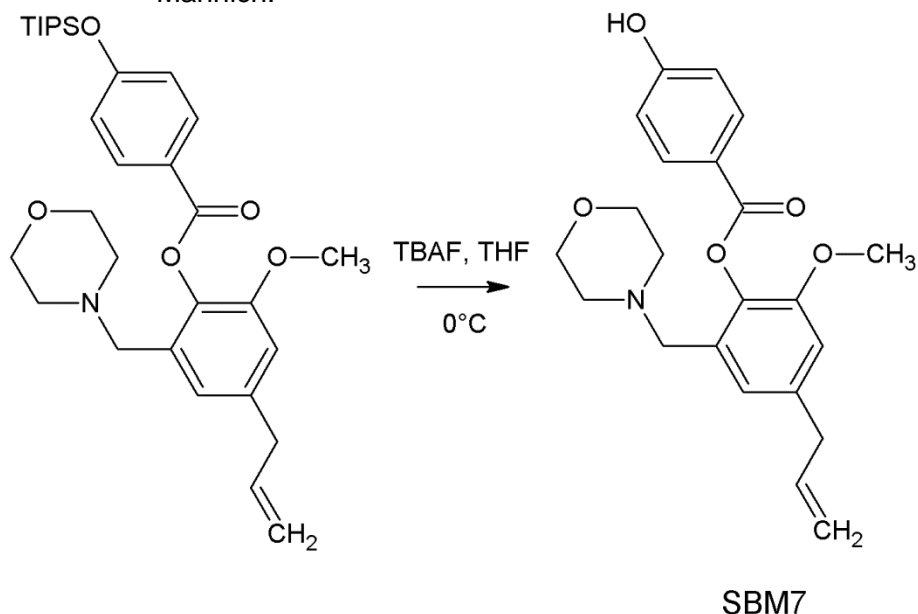
RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz): 40,1 (C20); 53,4 (C19 e C16); 56,0 (C14); 58,6 (C15); 66,7 (C17 e C18), 111,9 (C12); 115,5 e 115,8 (C2, C6, $J = 22,5$ Hz); 116,2 (C22); 122,5 (C10); 126,2 (C4); 130,86 (C8); 132,7 (C3, C5); 137,1 (C21); 137,3 (C9); 138,6 (C11); 151,7 (C13); 163,5 e 167,6 (C1, $J = 307,5$ Hz); 164,3 (C7).

EM MALDI-TOF (m/z): calculado para (M + H)⁺: 386,18; encontrado: 386,44.

5.1.1.5 Síntese do composto éster *p*-hidroxibenzoato de base de Mannich do eugenol (**SBM7**).

A síntese do composto **SBM7** foi realizada pela reação de desproteção do grupamento OTIPS, exemplificada na Figura 29, segundo o procedimento relatado por Crouch (2013), utilizando como material de partida o éster *p*-(Triisopropilsiloxi)benzoato de base de Mannich, produto da reação de esterificação descrita no método 2, tópico 5.1.1.4.

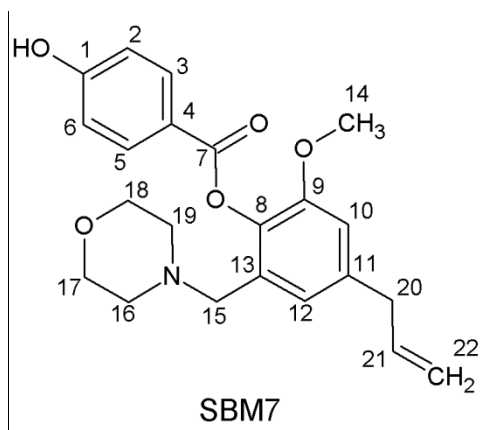
Figura 29 - Esquema sintético de desproteção da hidroxila fenólica do éster *p*-(Triisopropilsiloxi)benzoato de base de Mannich.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 25 mL contendo 19 mL de THF e 0,278 g de éster *p*-(triisopropilsiloxi)benzoato de base de Mannich (0,52 mmol), mantidos sob agitação e banho de gelo, foi adicionado 0,773 mL de fluoreto de tetrabutilamônio (TBAF) a 1M (0,77 mmol). A reação foi mantida por 30 minutos em banho de gelo e sob agitação e posteriormente foi adicionado solução saturada NH_4Cl atingindo um pH neutro. A mistura reacional foi extraída em meio líquido/líquido em um funil de separação com acetato de etila (4 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e foi filtrada em papel de filtro. Em seguida, o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por placa preparativa (acetato de etila/hexano, 2:8, v/v).

5.1.1.5.1 Dados de caracterização do éster *p*-hidroxibenzoato de base de Mannich (SBM7)



4-álil-2-metoxi -6(morfolin-4ilmetil)fenil 4-hidroxibenzoato

Óleo transparente

Massa obtida: 0,020 g (52,16 μmol , 10%)*

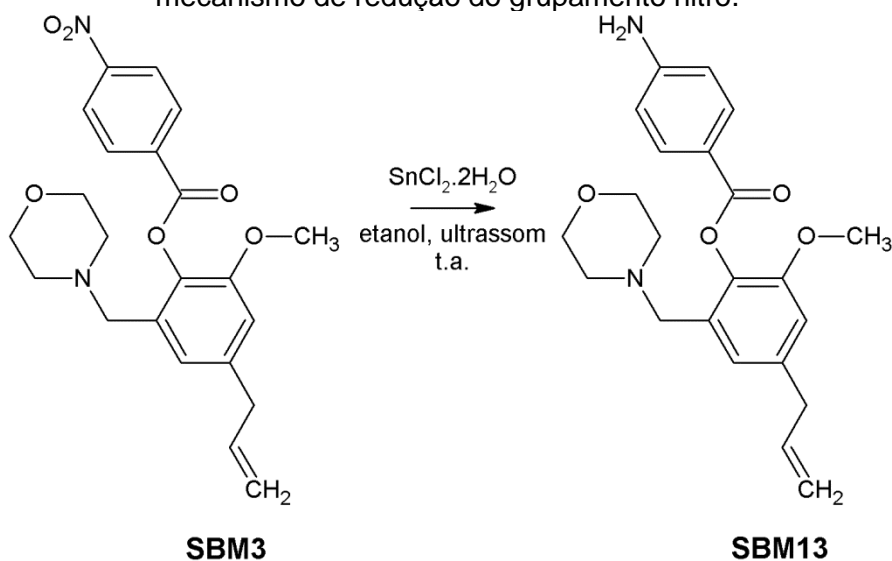
F.M.: $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_5$ **M.M.:** 383,44 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

* Não foram realizadas análises de RMN, IV e teste biológico devido ao baixo rendimento.

5.1.1.6 Síntese do composto éster *p*-aminobenzoato de base de Mannich do eugenol (SBM13).

A reação de redução de grupamento nitro à amina para síntese do éster *p*-aminobenzoato de base de Mannich do eugenol foi realizada conforme os métodos descritos por Gamble e colaboradores (2007) e Bellamy e Ou (1984), com adaptação (FIGURA 30).

Figura 30 - Esquema sintético seguido para obtenção do ésteres *p*-aminobenzoato de base de Mannich do eugenol por mecanismo de redução do grupamento nitro.

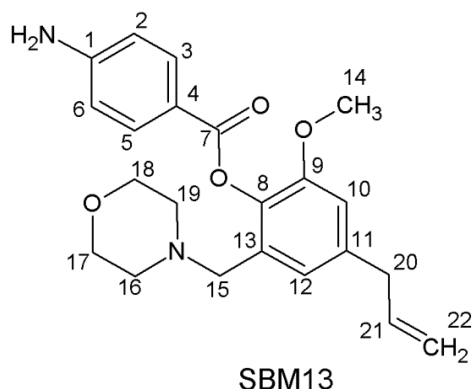


Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 25 mL contendo 0,223 g do composto **SBM3** (0,54 mmol) foi adicionado 5 mL de etanol absoluto e 1,22 g de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5,41 mmol). A reação foi conduzida em banho de ultrassom sob agitação periódica, à temperatura ambiente e em ambiente inerte contendo argônio, por 16 minutos.

A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente hexano e acetato de etila (6:4, v/v). Após completar a reação, o meio foi neutralizado até aproximadamente pH 7 com solução saturada de bicarbonato de sódio e gelo picado e foi realizado uma extração líquido/líquido em um funil de separação com acetato de etila (4 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e foi filtrada em papel de filtro. Em seguida, o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por CC (acetato de etila/hexano, 3:7, v/v).

5.1.1.6.1 Dados de caracterização do éster p-aminobenzoato de base de Mannich (**SBM13**)



4-álil-2-metoxi -6(morfolin-4ilmetil)fenil 4-aminobenzoato

Óleo amarelo

Massa obtida: 0,102 g (0,27 mmol, 49%)

F.M.: $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$ **M.M.:** $382,45 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Rf (hex./acet., 6:4): 0,273

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}$, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3465 e 3362 (N-H amina primária); 3227 (harmônica de $\sim 1610 \text{ cm}^{-1}$); 2958 e 2806 (CH alifático); 1712 (C=O éster); 1625 (N-H amina primária); 1598, 1517 e 1489 (C=C aromático); 1454 (CH_2); 1351 (CH_3); 1264 e 1065 (C-O éter alquil-arílico); 1167 (C-O éster); 1111 (C-N alifático); 1008 e 908 ($\text{RCH}=\text{CH}_2$).

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 8,02-7,99 (m, 2H, H3 e H5); 6,81 (s, 1H, H10); 6,75 (s, 1H, H12); 6,69-6,67 (m, 2H, H2 e H6); 6,04-5,92 (m, 1H, H21, $J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6,72 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}21-\text{H}22\text{cis}} = 10,11 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}21-\text{H}22\text{trans}} = 16,94 \text{ Hz}$); 5,14-5,08 (m, 2H, H22); 4,14 (sl, 2H, NH_2); 3,79 (s, 3H, H14); 3,51 (m, 6H, H15, H17 e H18); 3,39-3,37 (d, 2H, H20, $J = 6,69 \text{ Hz}$); 2,35 (m, 4H, H16 e H19).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 40,16 (C20); 53,37 (C19 e C16); 56,0 (C14); 58,1 (C15); 66,75 (C17 e C18), 111,75 (C12); 113,84 (C2 e C6); 116,08 (C22); 119,07 (C4); 122,41 (C10); 130,93 (C8); 132,32 (C3 e C5); 137,23 (C21); 137,62 (C9); 137,96 (C11); 151,24 (C13); 151,83 (C1); 164,44 (C7).

EM MALDI-TOF (m/z): calculado para $(M + H)^+$: 383,20; encontrado: 383,49.

5.2 ETAPA DE AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA *IN VITRO*.

A avaliação da atividade antiparasitária *in vitro* foi realizada pelo estudo da atividade antipromastigota e o estudo da atividade inibitória sobre a enzima rCPB2.8 de *Leishmania mexicana*, que estão detalhados a seguir.

5.2.1 Avaliação da atividade antipromastigota

O estudo da atividade antipromastigota dos ésteres de base de Mannich foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial de atividade leishmanicida desta série de moléculas e comparar os resultados de atividade biológica com os ensaios *in silico*.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da UNIFAL-MG pelo professor Dr. Marcos José Marques (UNIFAL-MG). Para as leituras dos resultados foi utilizado espectrofotômetro (Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550).

Para a realização do ensaio *in vitro* as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas em meio Schneider's suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa a 25°C. Os compostos a serem testados foram dissolvidos em DMSO (10 mg.mL⁻¹) e em seguida foram distribuídos em placa de cultura celular de 96 poços em meio de cultura LIT (Liver Infusion Triptose) (faixa de concentração: 100 µg/mL a 0,78 µg/mL – diluição seriada de 1:2) em duplicata; em seguida foram adicionadas as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (1x10⁶/poço), utilizando o fármaco padrão anfotericina B como controle positivo, na faixa de concentração de 10 µg.mL⁻¹ a 0,125 µg.mL⁻¹. Após 72 horas de incubação a 25°C em estufa BOD, as placas foram centrifugadas a 3000 rpm, 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram efetuadas três lavagens com 200 µL de PBS para garantir a retirada dos compostos dos poços, procedendo com o teste de viabilidade

celular. Para isto, foi adicionado 20 µL/poço de uma solução estéril contendo MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) ($5,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) nos poços contendo as formas promastigotas, sendo incubadas por 4h a 25°C. Após este período foi adicionado 100 µL de solução de DMSO para solubilizar membranas biológicas. Após 10 minutos de incubação, as placas foram lidas no comprimento de onda de 550 nm. Então, foi montado uma tabela a partir dos gráficos contendo curvas do tipo dose-resposta com o uso do programa GraphPad Prism 5.0, e a IC_{50} foi estimada.

5.2.2 Avaliação da atividade inibitória sobre a enzima rCPB2.8

O estudo da atividade inibitória sobre a enzima rCPB2.8 de *Leishmania mexicana* dos ésteres de base de Mannich foi realizado no Laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Macromoléculas da Univeridade de Mogi das Cruzes pelo professor Dr. Wagner Alves de Souza Júdice (UMC). Para as leituras dos resultados foi utilizado o espectrofluorímetro Hitachi F2700.

Foi utilizado nos ensaios tampão acetato de sódio 100mM pH 5,5 contendo 5 mM de EDTA, 100 mM NaCl, 20% de glicerol, 0,01% tritom-x100.

O procedimento foi realizado em cubeta de cristal de quartzo onde adicionou-se 1 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, 3 mM DTT e enzima, deixado para pré-ativação por 10 minutos. Posteriormente adicionou-se o substrato fluorogênico Z-FR-MCA ($7,4 \text{ }\mu\text{M}$). A leitura da atividade enzimática foi acompanhada pela hidrólise do substrato nos comprimentos de onda de excitação de 360 nm e de emissão de 480 nm em espectrofluorímetro estando a solução reacional em agitação constante e temperatura estabilizada em 37°C por banho termostatizado. Os valores da atividade enzimática foram obtidos em UAF/min (unidades arbitrárias de fluorescência por minuto) calculadas por regressão linear.

Os ensaios foram repetidos na presença de duas concentrações diferentes ($10 \text{ }\mu\text{M}$ e $100 \text{ }\mu\text{M}$) de cada composto de forma individual obtendo-se os valores de atividade em UAF/min para cada uma das concentrações. Foi assumido como 100% de atividade os valores obtidos na ausência do composto e os valores de atividade na presença dos compostos foram calculados proporcionalmente ao controle.

Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico de barras (% de atividade em função do composto) utilizando o programa Gravit 5.0.13 (Erithacus Ltda).

5.2.3 Avaliação da citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da UNIFAL-MG pelo professor Dr. Marcos José Marques (UNIFAL-MG).

Para avaliação da citotoxicidade e da viabilidade de células, foram utilizados macrófagos coletados da cavidade peritoneal de camundongos Swiss por meio da lavagem peritoneal com PBS estéril. Os compostos a serem testados foram diluídos em DMSO e foram adicionados em diluição serial em placas de cultura de 96 poços contendo meio RPMI-1640 suplementados com 10% SFB (em duplicata) na faixa de concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $0,781 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em seguida foram adicionados os macrófagos na proporção de 5×10^5 /poço. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em estufa a 5% de CO_2 e foi determinada a viabilidade celular por meio de ensaio colorimétrico de MTT, como descrito anteriormente. Como controle positivo do ensaio foi utilizado o fármaco anfotericina B. A determinação da concentração citotóxica a 50% dos macrófagos (CC_{50}) foi calculada pela densidade óptica obtida (PEREIRA, 2010).

Foi determinado também os valores de fator de segurança (FS) pela razão entre a concentração citotóxica para 50% dos macrófagos (CC_{50}) e a concentração capaz de inibir 50% do crescimento de promastigotas (CI_{50} -PRO).

5.3 ESTUDOS COMPUTACIONAIS POR MODELAGEM MOLECULAR

Os estudos computacionais da série de derivados do eugenol foram realizados no Laboratório de Modelagem Molecular e Simulação Computacional – MolMod-CS, instalado na Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. Foram utilizados computadores com o processador AMD Phenom™ X3 8650, 4.00 Gb de memória RAM e placa de vídeo nVidia GeForce™ 9500 GT, 512MB RAM e sistema operacional openSUSE Tumbleweed. O software de modelagem molecular utilizado é o pacote Schrödinger com a interface gráfica Maestro 10.2.010 (SCHRÖDINGER, 2015a). Para a construção do ligante foi utilizado a programa *LigPrep*

(SCHRÖDINGER, 2015c). Para a realização do ancoramento das moléculas na biomacromolécula foi utilizado o programa Induced Fit *Docking* (IFD), que realiza a predição da estrutura da proteína e o refinamento das moléculas da série pelo programa *Prime*, e realiza o ancoramento e fornece o escore das moléculas pelo programa *Glide*, relacionando a interação ligante-receptor (SCHRÖDINGER, 2015b).

5.3.1 Desenho e preparo dos ligantes e avaliação do perfil de biodisponibilidade

As propriedades físico-químicas da série de moléculas proposta foram avaliadas utilizando-se o programa QuikProp – Schrödinger para determinar seus perfis de lipofilicidade, biodisponibilidade, avaliação do potencial de serem absorvidas pelo organismo humano e violações da regra de Lipinski, partindo-se dos seguintes critérios: peso molecular inferior a 500; lipofilicidade das substâncias, expressa como $\log P$ (coeficiente de partição água/octanol), inferior a 5; número de grupos na molécula que podem doar átomos de hidrogénio para interações de hidrogênio inferior a 5 e número de grupos que podem aceitar átomos de hidrogênio para formar interações de hidrogênio inferior a 10 (LIPINSKI, 2004).

Os derivados foram construídos utilizando a interface gráfica da plataforma Maestro (Schrödinger) e foram preparadas no programa *LigPrep*, presente na plataforma Schrödinger, para a otimização da geometria destas moléculas, utilizando o campo de força OPLS_3 e estado de ionização para pH igual a $7,0 \pm 2,0$ (usando Epik).

5.3.2 Preparo das proteínas

A estrutura tridimensional da proteína CRK3 da *Leishmania* sp. utilizada para realizar o ancoramento molecular foi prevista pela técnica de modelagem molecular por homologia pelo nosso grupo de pesquisa da UNIFAL-MG, devido à ausência de uma estrutura cristalográfica desta proteína em banco de dados, utilizando como modelo a estrutura cristalina que se encontra no banco de dados do *Protein Data Bank* (PDB) com o código PDB 2R3I (PEREIRA et al., 2013). A estrutura tridimensional da proteína rCPB2.8 de *Leishmania mexicana* utilizada para realizar o ancoramento foi prevista pela técnica de modelagem molecular por homologia com

múltiplos modelos (múltiplos *templates*). As estruturas cristalográficas das proteínas arginase (código PDB: 4IU0), tripanotona sintetase (código PDB: 2VPS) e CDC2 humana (código PDB: 2R3I) foram obtidas no PDB.

Estas estruturas proteicas a serem utilizadas no estudo de ancoramento foram submetidas à preparação pelo programa *Protein Preparation Wizard* com adição de hidrogênios, atribuição de cargas parciais utilizando o campo de força OPLS-3 e atribuição dos estados de protonação a pH 7 dos resíduos, estimados utilizando cálculos de pKa do módulo PROPKA (SCHRÖDINGER, 2015d). Todos as águas e heteroátomos foram removidos. Em seguida, a minimização foi realizada utilizando o campo de força OPLS-3 no módulo Macromodel em Schrödinger.

5.3.2.1 Modelagem Molecular por Homologia, validação e dinâmica molecular da enzima rCPB2.8

As etapas para a realização do estudo de modelagem molecular por homologia da enzima rCPB2.8 são descritas a seguir.

5.3.2.1.1 Modelagem Molecular por Homologia da enzima rCPB2.8

A sequência primária de aminoácidos da proteína rCPB2.8 de *Leishmania mexicana* foi obtida no banco de dados UniProt com código P36400, possuindo 443 aminoácidos. Utilizou-se para a construção do modelo tridimensional a região de sequência de aminoácidos entre os resíduos 122 a 337, por corresponder à sequência de aminoácidos que compõe a forma ativa e mais estável da enzima em seu local de ação, removendo-se as regiões C-terminais e N-terminais que não são essenciais em sua atividade (MOTTRAM et al., 1997).

A construção de um modelo tridimensional por homologia estrutural para a proteína rCPB2.8 iniciou-se com a busca de proteínas homólogas com um grau de identidade sequencial, obtido pelo alinhamento local de estruturas conhecidas tridimensionalmente, com o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al. 1990). Foram selecionados 2 estruturas cristalográficas (Código PDB: 3IUT e 2P7U) presente no banco de dados PDB, que possuíam boa resolução e distribuição dos resíduos no gráfico de Ramachandran. O alinhamento global de múltiplas sequências entre a sequência alvo e os modelos, ilustrado na Figura 31, foi realizado pelo programa

atômico tridimensional (BOWIE; LUTHY; EISENBERG, 1991). No Prosa-web, as pontuações de qualidade de uma proteína são exibidas comparando-se todas as estruturas proteicas conhecidas com o modelo analisado, e partes problemáticas encontradas em uma estrutura são destacadas em gráficos (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Para se verificar a concordância entre a complementaridade da sequência alvo e da sequência do modelo e a conservação da estrutura terciária dessas proteínas homólogas foi realizado o cálculo da raiz do desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD) entre o modelo de código PDB 3IUT e a proteína obtida por modelagem molecular por homologia.

Foi realizado a otimização com a preparação e minimização da estrutura tridimensional utilizando o campo de força OPLS3, com aplicação do software MacroModel, da plataforma Schrödinger.

5.3.2.1.3 Dinâmica molecular como método de relaxação da proteína obtida por modelagem por homologia

A simulação de dinâmica molecular (DM) foi realizada com o objetivo de se obter uma estrutura tridimensional proteica de maior estabilidade e em estado relaxado. Para tanto, simulou-se o comportamento dinâmico microscópico dos átomos que compõe um sistema no qual a enzima se encontra em solução aquosa de força iônica similar ao meio fisiológico, com temperatura e pressão controlada (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). O programa utilizado para realizar as análises foi o GROMACS 4.6.1 com o campo de força AMBER99SB (HESS et al., 2008; HORNAK et al., 2006; VAN DER SPOEL et al., 2005).

A simulação por DM da enzima rCPB2.8, obtida por modelagem por homologia, iniciou-se com a predição de seu estado de protonação em pH 7 utilizando o servidor online H++ (ANANDAKRISHNAN; AGUILAR; ONUFRIEV, 2012). A partir dos arquivos de saída em formato cdr e top do servidor online H++ foi gerado o arquivo pdb compatível com o programa GROMACS por meio do programa AmberTools (CASE, 2017). A enzima foi centralizada dentro de uma caixa periódica cúbica e solvatada com 20.892 moléculas de água do tipo TIP3P (potencial intermolecular transferível com 3 pontos), com condições periódicas de contorno. A seguir, a carga total do meio foi neutralizada com íons sódio e cloro em força iônica de 0,15 molar.

Foi realizado então a minimização de energia total do sistema, com etapas sucessivas usando o algoritmo “*steepest descent position restrained*” e critério de convergência de 1000 kJ.mol^{-1} . Posteriormente, a simulação constituiu-se da termalização e equilibração, buscando-se atingir um equilíbrio térmico em função da velocidade dos átomos e a distribuição do solvente de forma a minimizar a energia do sistema, com restrição de posição para todos os componentes do sistema, exceto para as moléculas de água (JIN et al., 2013). Na primeira equilibração do sistema manteve-se constantes o número de partículas, o volume e a temperatura (conjunto canônico ou ensemble NVT). Na segunda equilibração, o sistema foi considerado isotérmico-isobárico (número de partículas, temperatura e pressão constantes ou ensemble NPT). Para o controle da temperatura durante a simulação foi utilizado o termostato v-rescale e para o controle da pressão, utilizou-se o barostato Parrinello-Rahman (BUSSI, DONADIO, PARRINELLO, 2007; PARRINELLO, RAHMAN, 1981). As restrições de ligações e ângulos isolados foram realizadas utilizando o algoritmo LINCS (Linear Constraint Solver) (HESS et al., 1997). As interações eletrostáticas a longa distância foram tratadas utilizando o algoritmo PME (Particle-Mesh Ewald), conforme Darden, York e Pedersen (1993) e o raio de corte aplicado para as interações de van der Waals e de Coulomb foi de 1,2 nm. Após a termalização do sistema, realizou-se simulação de DM durante 10 ns, sem a restrição da posição dos átomos da enzima, usando tempo de integração de 2 fs. A partir da trajetória da simulação por dinâmica molecular, realizou-se a análise de variação de RMSD de cada estrutura e formação de populações (*cluster*) com estruturas aproximadas e baixa variação de RMSD entre elas (valor de corte de 0,1 Å) ao longo da simulação por DM, realizada pelo módulo g_cluster. A extração de estruturas médias das trajetórias foi realizada pelo módulo trjconv, disponíveis no programa GROMACS 4.6.1. Foi selecionado a estrutura tridimensional média do *cluster* com maior população para ser utilizada em estudo de ancoramento molecular.

5.3.3 Parâmetros utilizados no ancoramento molecular

A simulação do ancoramento molecular foi realizado utilizando o protocolo *Induced Fit Docking* (IFD) que busca prever o modo de ligação e as mudanças estruturais no receptor pela estratégia que utiliza o modo receptor e ligante flexível. A área da caixa de acoplamento foi definida para incluir todos os resíduos de

aminoácidos que se encontram no sítio ativo escolhido, com dimensões de 20 × 20 × 20 Å. O campo de força utilizado foi o OPLS_3. Os complexos ligante-proteína finais foram visualizados usando a plataforma Maestro Versão 10.2.010 e figuras foram geradas utilizando esta interface gráfica e o software Pymol (SCHRÖDINGER, 2015f).

O fármaco Pentamidina foi utilizado como padrão nos estudos *in silico* com a finalidade de se comparar a afinidade de ligação existente entre este fármaco com atividade leishmanicida conhecida e a proteína utilizada no estudo.

5.3.4 Validação dos protocolos de ancoramento molecular

A validação dos protocolos de ancoramento molecular foi realizada por meio do estudo de reancoramento tentando reproduzir o modo de ligação original presente na estrutura cristalográfica escolhida, utilizando a proteína alvo já preparada e o composto inibidor que se encontra cocrystalizado junto à proteína, que também foi preparado e minimizado. Após o ancoramento utilizando o programa *Induced Fit Docking* (IFD), foi calculado a raiz do desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD), pelo programa *Align Binding Site* (Schrödinger), para se verificar a similaridade entre o modo de ligação experimental obtida por cristalografia e a solução de menor energia de *GlideScore* no reancoramento molecular.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

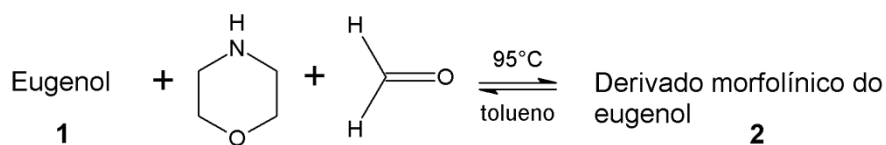
Os resultados obtidos pelas etapas de síntese, caracterização dos derivados ésteres de base de Mannich do eugenol propostos e estudos de modelagem molecular são descritos a seguir.

6.1 ETAPA SINTÉTICA

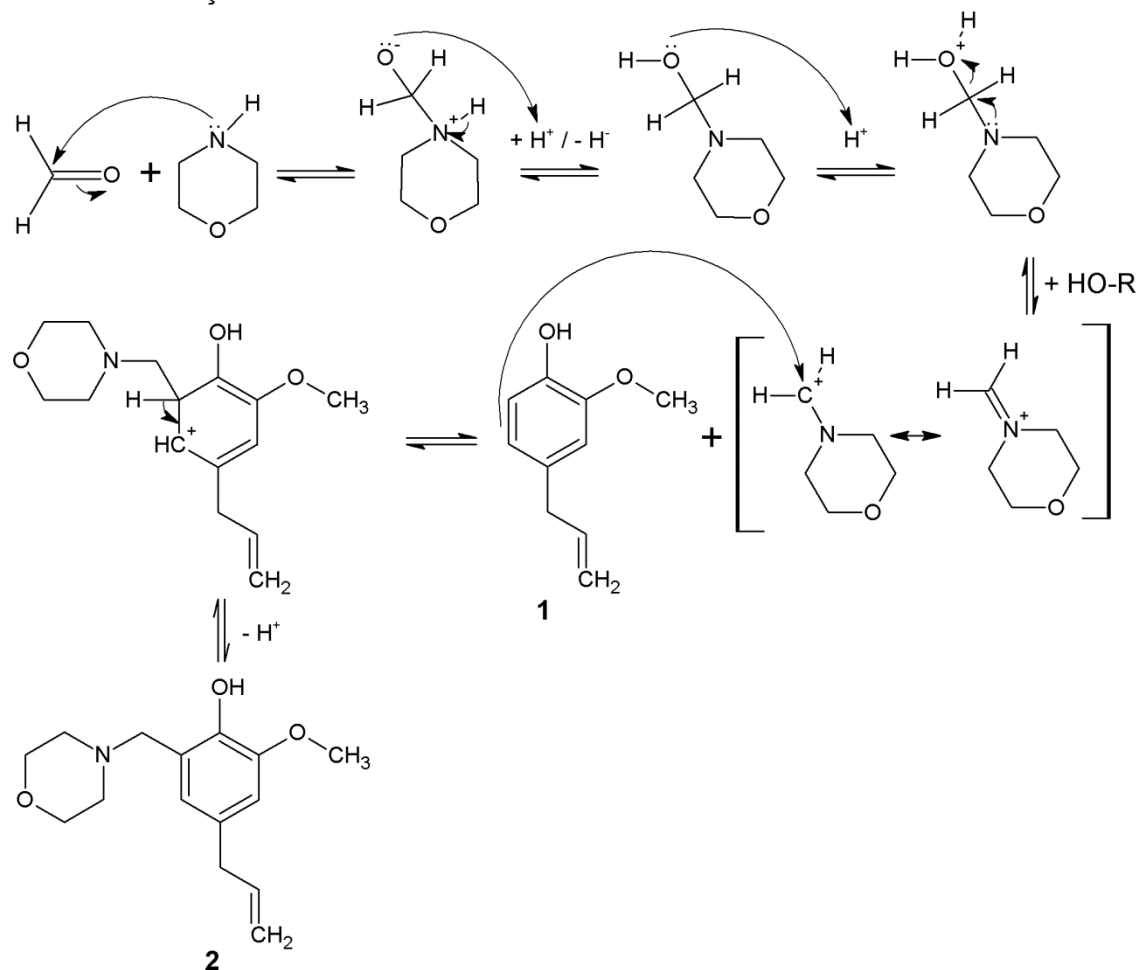
A obtenção da série de ésteres derivados do eugenol proposta iniciou-se com a reação conhecida como reação de Mannich para a formação do composto **2**, uma base de Mannich, conforme descrito por Abrão e colaboradores (2015). O mecanismo proposto para esta reação fundamenta-se em uma Substituição Eletrofílica Aromática (SEAr), com a formação inicial do intermediário imínio, uma espécie altamente eletrofílica, que se originou da interação entre a morfolina e a dimetilformamida, e que sofre o ataque da ligação π do anel aromático do eugenol (**1**), formando o íon arênio que é estabilizado por ressonância, deslocando a carga. O próton do íon arênio é removido por uma base do meio reacional, restaurando a aromaticidade do anel. A substituição ocorre na posição *orto* à hidroxila fenólica em consequência de seu efeito ativador, aumentando a densidade eletrônica nesta região devido à ressonância dos seus pares de elétrons livres pelo anel aromático. O efeito ativador da hidroxila é maior do que aquele realizado pelo grupamento metoxila, devido à possibilidade de formação do íon fenóxido, que não exerce ação retiradora de elétrons sobre o anel aromático, e por isso o rendimento é maior para o produto *orto* substituído (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; SMITH; MARCH, 2007, p. 668). A Figura 32 ilustra o mecanismo proposto para esta reação de substituição do anel aromático presente no eugenol.

Figura 32 - Mecanismo proposto para a reação de formação da base de Mannich do eugenol (**2**).

Esquema reacional:



Mecanismo de reação:

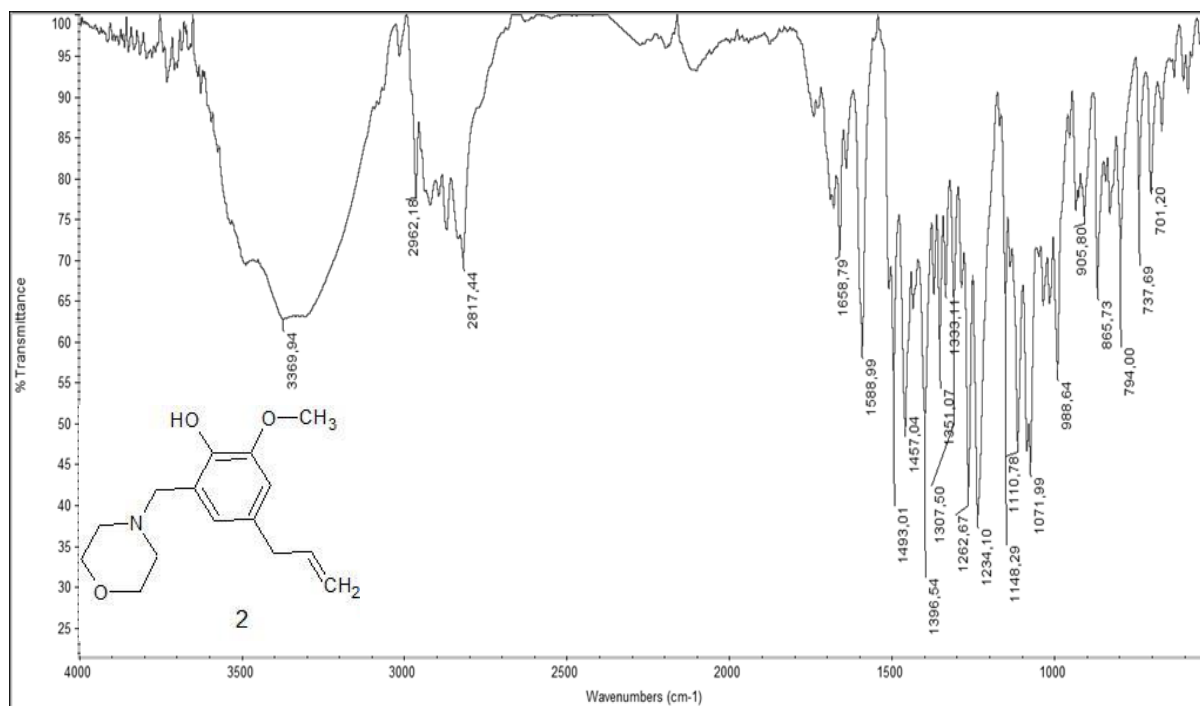


Fonte: Adaptado de CLAYDEN; GREEVES; WARREN (2012).

A análise realizada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho do composto **2**, representado na Figura 33, revelou uma banda larga característica de hidroxila em 3297 cm^{-1} , e uma banda forte em 1234 cm^{-1} , característica do estiramento C-O-C de éter que corresponde ao grupo metoxila e ao anel morfolina, além de bandas características de vibrações de núcleos aromáticos (1589 , 1493 e 1457 cm^{-1}) e deformação angular fora do plano de alcenos monossustituídos (989 e 906 cm^{-1}). A presença da banda em 1111 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação C-N, confirma a formação da base de

Mannich a partir do eugenol, assim como a comparação da faixa de fusão com aquele descrito na literatura (48-49°C).

Figura 33 - Espectro de absorção (cm^{-1}) na região do IV da substância 2.



Fonte: Da autora.

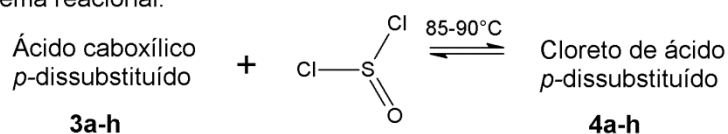
Os cloretos ácidos foram sintetizados para posteriormente serem utilizados na síntese dos ésteres derivados da base de Mannich do eugenol. O método utilizado foi realizado conforme descrito por Zhang e colaboradores (2010), porém foram feitas adaptações no volume de cloreto de tionila utilizado, aumentado sua proporção, devido à ausência de um solvente no meio reacional que tornasse possível o contato de todo o reagente com o material de partida. Somente com a adição de uma quantidade em excesso de cloreto de tionila (proporção aproximada de 1 mol do derivado ácido carboxílico e 10 mol de cloreto de tionila) foi possível a formação do cloreto de ácido a partir de um derivado ácido carboxílico. Não obteve-se sucesso na reação de formação de cloreto de ácido utilizando cloreto de tionila, diclorometano anidro como solvente e *N,N*-dimetilformamida (DMF) como catalisador, como descrito por Khalikov e colaboradores (2006).

O mecanismo de reação proposto para a formação do derivado cloreto de ácido, demonstrado na Figura 34, se baseia na substituição nucleofílica no átomo de enxofre do cloreto de tionila, com ataque pelo par de elétrons livres do oxigênio do

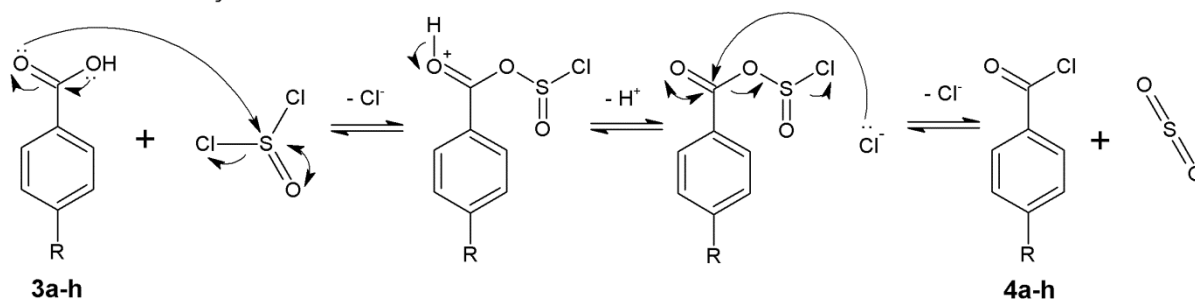
ácido benzóico *para*-dissubstituído, formando um bom grupo abandonador ligado ao carbono carbonílico. O íon cloreto liberado anteriormente ataca o carbono carbonílico em uma reação de substituição nucleofílica de carbono carbonílico, com liberação do bom grupo abandonador, formando dióxido de enxofre e íon cloreto. Não foi possível realizar análises de identificação em IV ou RMN para a confirmação da formação do produto devido à sua instabilidade e o mesmo é utilizado em seguida para reação subsequente.

Figura 34 - Mecanismo proposto para a reação de formação dos cloretos ácidos (**4a-h**) a partir de ácido carboxílico *para*-dissubstituído.

Esquema reacional:



Mecanismo de reação:



Fonte: Adaptado de BRUCKNER (2002).

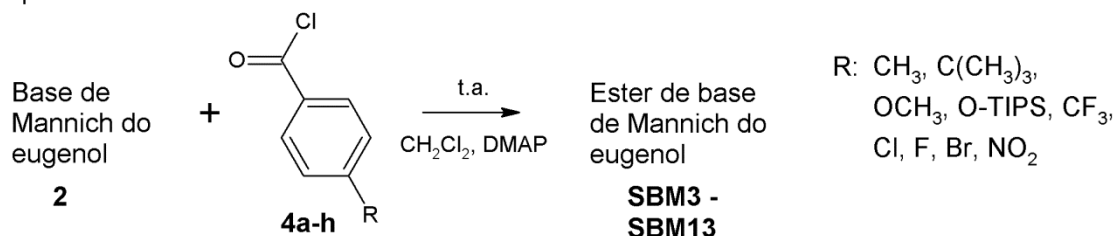
A síntese dos ésteres de base de Mannich descrita no método 1, foi realizada conforme o procedimento, com adaptações, descrito por Abrão e colaboradores (2015) e Zhang e colaboradores (2010) partindo-se do composto **2** e dos cloretos de ácido sintetizados. O rendimento de cada reação foi variável dependendo da reatividade de cada cloreto ácido utilizado como reagente, da pureza e da proporção de reagentes utilizada na reação, sendo que a proporção 1:2 (composto **2**: cloreto ácido) teve menor rendimento.

O mecanismo de reação proposto para a formação dos ésteres de base de Mannich, demonstrado na Figura 35, também se baseia na substituição nucleofílica em carbonila. Inicialmente, ocorre o ataque à carbonila pelo catalisador utilizado na reação, a 4-dimetilaminopiridina, com liberação de íon cloreto (Cl^-) e formação de um bom grupo abandonador ligado ao carbono carbonílico. Posteriormente, o composto

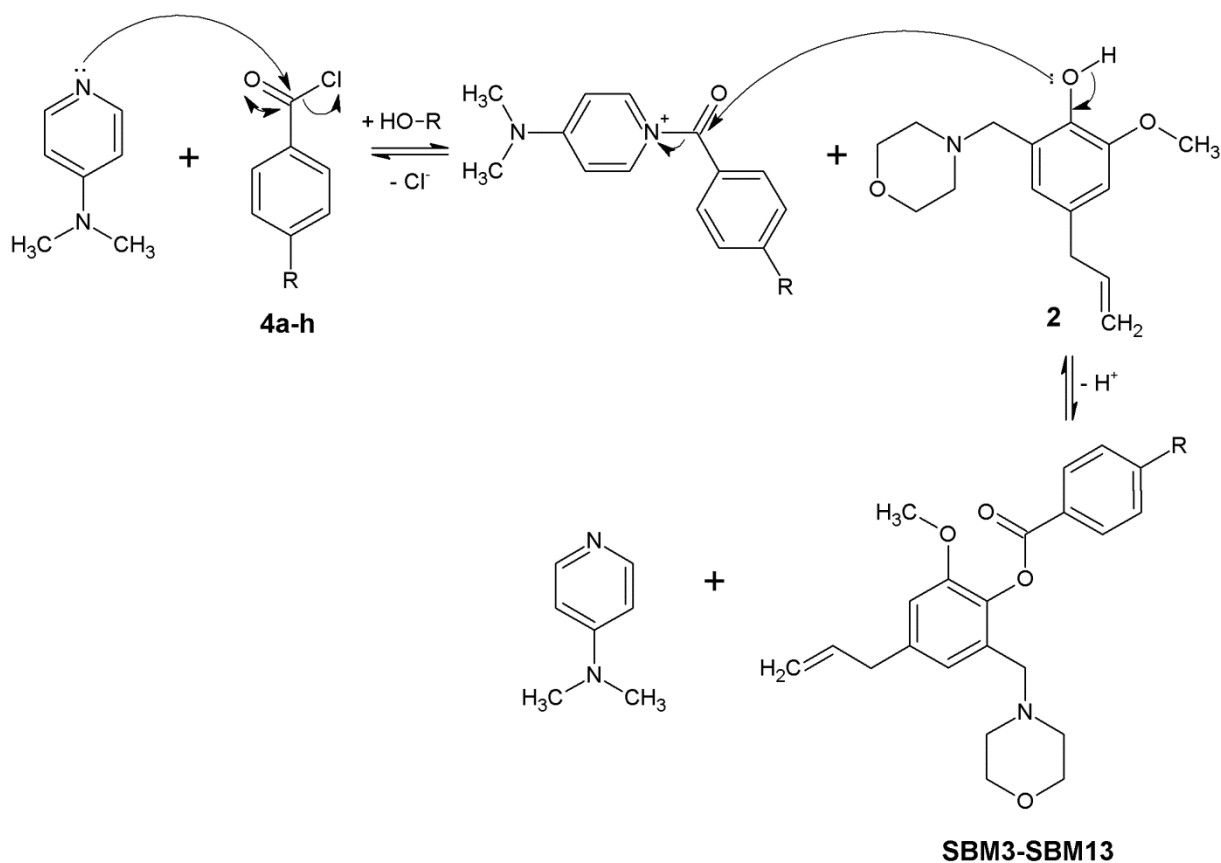
2 ataca a carbonila, com liberação do grupo abandonador e restabelecimento da 4-dimetilaminopiridina.

Figura 35 - Mecanismo proposto de esterificação utilizando cloreto ácido para a reação de formação dos compostos **SBM2 a SBM13**.

Esquema reacional:



Mecanismo de reação:



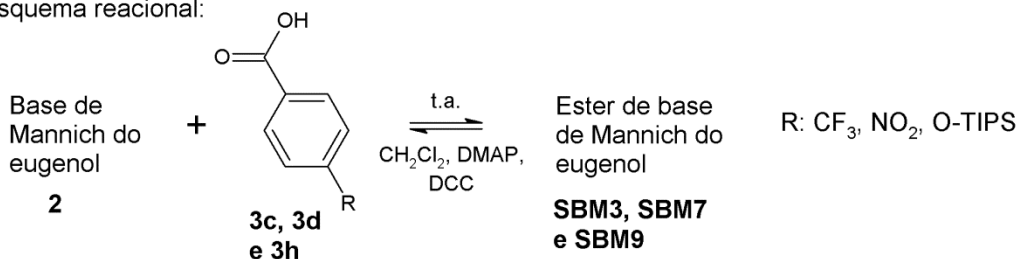
Fonte: Adaptado de CLAYDEN; GREEVES; WARREN (2012).

A síntese dos ésteres de base de Mannich descrita pelo método 2, foi realizada para a obtenção de maior massa dos produtos e com a finalidade de se comparar o rendimento obtido por dois procedimentos distintos, porém não foi possível concluir qual método apresentou melhor rendimento apenas com os experimentos realizados. A metodologia empregada foi realizada conforme descrito por Westphal e colaboradores (2016) utilizando-se uma reação com condições

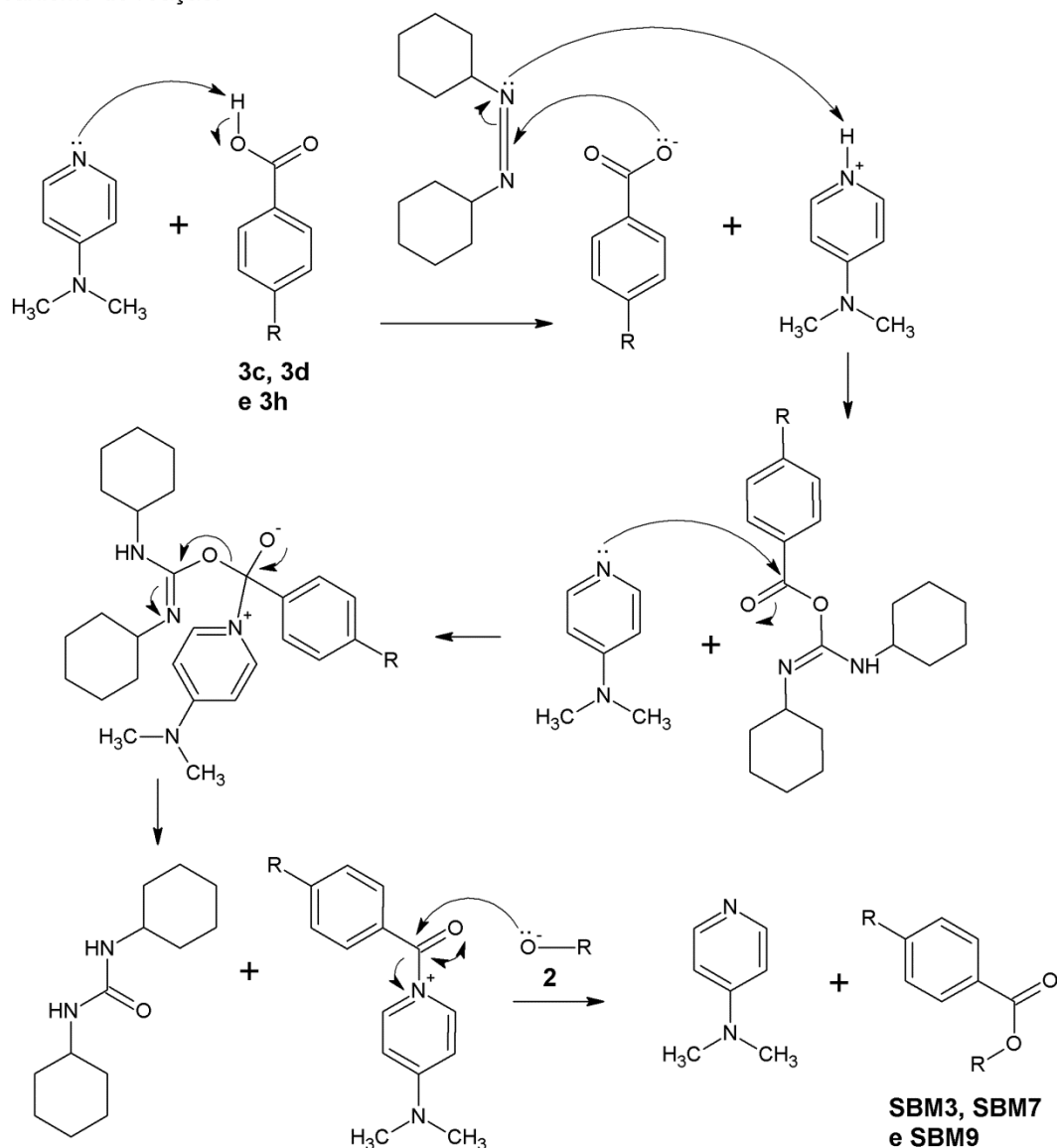
brandas conhecida como esterificação de Steglich. Na primeira etapa, o ataque exercido pelo ácido carboxílico ionizado ao carbono de baixa densidade eletrônica situado entre dois nitrogênios na estrutura do *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), um reagente de acoplamento, leva a formação do intermediário reativo *O*-acil-isouréia. Posteriormente, o DMAP, o catalisador da reação e nucleófilo forte, reage com o intermediário *O*-acil-isouréia formando uma amida bastante reativa, a qual sofre um ataque nucleofílico pela hidroxila fenólica, formando o éster de interesse (FIGURA 36) (GILLES et al., 2015; NEISES; STEGLISH, 1978). A dificuldade na purificação da reação utilizando DCC é relatada na literatura pela presença do *N,N'*-diciclohexiluréia (DCU), um subproduto da reação (YAN et al., 2009).

Figura 36 – Mecanismo de esterificação de Steglisch utilizando DCC e DMAP proposto para a reação de formação dos compostos **SBM3**, **SBM7** e **SBM9**.

Esquema reacional:



Mecanismo de reação:

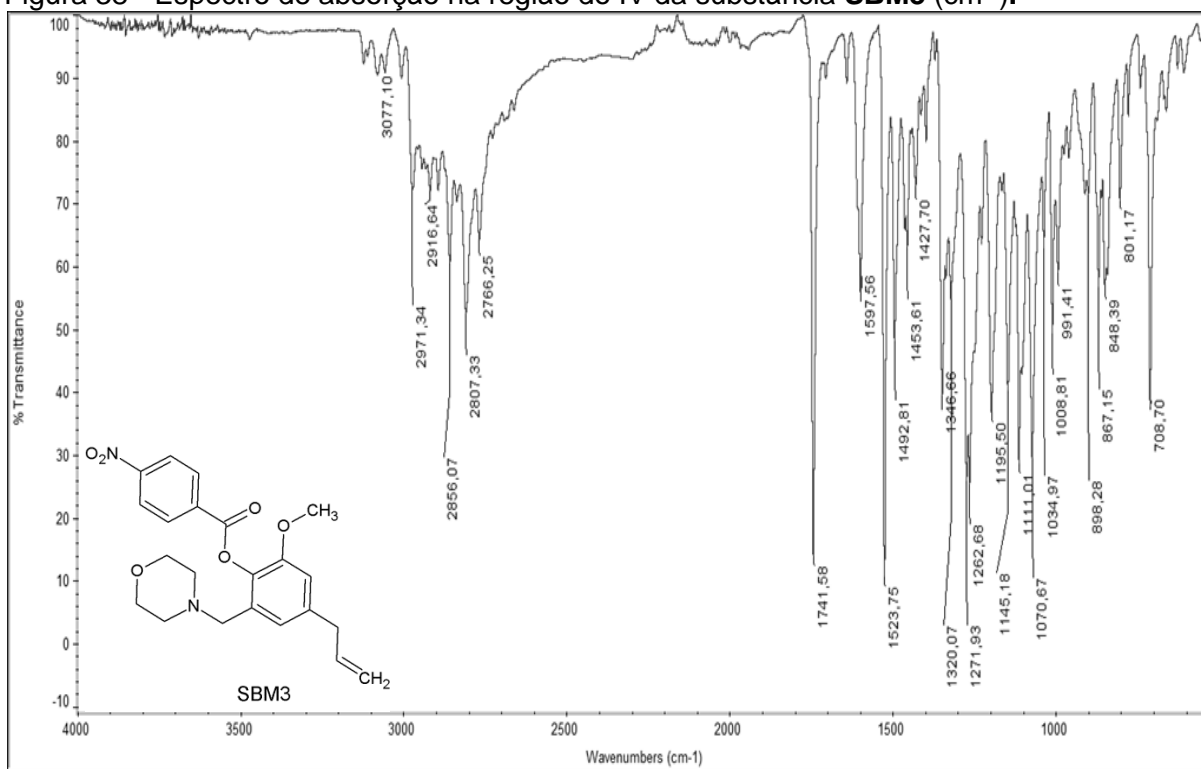


Fonte: Adaptado de YAN et al. (2012).

A síntese do composto éster *p*-aminobenzoato de base de Mannich (**SBM13**) foi realizada por meio de uma redução do grupamento nitro do éster *p*-nitrobenzoato de base de Mannich (**SBM3**). A princípio, a reação foi conduzida sob refluxo a 70°C utilizando-se SnCl₂.2H₂O em meio à etanol absoluto por 30 minutos, conforme

com banda em 1742 cm^{-1} , que evidencia a formação do éster, e de estiramento de ligação C-O de éster ligado à aromático com bandas em 1196 cm^{-1} . A presença das bandas fortes em 1263 e 1071 cm^{-1} , caracteriza o estiramento C-O-C de éter ligado à aromático correspondente ao grupo metoxila, além de bandas características de vibrações de núcleos aromáticos (1598 , 1493 e 1454 cm^{-1}) e deformação angular fora do plano de alenos monossubstituídos (1009 e 898 cm^{-1}). A identidade do composto **SBM3** é confirmada pela presença de bandas fortes de deformação axial assimétrica, em 1524 cm^{-1} , e simétrica, em 1347 cm^{-1} , comprovando a presença de um grupamento NO_2 presente no composto.

Figura 38 - Espectro de absorção na região do IV da substância **SBM3** (cm^{-1}).



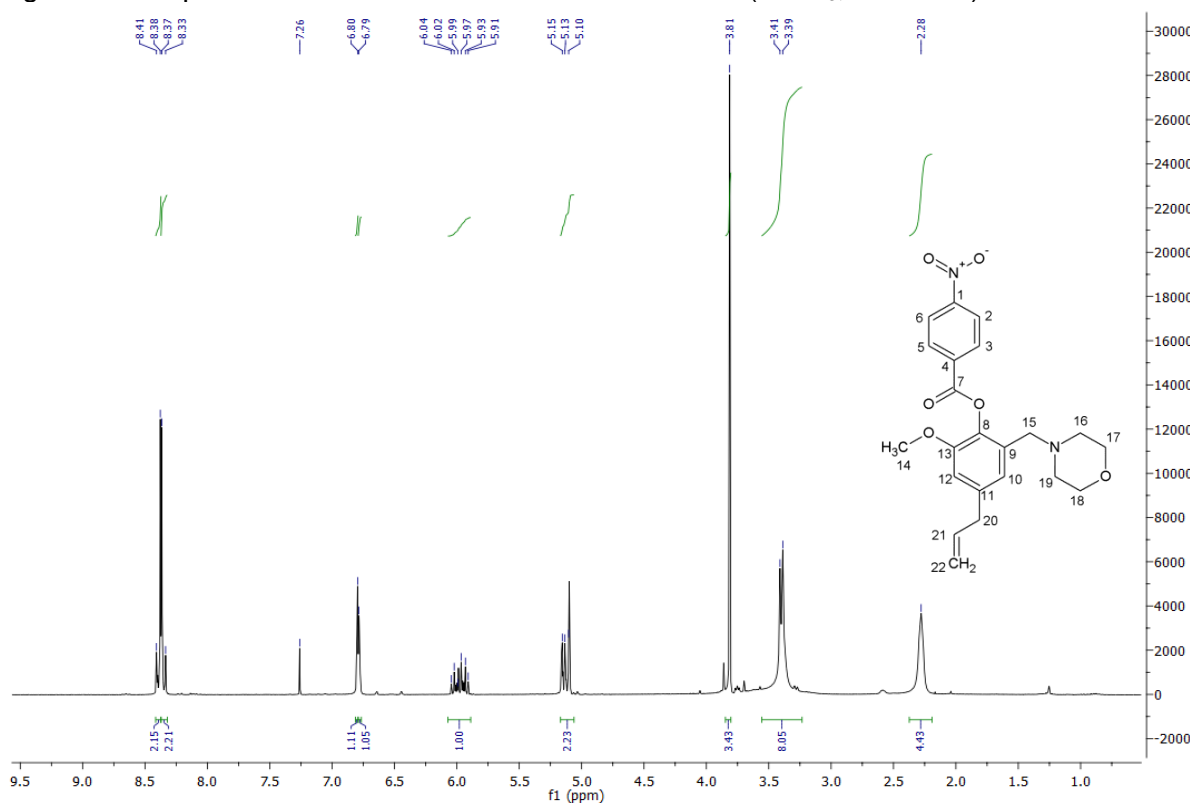
Fonte: Da autora.

O padrão de bandas observado no espectro do composto **SBM3** se repetiu na análise realizada nos ésteres sintetizados (**SBM2** - **SBM13**), como pode ser observado nos espectros expostos em anexo (página 135 à 139).

Nos espectros de RMN de ^1H da substância **SBM3**, representado na Figura 39, notam-se os sinais dos hidrogênios aromáticos H2, H3, H5 e H6 como um multipeto com integração correspondente à 4 hidrogênios em uma região de maior desblindagem, típica de hidrogênios aromáticos, em δ 8,41-8,33 ppm. Os

hidrogênios aromáticos H12 e H10 se apresentam como dois simpletos com deslocamento químico de δ 6,80 ppm (H10) e δ 6,79 ppm (H12). Os hidrogênios presentes no grupo alila correspondem a dois multipletos com deslocamento químico entre δ 6,04-5,91 ppm ($\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{H}}\text{C}=\text{CH}_2$) e δ 5,15-5,10 ppm ($\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{H}}\text{C}=\text{CH}_2$). O efeito de desblindagem do oxigênio é notado no sinal referente aos hidrogênios da metoxila e aos hidrogênios do anel morfolina, devido ao seu efeito retirador de elétrons. O simpleto referente aos hidrogênios do grupo OCH_3 aparecem em δ 3,81 ppm. Devido ao fato do átomo de oxigênio exercer um efeito retirador de elétrons maior que o nitrogênio, os quatro hidrogênios do heterociclo mais próximos ao oxigênio apresentam maior deslocamento químico (H17 e H18), representado pelo multipletto entre δ 3,41-3,39 ppm, sobreposto aos hidrogênios metilênicos vizinhos ao alceno e ao heterociclo (H20 e H15). Os hidrogênios do heterociclo mais próximo ao nitrogênio (H16 e H19) apresentaram deslocamento químico de δ 2,28 ppm, em região de maior blindagem.

Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H da substância **SBM3** (CDCl_3 , 300 MHz).

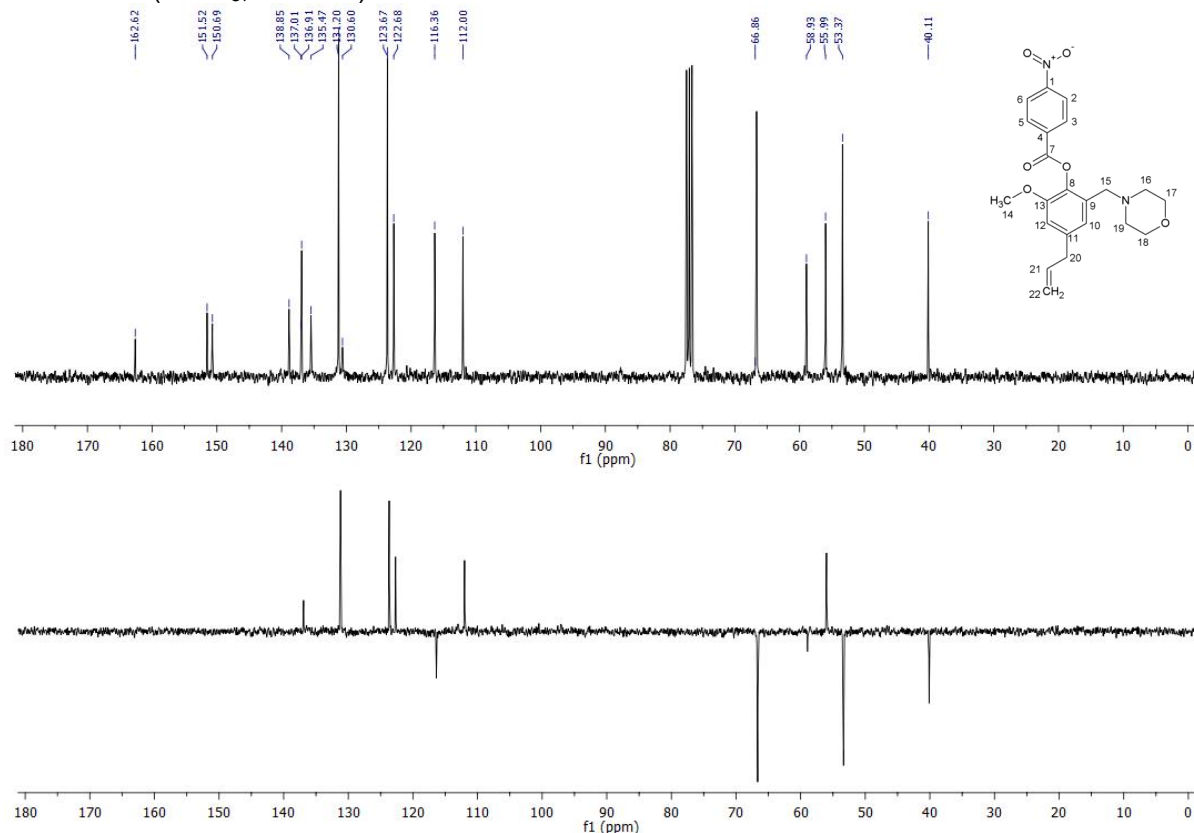


Fonte: Da autora.

No espectro de RMN de ^{13}C da substância **SBM3**, representado na Figura 40, observa-se a δ 40,11 ppm o sinal relativo ao carbono com maior blindagem (C20)

devido à ausência de um átomo eletronegativo em sua vizinhança a três ligações de distância. Os sinais de maior intensidade, a δ 53,37 e δ 66,86 ppm, correspondem aos carbonos equivalentes presentes no anel morfolínico, sendo que os carbonos mais próximos do oxigênio (C17 e C18) são mais desblindados e possuem maior deslocamento químico (δ 66,86 ppm). O sinal referente ao carbono do grupo metoxila (OCH_3) foi determinado em δ 55,99 ppm devido ao sinal no subespectro DEPT-135, demonstrado na Figura 40, correspondente a um carbono contendo próton, porém inverso ao sinal de CH_2 . O sinal de CH_2 do subespectro DEPT-135 em δ 58,93 ppm corresponde ao carbono C15 e em δ 116,36 ppm ao carbono C22. Os sinais da região entre δ 112,00 e 151,52 ppm representam carbonos aromáticos e os carbonos do alcenos, e a atribuição de cada sinal foi feita pelo uso da tabela de correção do deslocamento químico (PAVIA et al., 2010). O sinal de maior desblindagem (δ 162,62 ppm) corresponde ao sinal característico de carbono da carbonila (C7).

Figura 40 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **SBM3** (CDCl_3 , 75 MHz).

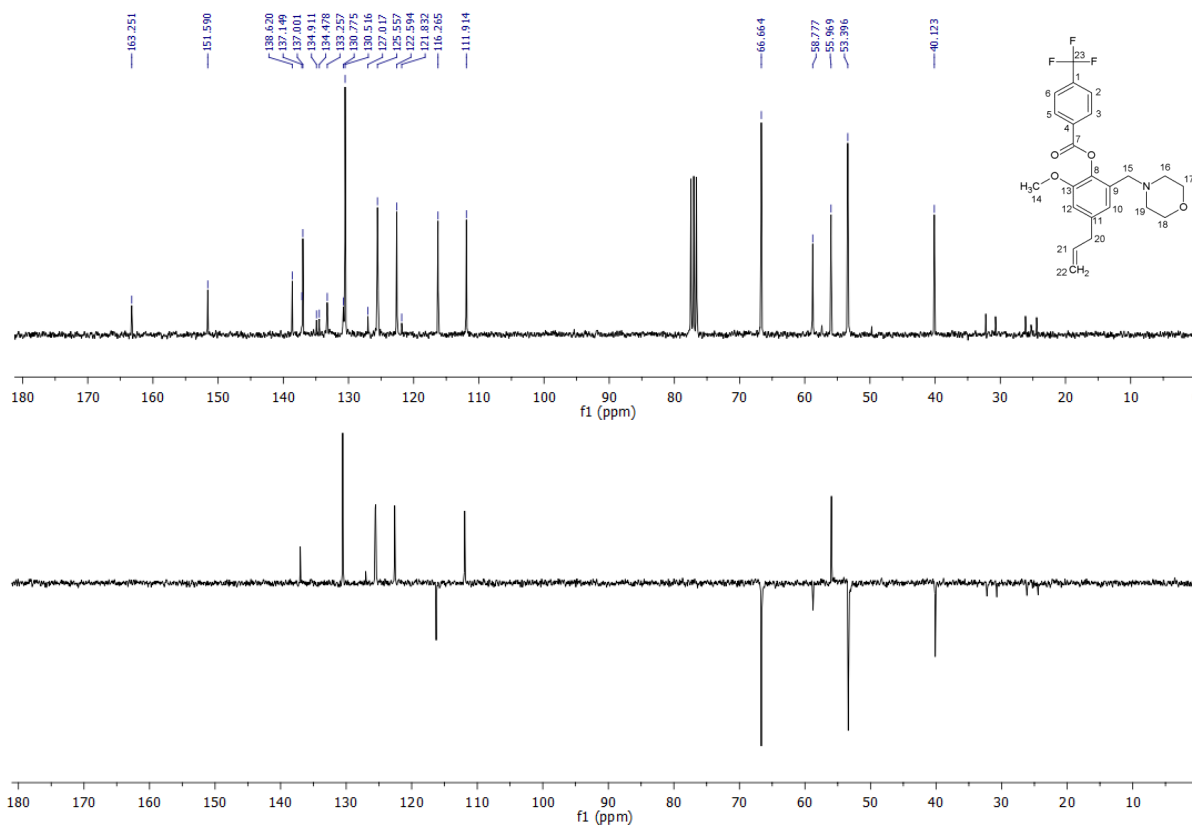


Fonte: Da autora.

O perfil de sinais na espectroscopia por ressonância magnética nuclear se manteve para os compostos analisados da série, com variações pequenas de deslocamento químico devido à diferença de eletronegatividade entre os átomos.

O acoplamento heteronuclear entre carbono-13 e flúor-19 pode ser verificado no espectro de RMN de ^{13}C dos compostos **SBM9** e **SBM11** (FIGURA 41 e 42). Para o composto **SBM9** os sinais referentes aos deslocamentos químicos δ 127,02; 130,77; 134,91 e 138,62 ppm (quarteto) correspondem ao acoplamento entre o carbono C23 e os 3 átomos de flúor diretamente ligados a este carbono, apresentando uma constante de acoplamento via uma ligação calculada de 290,07 Hz. O acoplamento entre o carbono C1 e os átomos de flúor desta molécula não pôde ser identificado, possivelmente devido à baixa intensidade do sinal de acoplamento via duas ligações e a diminuição de intensidade causada pela ausência de prótons diretamente ligados ao carbono. Quantidades residuais de DCU resultante da reação que utiliza DCC podem ser verificadas no espectro de RMN de ^{13}C do composto **SBM9** (CF_3) na região entre δ 20-35 ppm (FIGURA 41).

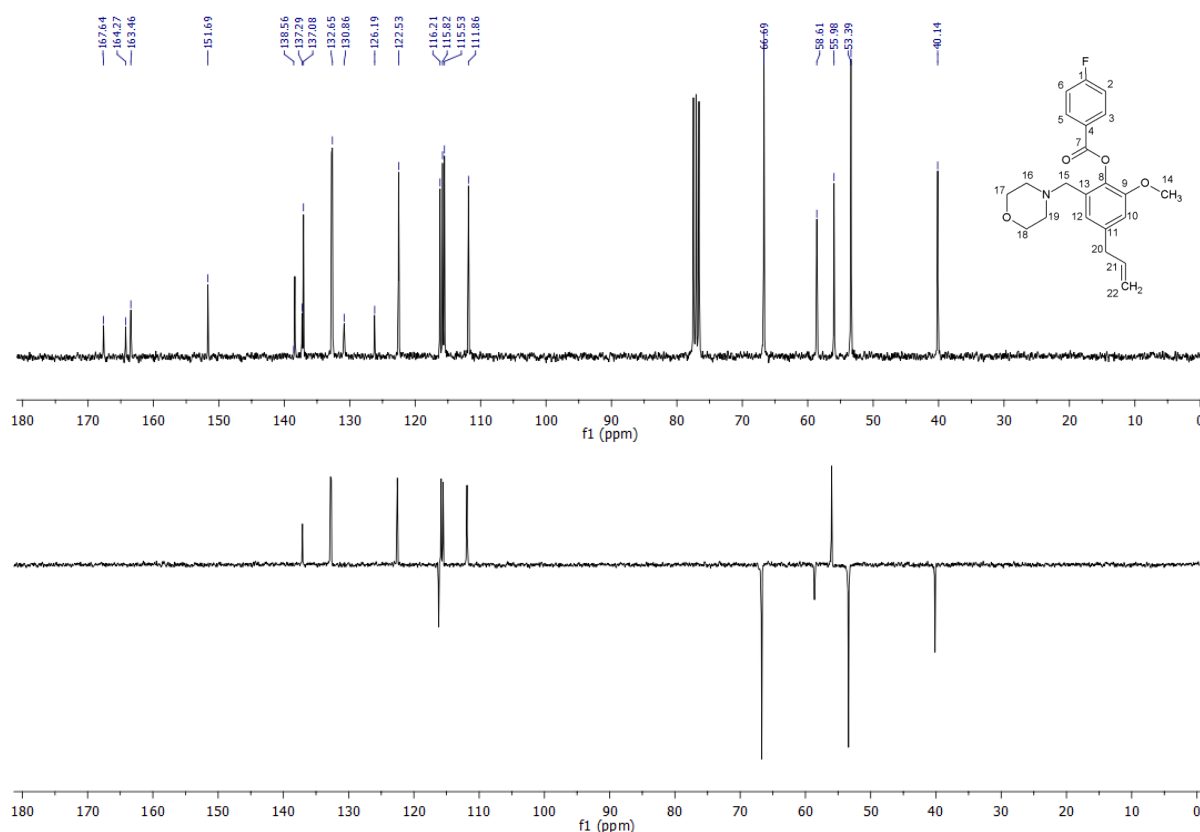
Figura 41 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **SBM9** (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: Da autora.

No espectro obtido para composto **SBM11**, ilustrado na Figura 42, os sinais referentes aos deslocamentos químicos δ 163,5 e 167,6 ppm correspondem ao acoplamento via uma ligação entre o carbono C1 e o átomo de flúor diretamente ligado a este carbono, apresentando uma constante de acoplamento calculada de 307,5 Hz. O acoplamento via duas ligações entre os carbonos C2 e C6 e o átomo de flúor corresponde aos sinais δ 115,5 e 115,8 ppm (dubleto), com uma constante de acoplamento calculada menor, equivalente a 22,5 Hz. Os valores de constante de acoplamento obtidos estão de acordo com os valores típicos de acoplamento via uma ligação ($J = 165\text{-}370$ Hz) e via duas ligações ($J = 18\text{-}45$ Hz) (PAVIA et al., 2010).

Figura 42 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **SBM11** (CDCl_3 , 75 MHz).



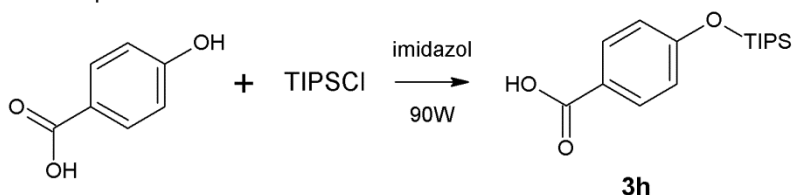
Fonte: Da autora.

A tentativa de síntese do composto éster *p*-hidroxibenzoato de base de Mannich (**SBM7**) iniciou-se com a proteção da hidroxila fenólica do ácido *p*-hidroxibenzoico para prevenir a formação de dímeros deste ácido durante a esterificação devido a reatividade da hidroxila, uma vez que a esterificação utilizando o ácido *p*-hidroxibenzoico desprotegido não ocorreu.

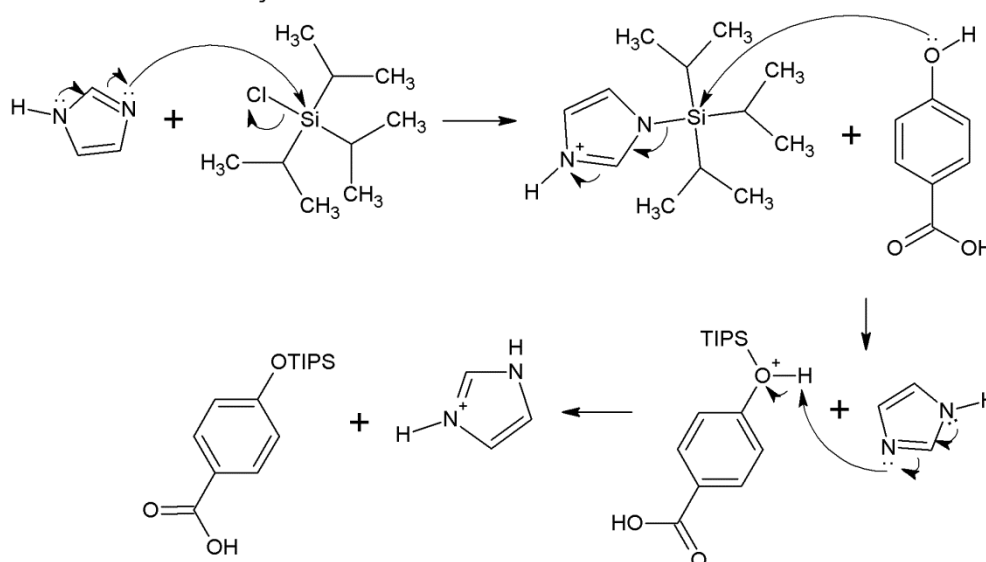
A reação de proteção utilizando cloreto de triisopropilsilano (TIPSCI) e imidazol ocorre pelo mecanismo de substituição nucleofílica (FIGURA 43). Em análise por CCD após 17 minutos de reação em microondas observou-se o consumo de todo ácido com formação de um produto de menor polaridade.

Figura 43 - Mecanismo proposto para a formação do composto ácido 4-[(triisopropilsilil)oxi]benzóico.

Esquema reacional:



Mecanismo de reação:

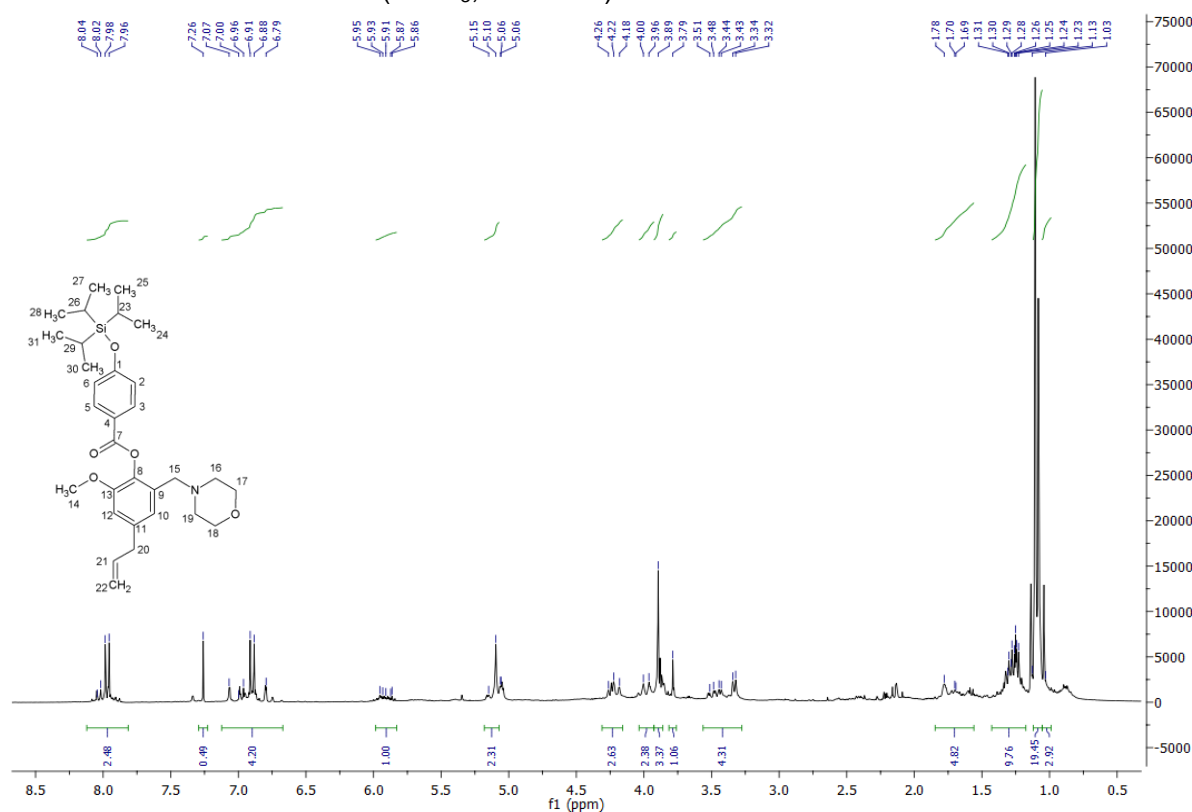


Fonte: Adaptado de CLAYDEN; GREEVES; WARREN (2012).

Posteriormente, realizou-se a tentativa de esterificação partindo-se do composto **2** e o ácido 4-[(triisopropilsilil)oxi]benzóico pelos dois métodos descritos anteriormente. A reação conduzida pelo método 1 apresentou rendimento baixo. Análises por RMN confirmaram a formação do produto desejado pela presença dos sinais característicos dos hidrogênios existentes na molécula e pela presença de um sinal em δ 1,11 ppm com integração para 19 hidrogênios correspondente aos 18 hidrogênios do grupamento triisopropilsilil, ilustrado na Figura 44, porém uma grande quantidade de impurezas foi verificada nos espectros obtidos do produto purificado por CC. A reação de esterificação conduzida pelo método 2 teve como produto um óleo transparente com odor característico do reagente TIPSCI, sugerindo a presença

de impurezas que não se revelavam em espectroscopia no UV. Após a tentativa de desproteção obteve-se baixo rendimento do produto que revelou presença de hidroxila fenólica em solução de FeCl_3 a 10%.

Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H da substância éster *p*-(Triisopropilsiloxi)benzoato de base de Mannich (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

A dificuldade na proteção da hidroxila fenólica utilizando TIPSCI em moléculas que possuem também o grupamento ácido carboxílico foi indicada como provável responsável pelo baixo rendimento reacional. A formação de trialquilsilil ésteres pela proteção de ácido carboxílico já foi relatada, sendo que o reagente TIPSCI protege preferencialmente o ácido carboxílico (95%) à hidroxilas fenólicas. A utilização do reagente cloreto de *tert*-butildimetilsilil (TBDMSCl) seria preferível, com 70% de formação do fenol silil éter e 30% do silil éster correspondente (FIROUZABADI; IRANPOOR; SHATERIAN, 2000).

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA *IN VITRO*.

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antiparasitária *in vitro* são descritas a seguir.

6.2.1 Avaliação da atividade antipromastigota

Os estudos de avaliação da atividade antipromastigota apresentaram valores satisfatórios de inibição parasitária, sendo que três compostos não foram ativos nas concentrações utilizadas no método (TABELA 4).

Tabela 4 - Avaliação da atividade antipromastigotas das moléculas **SBM2-SBM13** demonstrada por valores de CI_{50} de inibição do crescimento parasitário em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e o intervalo de confiança a 95% encontrado pela análise estatística e R^2 .

Molécula	Substituinte (R)	CI_{50} (μM), intervalo de confiança	R^2
Intermediário 2	-	N.A.	-
SBM2	H	24,09	0,799
SBM3	NO_2	65,76 [47,33 ; 91,36]	0,854
SBM4	CH_3	22,47 [17,77 ; 28,39]	0,985
SBM5	OCH_3	20,48 [17,34 ; 24,18]	0,938
SBM8	Br	13,11 [7,89 ; 21,78]	0,863
SBM9	CF_3	N.A.	-
SBM10	<i>tert</i> -butil	N.A.	-
SBM11	F	40,06 [30,54 ; 52,51]	0,943
SBM13	NH_2	33,26 [20,58 ; 53,78]	0,788
Anfotericina	-	0,08 [0,001 ; 5,99]	0,808

Fonte: Da autora.

* N.A. – Não ativo

O estudo biológico permitiu verificar que os compostos **SBM2**, **SBM3**, **SBM4**, **SBM5**, **SBM8**, **SBM11** e **SBM13** possuem atividade leishmanicida.

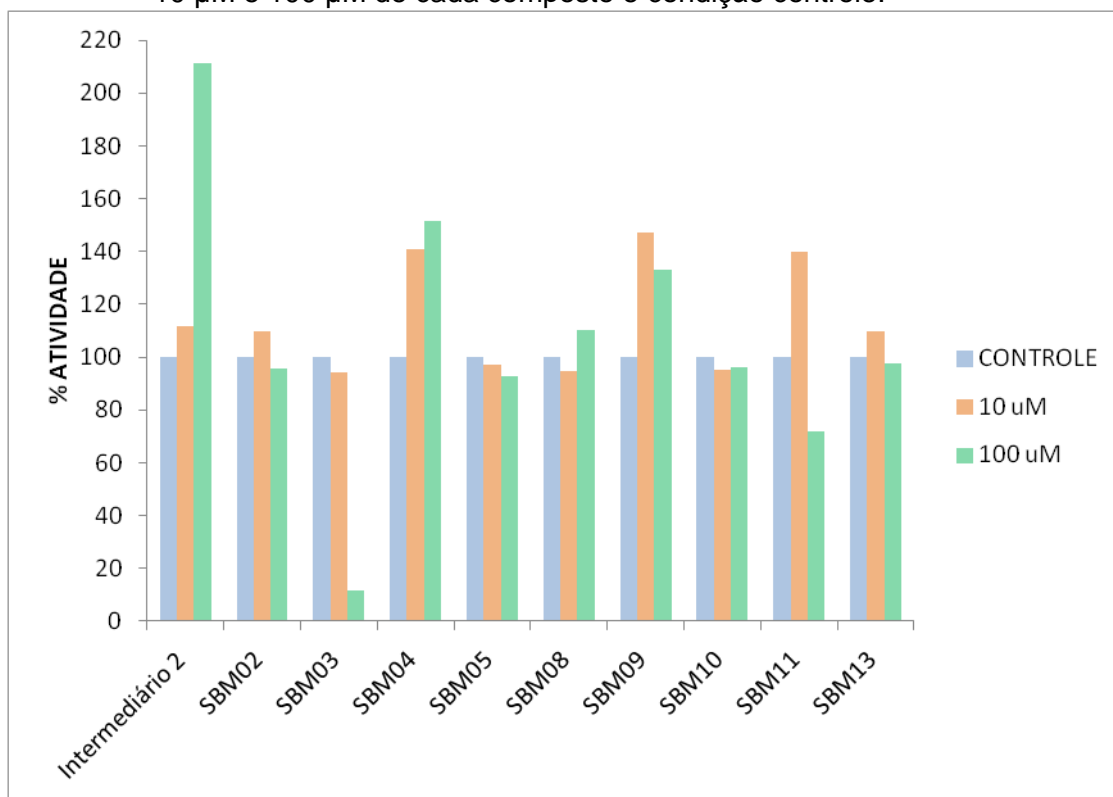
A presença de um grupamento volumoso como o grupo *terc*-butil no anel *p*-dissubstituído não foi favorável para que o composto **SBM10** apresentasse atividade leishmanicida, diminuindo sua interação no local de ação provavelmente devido à um efeito de impedimento estérico.

Composto contendo grupamentos doadores de elétrons ao anel aromático *p*-dissubstituído pelo efeito de ressonância apresentaram uma atividade leishmanicida de magnitude ligeiramente maior em relação composto contendo grupamentos retiradores de elétrons, aumentando a densidade eletrônica neste anel e possibilitando uma interação mais forte do tipo π - π *stacking* e cátion- π , como pode ser visto na atividade apresentada pelos compostos contendo os substituintes CH₃, OCH₃, NH₂ (**SBM4**, **SBM5** e **SBM13**), e o efeito neutro do derivado não substituído (H, **SBM2**). Grupamentos retiradores de elétrons do anel aromático *p*-dissubstituído pelo efeito de ressonância e por efeito indutivo tiveram uma atividade leishmanicida de magnitude ligeiramente menor, como pôde ser verificado pela atividade dos compostos contendo os grupamentos NO₂, F (**SBM3** e **SBM11**) e CF₃ (**SBM9**) em maior grandeza devido a presença de 3 átomos eletronegativos.

6.2.2 Avaliação da atividade inibitória sobre a enzima rCPB2.8

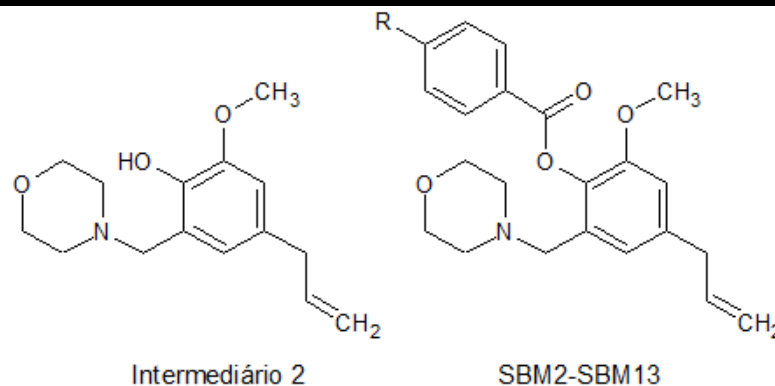
A avaliação do potencial de inibição enzimático dos compostos estudados sobre a enzima rCPB2.8 foi expressa em porcentagem de atividade enzimática nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M de cada composto e condição controle, em sua ausência (GRÁFICO 1, TABELA 5).

Gráfico 1 - Avaliação da atividade inibitória sobre a enzima rCPB2.8 das moléculas intermediário 2, SBM2-SBM13 demonstrada por gráfico em barras dos valores de porcentagem de atividade enzimática nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M de cada composto e condição controle.



Fonte: Da autora.

Tabela 5 - Avaliação da atividade inibitória sobre a enzima rCPB2.8 das moléculas intermediário 2, SBM2-SBM13 demonstrada por valores de atividade enzimática em concentrações de 10 μ M e 100 μ M de cada composto e controle.



COMPOSTO	Substituinte (R)	CONTROLE	%	10 μ M	%	100 μ M	%	INIBIÇÃO
Intermediário 2	-	141,8765	100	158,3869	111,6	299,8446	211,3	Ativou
SBM02	H	62,0299	100	68,0939	109,8	59,3707	95,7	Baixa
SBM03	NO ₂	56,4439	100	53,1415	94,1	6,6387	11,8	Alta
SBM04	CH ₃	42,0067	100	59,2211	141,0	63,6584	151,5	Ativou
SBM05	OCH ₃	75,7245	100	73,5317	97,1	70,2466	92,8	Baixa
SBM08	Br	188,6462	100	178,6504	94,7	208,0545	110,3	Ativou
SBM09	CF ₃	155,1965	100	228,2241	147,0	206,8255	133,3	Ativou
SBM10	<i>terc</i> -butil	206,3368	100	196,8749	95,4	198,5747	96,2	Baixa
SBM11	F	143,6053	100	200,7446	139,8	103,0306	71,7	Baixa
SBM13	NH	150,9329	100	165,7663	109,8	147,6943	97,9	Baixa

Fonte: Da autora.

O composto **SBM3** apresentou uma atividade de inibição alta na concentração de 100 μM , reduzindo 88% da atividade da enzima rCPB2.8 nesta concentração. Os compostos **SBM2**, **SBM5**, **SBM10**, **SBM11** e **SBM13** apresentaram atividade inibitória baixa com inibição de 4,3; 7,2; 3,8; 28,3 e 2,2%, respectivamente, da atividade da enzima rCPB2.8, também na concentração de 100 μM .

A possível interação da enzima rCPB2.8 com grupamentos carregados positivamente já foi descrita devido a presença de um aminoácido glutamato (Glu205) flexível, conforme mencionado por Gillmor, Craik e Fletterick (1997), e pode ser responsável pela afinidade entre o composto **SBM3**, que contém um nitrogênio com carga formal positiva no grupamento nitro.

A presença do átomo de maior eletronegatividade, o flúor, e receptor de ligação de hidrogênio, levou à uma atividade inibitória mediana (redução de 28% da atividade) do composto **SBM11** sobre esta enzima.

A ativação da enzima exercida pelos compostos intermediário **2**, **SBM4**, **SBM8** e **SBM9** pode estar relacionada com a interação destes compostos em um sítio alostérico, o que levaria a uma alteração conformacional no sítio ativo com o aumento da catálise enzimática e aumento da velocidade de reação.

6.2.3 Avaliação da citotoxicidade

Realizou-se a avaliação da citotoxicidade dos compostos que se mostraram mais ativos no estudo de atividade antipromastigota e que apresentaram melhor atividade de inibição da enzima rCPB2.8. O cálculo de índice de seletividade foi realizado para se comparar o quanto o composto é mais ativo para levar a morte do parasito em relação a sua ação tóxica em macrófagos. O cálculo é feito pela razão CC_{50} em macrófagos pelo IC_{50} em promastigotas.

Tabela 6 - Avaliação da citotoxicidade em macrófagos e o intervalo de confiança a 95% encontrado pela análise estatística e o valor de índice de seletividade (IS).

Molécula	Substituinte (R)	CC ₅₀ (µM)	Cl ₅₀ -PRO (µM)	IS (CC ₅₀ / IC ₅₀ -PRO)
SBM2	H	20,55 [12,05 ; 35,00]	24,09	0,85
SBM3	NO ₂	5,24 [0,89 ; 30,84]	65,76	0,08
SBM4	CH ₃	31,46 [22,42 ; 44,15]	22,47	1,40
SBM5	OCH ₃	16,25 [5,23 ; 50,47]	20,48	0,79
SBM8	Br	81,98 [51,13 ; 131,41]	13,11	6,25
SBM11	F	103,83 [72,23 ; 149,29]	40,06	2,59
Anfotericina	-	0,069 [0,001 ; 6,25]	0,08	0,86

Fonte: Da autora.

Os compostos halogenados, **SBM8** e **SBM11**, foram os compostos menos citotóxicos por apresentarem um maior índice de seletividade, demonstrando baixo valor de Cl₅₀ em promastigotas e alto valor de CC₅₀ em macrófagos.

O composto **SBM3** se demonstrou tóxico, entretanto a toxicidade e o potencial carcinogênico exercida por nitrobenzenos já é conhecida (KOVACIC; SOMANATHAN, 2014).

6.3 ESTUDOS COMPUTACIONAIS POR MODELAGEM MOLECULAR

O estudo por modelagem molecular compreende ferramentas que buscam simular da forma mais aproximada a interação entre um composto de baixo peso molecular e uma macromolécula. A obtenção de uma estrutura tridimensional representativa de uma proteína se dá pela busca em banco de dados específicos ou pela construção de um modelo tridimensional pelo método de modelagem por homologia baseando-se no fato de que regiões semelhantes entre proteínas homólogas apresentam conformações internas conservadas.

As proteínas utilizadas para a realização do estudo *in silico* foram selecionadas buscando-se encontrar alvos moleculares que interajam de forma satisfatória com a série de moléculas propostas neste estudo, buscando assim obter uma relação da estrutura/atividade destes para a otimização e desenvolvimento de protótipos a inibidores mais efetivos e que sejam seletivos à enzima de *Leishmania* em relação às enzimas análogas presentes em humano, por meio de estudo de resíduos presentes apenas na enzima do parasito.

Para a eleição dos melhores resultados obtidos na simulação de ancoramento molecular para cada proteína foi utilizado o parâmetro *GlideScore* como forma de quantificar a grandeza da interação ligante/receptor. O *GlideScore* é uma função de pontuação empírica que se aproxima da energia livre de ligação do ligante. Os termos incluídos nesta função são interações eletrostática, van der Waals, contribuições de bonificações ou interações penalizantes, entre outras, conhecidos por influenciar a interação do ligante (EQUAÇÃO 1). O uso do *GlideScore* é recomendado para classificar poses de diferentes ligantes, como por exemplo no “Screening Virtual”, possibilitando comparar a afinidade de cada ligante com a enzima (FRIESNER, 2004; SCHRÖDINGER, 2016).

Equação 1 - Função para cálculo de *GlideScore* (FRIESNER, 2004)

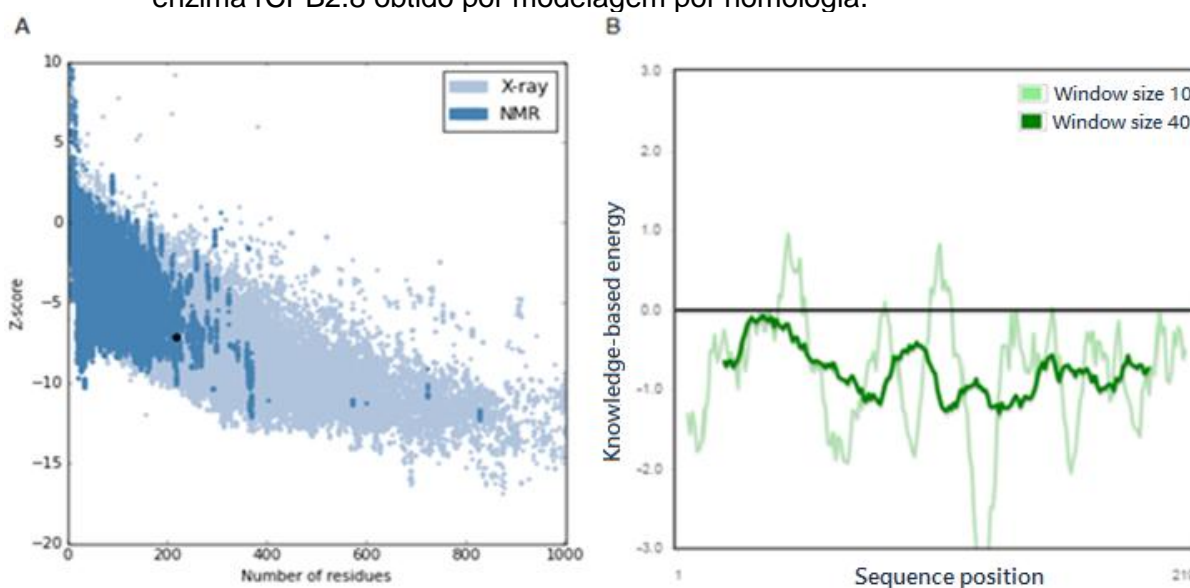
$$\Delta G_{\text{ligação}} = C_{\text{lipofil-lipofil}} \sum f(r_{lr}) + C_{\text{LigaçãoH-neut-neut}} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + C_{\text{LigaçãoH-neut-carregado}} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + C_{\text{LigaçãoH-carregado-carregado}} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + C_{\text{max-metal-ion}} \sum f(r_{lm}) + C_{\text{rottb}} H_{\text{rottb}} + C_{\text{polar-hidrofób}} V_{\text{polar-hidrofób}} + C_{\text{coul}} E_{\text{coul}} + C_{\text{vdW}} E_{\text{vdW}} + \text{termos de solvatação}$$

6.3.1 Validação da metodologia de Modelagem Molecular por Homologia da enzima rCPB2.8

O modelo de predição da estrutura tridimensional da proteína cisteíno protease tipo B 2.8 definido pelo software Modeller apresentou boa qualidade estereoquímica após avaliação. A pontuação *Z-score*, ilustrada na Figura 45-A, indica a qualidade global do modelo em um gráfico que contém as pontuações de todas as cadeias proteicas determinadas experimentalmente, por raio-X ou RMN, no banco de dados PDB atual. Pode-se verificar que o *Z-score* obtido para a estrutura da proteína cisteíno protease (-7,11) está dentro do intervalo de pontuações encontradas tipicamente para proteínas nativas de tamanho similar (200

aminoácidos). A pontuação de energia “*knowledge-based energy*”, ilustrada na Figura 45-B, mostra a qualidade do modelo representando as energias como uma função da posição da sequência de aminoácidos. Em geral, valores positivos correspondem a partes problemáticas ou erradas da estrutura de entrada. A energia média a cada 40 resíduos, mostrado em verde escuro, demonstra valores de energia abaixo de 0, validando a estrutura tridimensional obtida neste parâmetro.

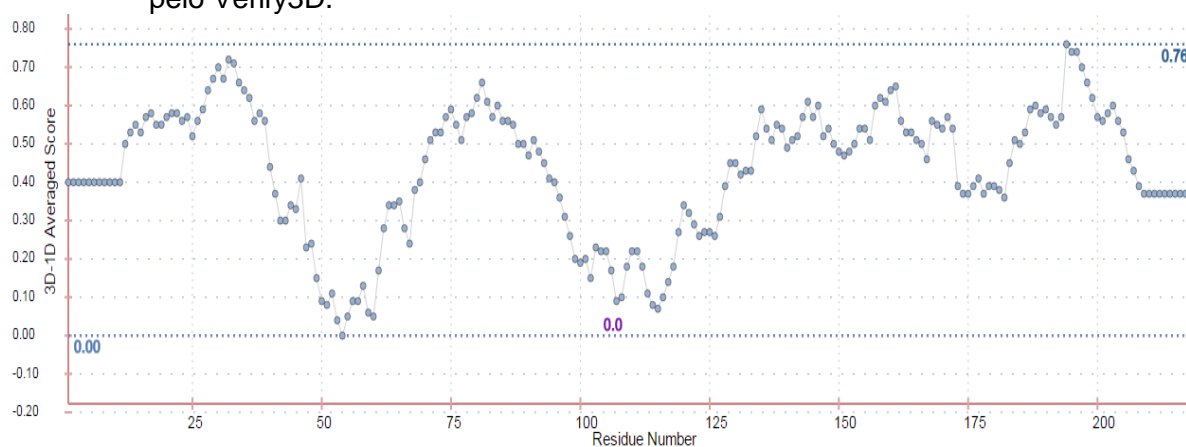
Figura 45 - Gráfico de *Z-score* e de energia gerados pelo software ProSA-web do modelo da enzima rCPB2.8 obtido por modelagem por homologia.



Fonte: Da autora.

Os resultados provenientes do programa Verify3D, ilustrados na Figura 46, demonstra que a maioria dos valores obtidos encontram-se dentro da faixa aceitável (0,16 e 0,8) e 88,13% dos resíduos possuem uma pontuação média 3D-1D maior que 0,2, um valor ao qual pode se adotar que o enovelamento estrutural do modelo construído é confiável.

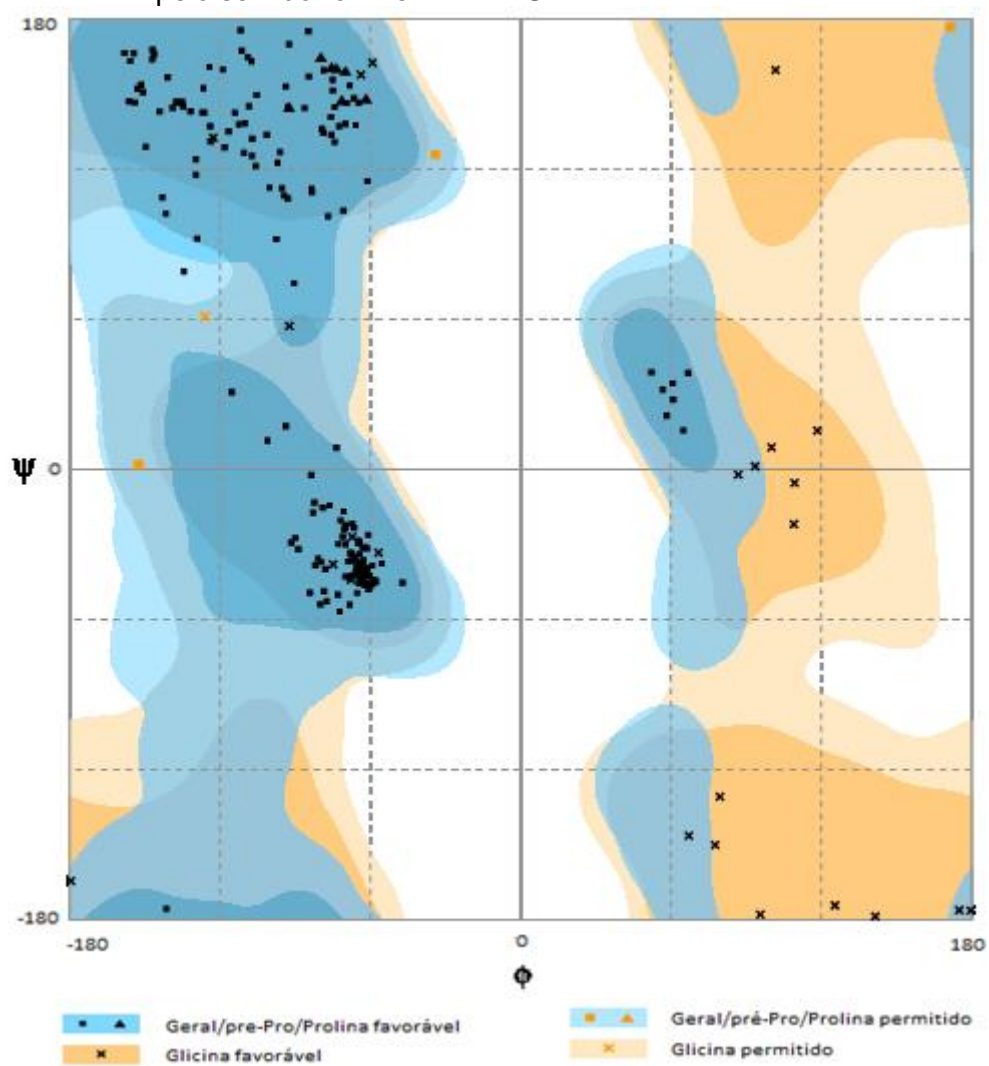
Figura 46 – Perfil 3D da sequência de aminoácidos do modelo da enzima rCPB2.8 obtida pelo Verify3D.



Fonte: Da autora.

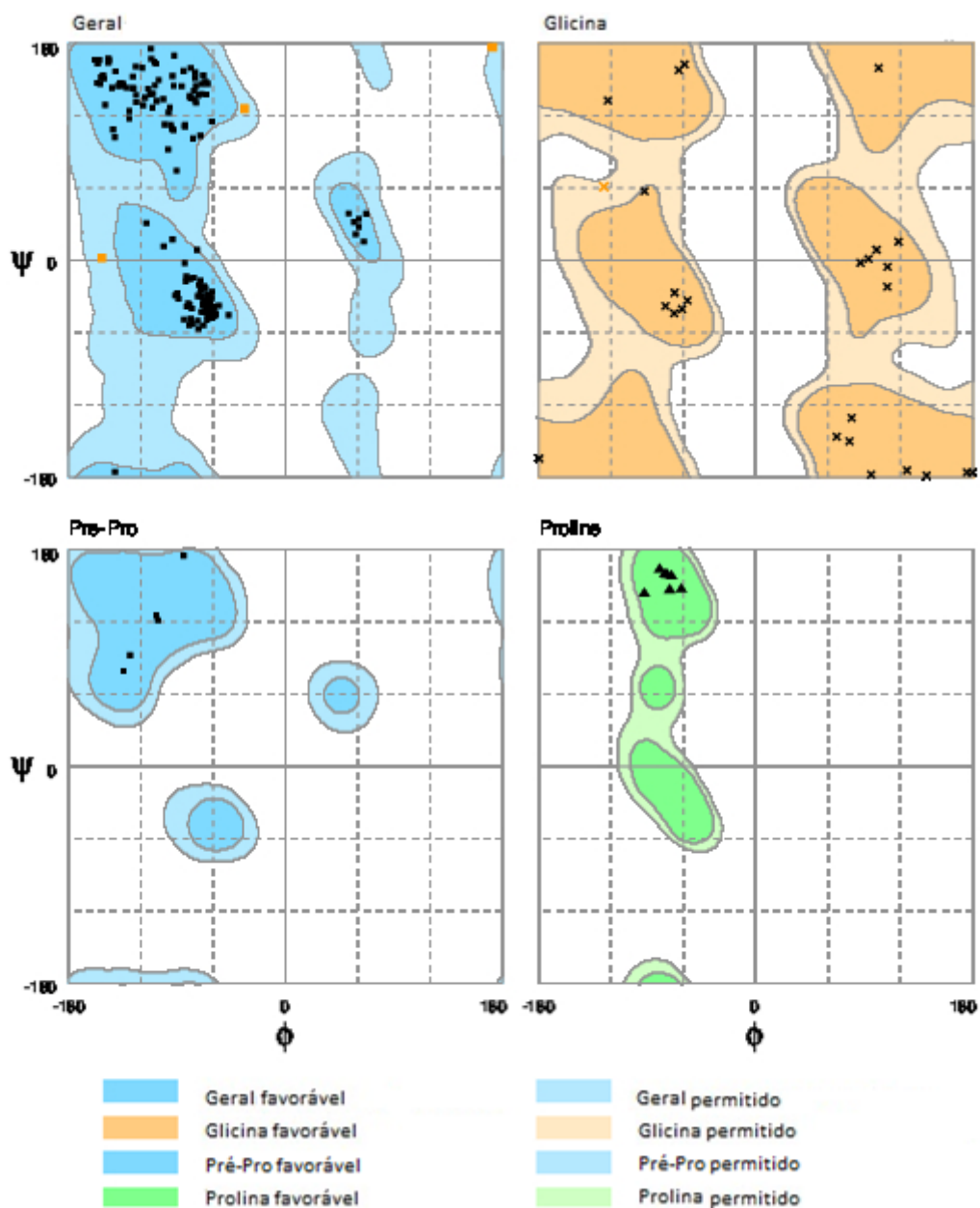
A validação da estrutura pela geometria do carbono alfa (LOVELL et al., 2003), de acordo com o gráfico de Ramachandran demonstrou 98,2% de seus resíduos nas regiões favoráveis, 1,8% em regiões permitidas e 0% em regiões desfavoráveis (FIGURA 47 e 48).

Figura 47 – Gráfico de Ramachandran Geral da enzima rCPB2.8 gerado pelo servidor online RAMPAGE.



Fonte: Da autora.

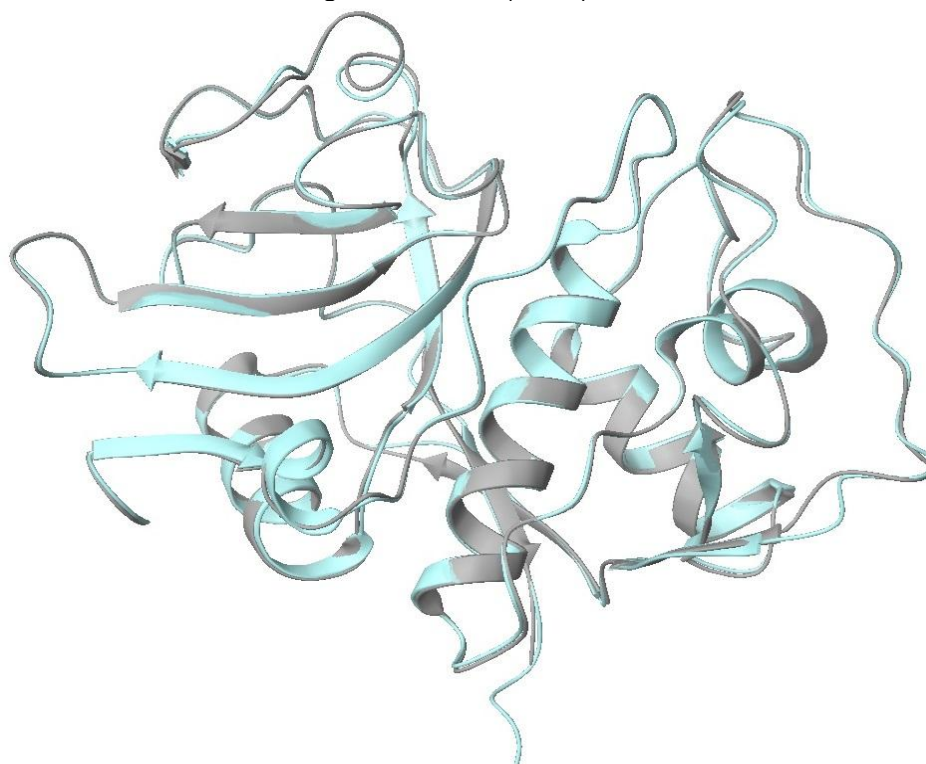
Figura 48 – Gráfico de Ramachandran com as regiões favoráveis, separadas por geral, região de Glicina, região de pré-Prolina e região de Prolina, da enzima rCPB2.8 gerado pelo servidor online RAMPAGE.



Fonte: Da autora.

Obteve-se um valor de RMSD de 0,326 Å para o alinhamento entre a estrutura tridimensional da enzima rCPB2.8 obtida por modelagem por homologia e a enzima cruzaina de código PDB 3IUT utilizada como modelo, demonstrado na Figura 49, apresentando baixa distorção entre os resíduos e valor abaixo de 2,0 Å, como é preconizado (CARUGO; PONGOR, 2001; YUSUF et al., 2008).

Figura 49 - Sobreposição das estruturas tridimensionais das proteínas rCPB2.8 (azul), obtida por modelagem por homologia, e cruzaina código PDB 3IUT (cinza), utilizada como modelo.



Fonte: Da autora.

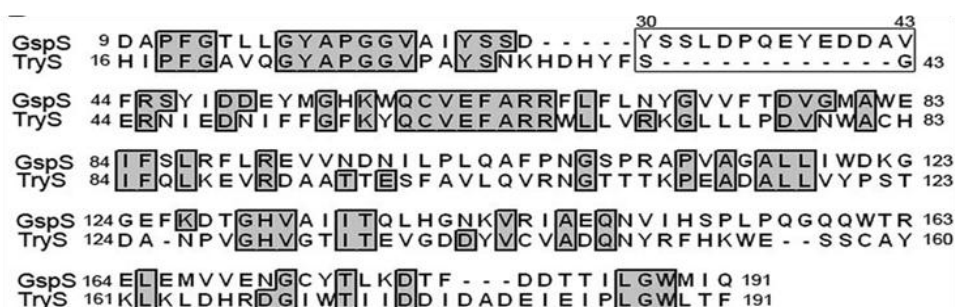
6.3.2 Validação da metodologia de ancoramento molecular

Para a validação dos protocolos de ancoramento molecular um valor de $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$ demonstra baixa distorção entre o composto inibidor ancorado aos resíduos de aminoácidos do sítio ativo, obtidos pelo reancoramento (*redocking*), e a estrutura cristalográfica modelo, e reproduz o modo de ligação proteína/inibidor (CARUGO; PONGOR, 2001; YUSUF et al., 2008). O reancoramento das enzimas estudadas apresentou resultados de RMSD satisfatórios, como é demonstrado a seguir, validando os métodos de ancoramento molecular utilizados.

Como modelo para a validação do protocolo de ancoramento molecular da enzima tripanotiona sintetase de *Leishmania*, foi utilizado a estrutura cristalográfica da proteína desta mesma classe encontrada na bactéria *Escherichia coli* (código PDB 3A2Y), que possui 32% de identidade com a enzima do parasito. A utilização da estrutura cristalográfica da enzima tripanotiona sintetase de *Leishmania* no processo de validação da metodologia de ancoramento é impossível, pois, embora esta estrutura cristalográfica esteja resolvida no banco de dados PDB, ela se

encontra na forma de uma apoproteína, no qual não há nenhuma substância química inibidora complexado à estrutura resolvida. Pai e colaboradores (2010) estudaram a tripanotona sintetase de *E. coli* e realizaram o alinhamento estrutural dos domínios amidase de *E. coli* e *L. major*, verificando que ao alinhar os 168 resíduos presentes nesta região o valor RMSD obtido foi de 1,5 Å, demonstrando baixas distorções destes resíduos, com valor abaixo do limite aceitável de 2 Å (CARUGO; PONGOR, 2001). A Figura 50 mostra o alinhamento desta região entre as enzimas tripanotona sintetase de *E. coli* e de *L. major*, onde é possível verificar os resíduos que se mantiveram conservados e identificar os resíduos importantes para a ligação do substrato.

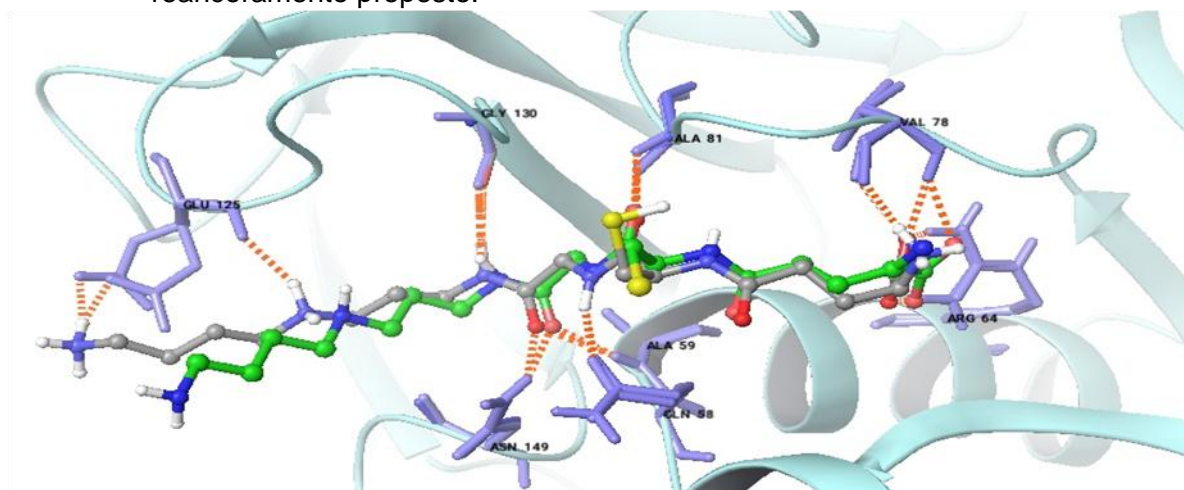
Figura 50 - Alinhamento estrutural do domínio da amidase da enzima tripanotona sintetase de *E. coli* (GspS) e de *L. major* (TryS). A caixa entre os resíduos 30 e 43 indica a região de hélice flexível que não é encontrada na estrutura de *L. major* e os resíduos conservados entre as estruturas estão destacados em cinza.



Fonte: PAI et al. (2010).

Assim foi possível realizar o reancoramento molecular utilizando a enzima de *Leishmania* com código PDB 2VPS e o ligante glutationilespermidina presente na estrutura cristalográfica com código PDB 3A2Y na região do sítio ativo onde se encontra os resíduos que se mantiveram conservados entre as enzimas de *Leishmania* e de *E. coli*, e que tiveram interação com o substrato (resíduos Q58, V78, G129 e N148). O reancoramento desta enzima apresentou um RMSD da região do sítio ativo final de 0,127 Å entre a estrutura com melhor posição de ancoragem obtida, utilizando o método proposto, e a estrutura cristalográfica, calculado pelo módulo *Align Bind Site* da plataforma Schrödinger. A Figura 51 mostra o complexo ligante e proteína utilizado no ensaio de reancoramento molecular alinhado à estrutura cristalográfica.

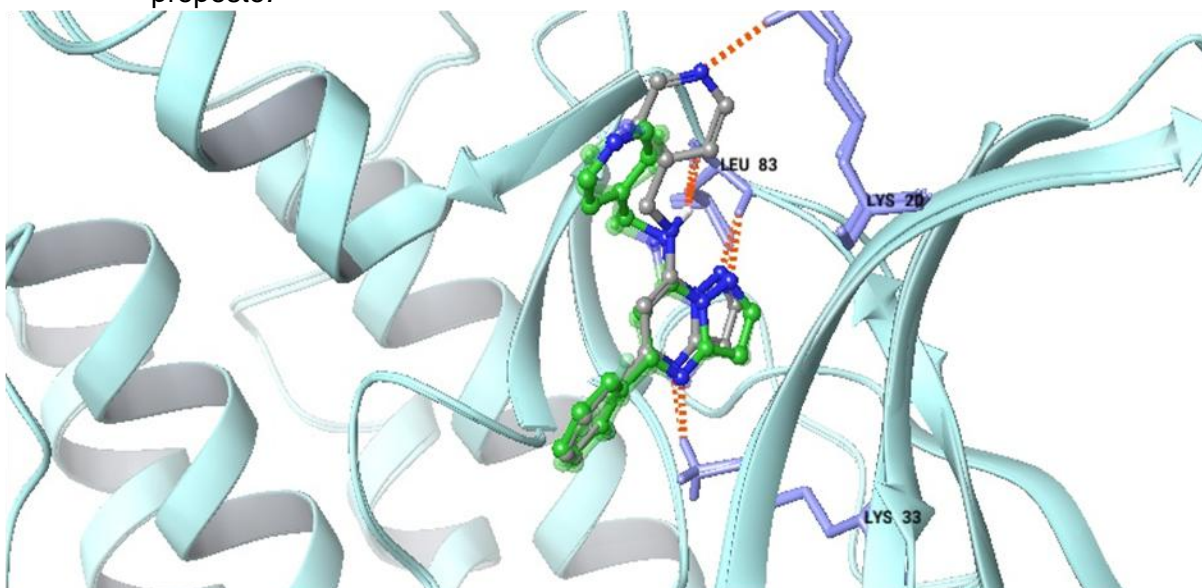
Figura 51 - Alinhamento entre a estrutura cristalográfica (ligante apresentado com carbonos na cor verde), código PDB 3A2Y, e o complexo ligante (glutationil espermidina, apresentado com carbonos na cor cinza) e proteína TS obtida pelo método de reancoramento proposto.



Fonte: Da autora.

Para a avaliação do método de ancoramento da enzima cinase dependente de ciclina 2 (CDC2) humana utilizou-se a estrutura cristalográfica com código PDB 2R3I e o ligante 5-(2-fluorofenil)-*N*-(piridin-4-ilmetil)pirazol[1,5-*a*]pirimidin-7-amina (PDB ID: SCF). O reancoramento utilizando o método proposto apresentou um RMSD final de 0,249 Å. A Figura 52 mostra o complexo ligante e proteína utilizado no ensaio de reancoramento molecular alinhado à estrutura cristalográfica.

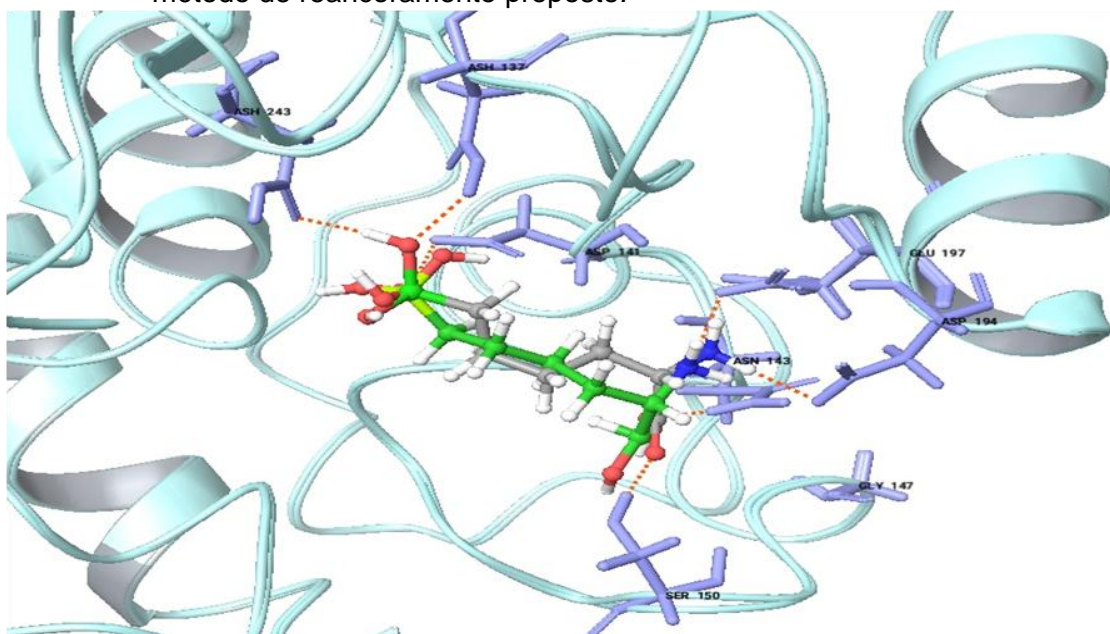
Figura 52 - Alinhamento entre a estrutura cristalográfica (ligante apresentado com carbonos na cor verde), código PDB 2R3I, e o complexo ligante (SCF, apresentado com carbonos na cor cinza) e proteína obtida pelo método de reancoramento proposto.



Fonte: Da autora.

Para a avaliação do método de ancoramento da enzima arginase utilizou-se a estrutura cristalográfica com código PDB 4IU0, enzima obtida da espécie *Leishmania mexicana*, e o ligante 2(S)-amino-6-ácido boronohexanóico (PDB ID: ABH). O reancoramento desta enzima apresentou um RMSD final de 0,238 Å entre a estrutura com melhor posição de ancoragem obtida e a estrutura cristalográfica. A Figura 53 mostra o complexo ligante e proteína utilizado no ensaio de reancoramento molecular alinhado à estrutura cristalográfica.

Figura 53 - Alinhamento entre a estrutura cristalográfica (ligante apresentado com carbonos na cor verde), código PDB 4IU0, e o complexo ligante (ABH, apresentado com carbonos na cor cinza) e proteína arginase obtida pelo método de reancoramento proposto.



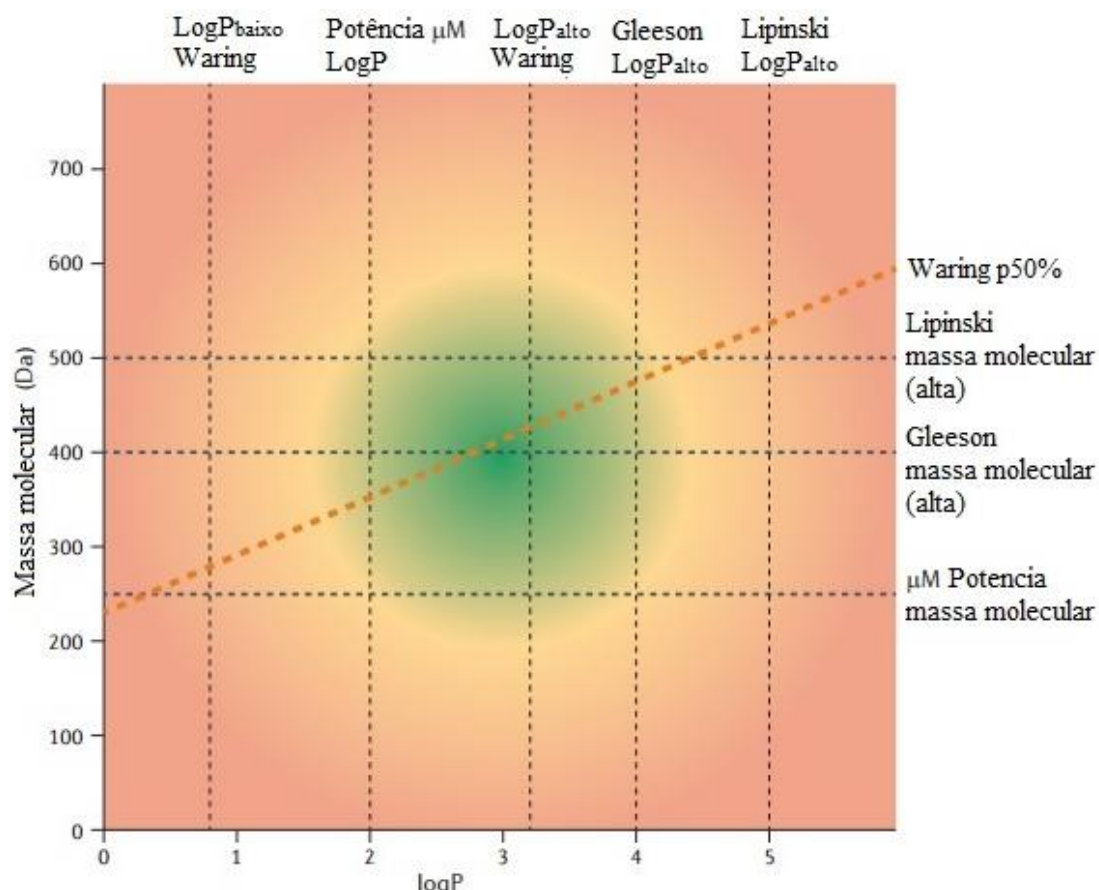
Fonte: Da autora.

6.3.3 Análise dos ligantes

A análise das propriedades físico-químicas das moléculas da série proposta tem o objetivo de prever os processos farmacocinéticos envolvidos na administração destas pela via oral, estimando a solubilidade e a permeabilidade em membranas pela comparação de propriedades de fármacos já conhecidos. Estudos sugerem que compostos que apresentem $\text{LogP} < 4$ e massa molecular < 400 Da apresentam propriedades ADMET mais favorável de acordo com a regra de 4/400 de GlaxoSmithKline e a potência na escala micromolar é obtida em compostos que apresentem massa molecular > 250 Da e $\text{logP} > 2$ de acordo com um levantamento

realizado em mais de 200.000 compostos disponíveis no banco de dados ChEMBL (HANN; KESERÜ, 2012). A faixa desejável de logP e massa molecular de acordo com as regras de Waring, Gleeson e Lipinski estão ilustradas na Figura 54.

Figura 54 – Gráfico indicando valores de logP e massa molecular ideais (verde), valores limites (laranja) e a linha de 50% de probabilidade de permeabilidade celular, de acordo com as regras de Waring, Gleeson e Lipinski.



Fonte: HANN; KESERÜ (2012).

Os ligantes utilizados no presente estudo apresentaram um bom percentual de absorção oral teórico em humanos, como mostrado na Tabela 7, obtidos pela simulação computacional. Nenhuma molécula violou os parâmetros utilizados na regra de Lipinski, mostrando que os possíveis fármacos a serem obtidos desta série podem apresentar bons fatores farmacocinéticos.

Tabela 7 - Propriedades físico-químicas das moléculas estudados.

Molécula	Substituinte	Peso Molecular (Da)	Doador de ligação de hidrogênio	Aceptor de ligação de hidrogênio	Log P (octanol /água)	Absorção Oral (%)
SBM2	H	367,444	0	6,95	3,274	100
SBM3	NO ₂	412,441	0	7,95	2,531	80,7
SBM4	CH ₃	381,471	0	6,95	3,609	100
SBM5	OCH ₃	397,470	0	7,70	3,425	100
SBM8	Br	446,340	0	6,95	3,867	100
SBM9	CF ₃	435,442	0	6,95	4,292	100
SBM10	<i>terc</i> -butil	423,551	0	6,95	4,686	100
SBM11	F	385,434	0	6,95	3,532	100
SBM13	NH ₂	382,458	1,5	7,95	2,803	90,3

Fonte: Da autora.

Os compostos **SBM9** [CF₃] e **SBM10** [*terc*-butil] apresentaram massa molecular >400 Da e logP >4, fator que pode explicar a ausência de atividade leishmanicida destes compostos apresentados pelo teste *in vitro* antipromastigota. O caráter lipofílico de uma molécula e o baixo peso molecular são essenciais para a sua permeabilidade em membranas nos organismos, possibilitando que o composto chegue ao seu local de ação; entretanto a alta lipofilicidade faz com que estas moléculas sejam poucos solúveis nos fluídos biológicos, deixando-as aprisionadas em membranas e outros compartimentos lipofílicos, além de interferir na solubilidade dos compostos durante os ensaios de atividade *in vitro*, já que estes são realizados em meio aquoso (HANN; KESERÜ, 2012).

6.3.4 Ancoramento molecular utilizando a proteína arginase

Nos estudos de ancoramento molecular utilizando a enzima arginase, todas as moléculas que compõem a série, listadas na Tabela 8, apresentaram valores de *GlideScore* maiores que aqueles observados para o fármaco Pentamidina e inibidor ABH presente na forma cocrystalizada com a enzima arginase em estrutura cristalográfica de código PDB 4IU0. Este resultado demonstra menor afinidade entre os compostos da série e a enzima arginase, quando comparado à sua afinidade com o inibidor ABH e a Pentamidina. O maior número de interações de ligação de

hidrogênio entre o ligante ABH e a enzima pode ser o responsável pelo alto grau de afinidade entre eles no estudo *in silico*, representada pelo baixo valor de *GlideScore*. Os resíduos de aminoácidos do sítio ativo importantes para a ligação da enzima arginase a seu substrato natural (ASP141, ASN143, SER150, ASP194) participam também da interação entre a enzima e o ligante ABH e entre a enzima e os compostos da série, como é verificado na Tabela 8.

A Tabela 8 lista os valores de *GlideScore* das moléculas em ordem das melhores colocadas obtidos pelo estudo de ancoramento molecular utilizando a proteína arginase de *Leishmania*.

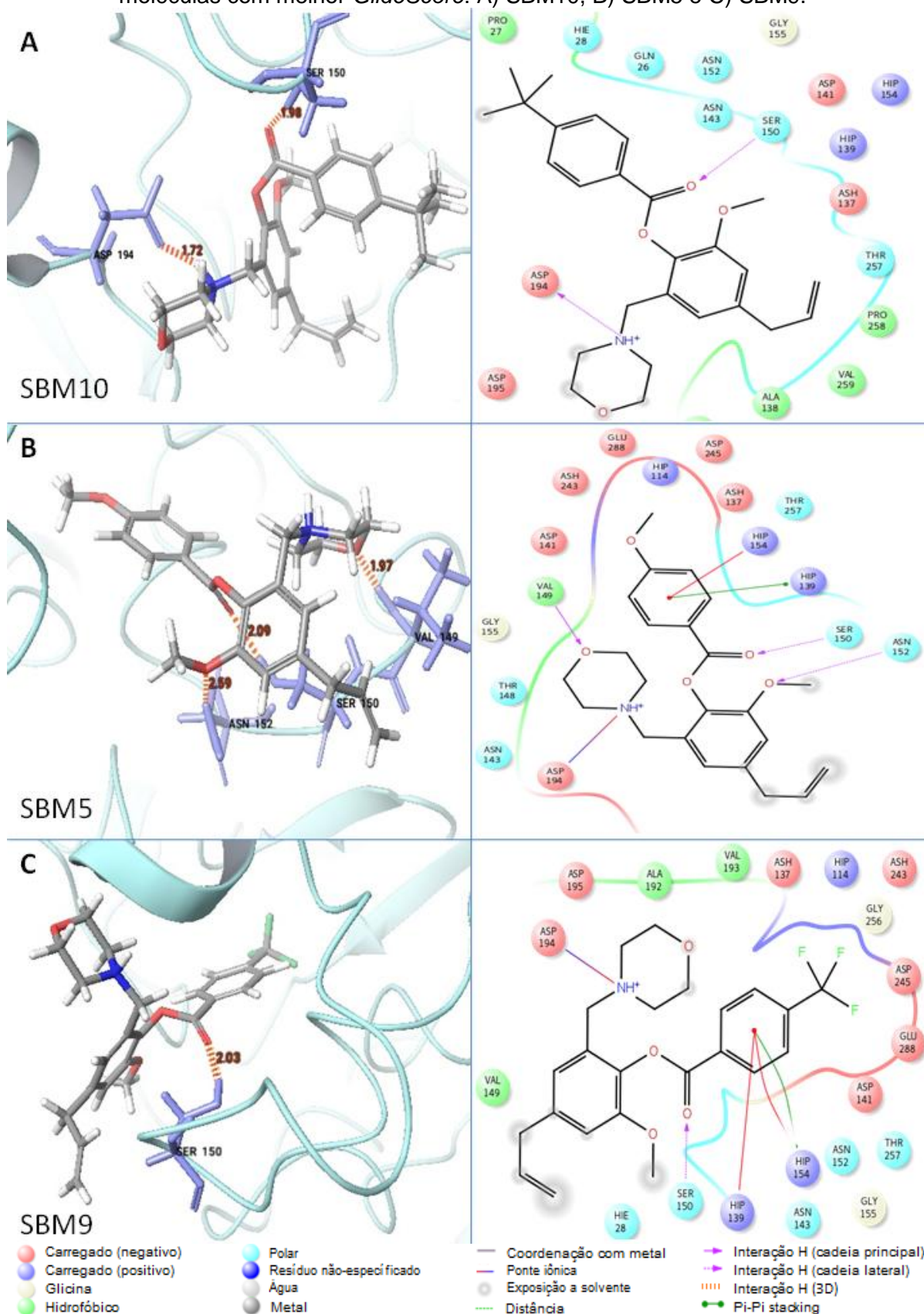
Tabela 8 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (*GlideScore*), em ordem decrescente, entre as moléculas da série proposta e a enzima arginase, o número de interações de hidrogênio e os resíduos que participam desta interação, boas interações de van der Waals, interações π -stacking e cátion- π .

Ligante	<i>GlideScore</i> (Kcal. mol ⁻¹)	Interação de hidrogênio	Resíduos de AA que fazem interação de H	Boas interações de vDW	Interação π Stacking	Interação cátion π
Pentam.	-7,048	6	ASP141, ASP194, GLU196, GLU197	186	0	1
ABH	-6,810	8	ASP137, ASP141, ASN143, SER150, ASP194, GLU197, ASP243, THR257	228	0	0
SBM10	-5,293	2	SER150, ASP194	311	0	0
SBM5	-5,278	3	VAL149, SER150, ASN152	299	1	1
SBM9	-5,188	1	SER150	289	1	2
SBM13	-4,840	3	SER150, ASP194, ASP245	255	2	1
SBM4	-4,788	2	HIS139, ASN152	280	0	0
SBM2	-4,467	0	-	308	0	1
SBM3	-4,386	3	ASH137, SER150, ASP194	270	1	1
SBM11	-4,214	1	SER150	310	1	0
SBM8	-3,650	2	ASN143, ASP194	267	1	1

Fonte: Da autora.

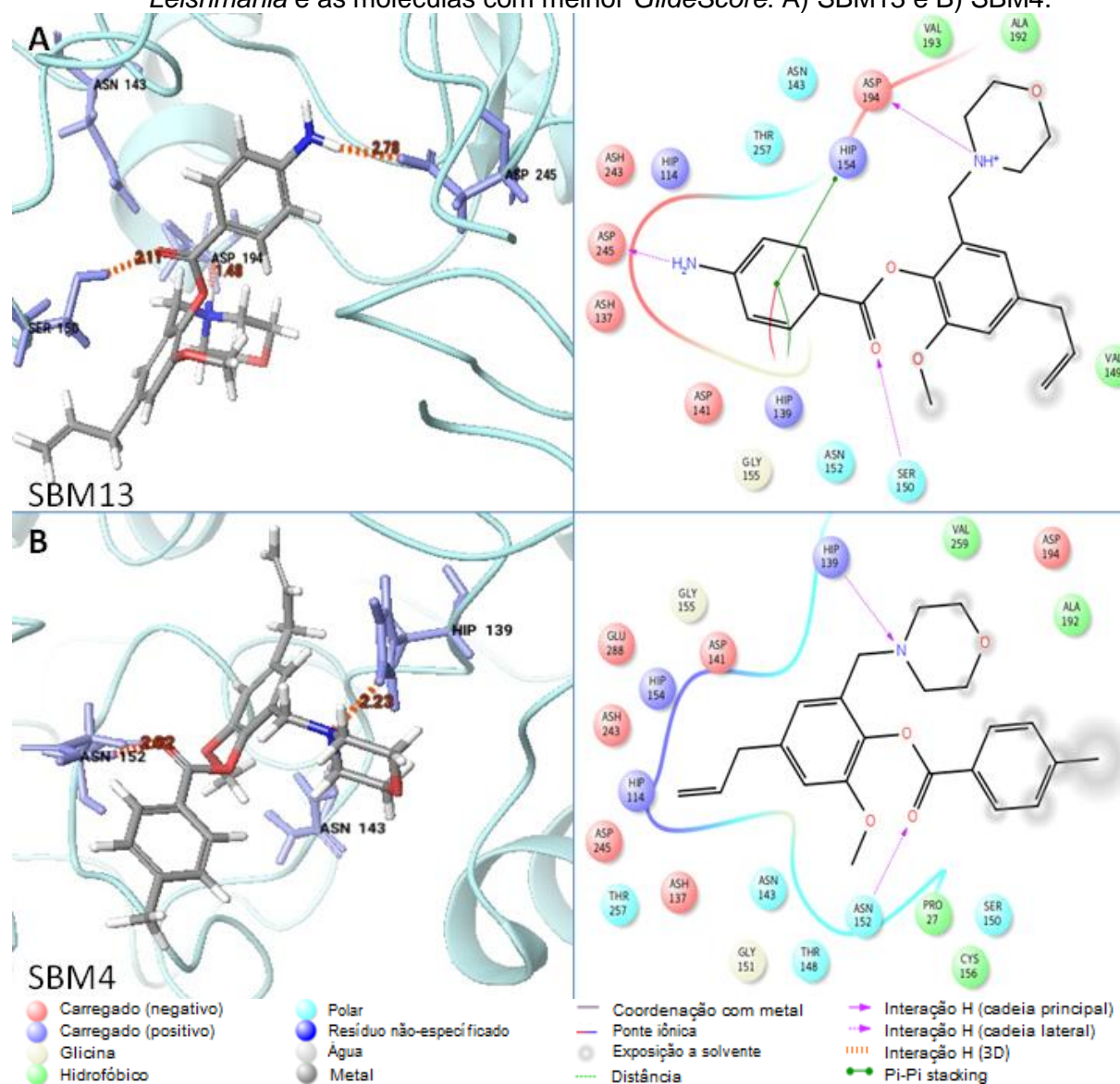
As Figuras 55 e 56 apresentam os resíduos envolvidos nas interações de hidrogênio em cada ancoramento molecular observadas entre a enzima arginase e os 5 melhores ligantes.

Figura 55 - Estrutura 3D representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima arginase de *Leishmania* e as moléculas com melhor *GlideScore*: A) SBM10, B) SBM5 e C) SBM9.



Fonte: Da autora.

Figura 56 - Estrutura 3D representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada de cor laranja), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima arginase de *Leishmania* e as moléculas com melhor *GlideScore*: A) SBM13 e B) SBM4.



Fonte: Da autora.

Os grupamentos carbonila e o anel morfolínico caracterizam-se como grupos farmacofóricos das moléculas desta série, essenciais para a interação entre os compostos e a enzima arginase. As melhores poses demonstradas pelos ligantes **SBM10** [*tert*-butil], **SBM5** [OCH₃], **SBM9** [CF₃] e **SBM13** [NH₂] mantiveram o perfil de interação entre o grupo carbonila dos ligantes e o resíduo de serina SER150 (aminoácido com cadeia lateral polar não-carregada) da enzima arginase, devido a presença de uma hidroxila doadora de ligação de hidrogênio deste aminoácido. O átomo de nitrogênio do grupo morfolina na sua forma ionizada apresentou um perfil

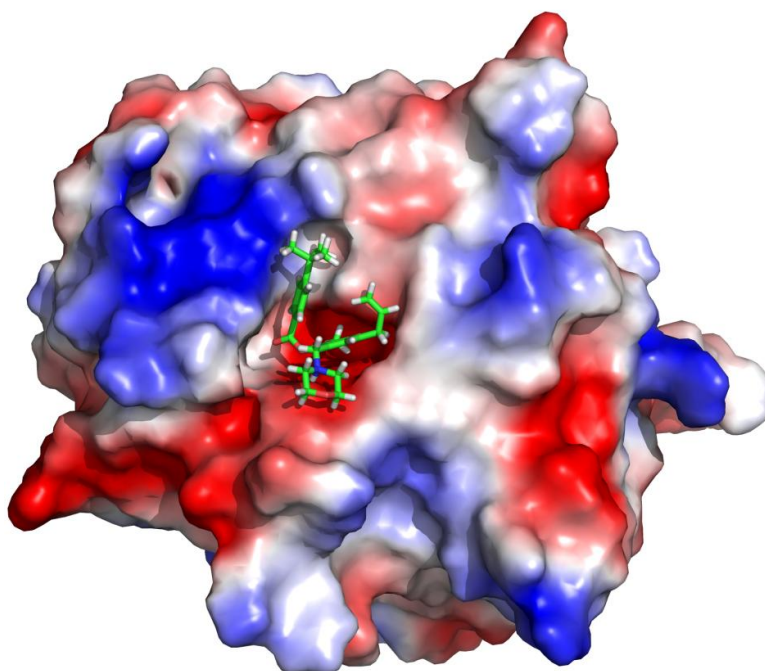
de interação iônica ou doadora de ligação de hidrogênio pelos estudos *in silico* com o resíduo ASP194 (aminoácido com cadeia lateral carregado negativamente).

Os resíduos HIS139 e HIS154 (aminoácido com cadeia lateral carregado positivamente) apresentaram interações do tipo π *stacking* e cátion- π com o anel aromático *para*-dissubstituído dos ligantes **SBM5** [OCH₃], **SBM9** [CF₃] e **SBM13** [NH₂], porém este padrão de interação não foi verificado para todos os compostos da série.

De acordo com os valores de *GlideScore* obtidos, a presença de um grupamento volumoso doador de elétrons no anel aromático *para*-dissubstituído resultou na melhora do perfil de interação entre a arginase e os compostos, conferindo às moléculas **SBM10** [*tert*-butil] e **SBM5** [OCH₃] um menor valor de *GlideScore*. Este resultado não refletiu o perfil de interação obtido pelos compostos nos estudos *in vitro* já que o composto **SBM10** [*tert*-butil] não apresentou atividade leishmanicida, e o composto com menor afinidade pela enzima **SBM8** [Br] apresentou atividade *in vitro*, sugerindo que o principal mecanismo de ação dos compostos da série não está relacionado com a inibição da enzima arginase.

A Figura 57 ilustra a superfície da enzima arginase ligada ao composto **SBM10** demonstrando a fenda em que se encontra o sítio ativo, na qual o ligante se encontra inserido, constituída em sua maior parte de um potencial negativo na região de interação com este ligante.

Figura 57 – Potencial de superfície eletrostática da enzima arginase ligada ao composto SBM10 (escala de -70,232 [negativo, vermelho] a 70,232 [positivo, azul])



Fonte: Da autora.

6.3.5 Ancoramento molecular utilizando a proteína tripanotiona sintetase

O fármaco Pentamidina e o inibidor glutationil espermidina presente na estrutura cristalográfica cocrystalizado com a enzima tripanotiona sintetase de *E. coli* (código PDB: 3A2Y), apresentaram valores de *GlideScore* significativamente melhores que aqueles verificados para as moléculas da série de ésteres de base de Mannich, listadas na Tabela 9, apresentando afinidade superior com a enzima. O maior número de interações de hidrogênio pode ser responsável pela melhor interação entre a enzima e a Pentamidina ou a glutationil espermidina.

A Tabela 9 lista os valores de *GlideScore* observados no estudo de ancoramento molecular utilizando a proteína tripanotiona sintetase de *Leishmania*.

Tabela 9 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (*GlideScore*), em ordem decrescente, entre as moléculas da série proposta e a enzima tripanotiona sintetase, o número de interações de hidrogênio e os resíduos que participam desta interação, boas interações de van der Waals, interações cátion- π e π -stacking.

Ligante	<i>GlideScore</i> (Kcal.mol ⁻¹)	Interação de hidrogênio	Resíduos de AA que fazem interação de H	Boas interações de vDW	Interação π Stacking	Interação cátion π
Glutatio- nil esper- midina	-10,428	8	PHE52, ASP77, ALA81, ASN126, GLY129, ASN148, ASP178, GLU652	479	0	3
Penta- midina	-10,311	5	ASP38, ASN79, ALA81, ASP178, GLU652	414	0	1
SBM4	-7,974	0	-	375	2	0
SBM10	-7,573	2	HIS39	405	0	1
SBM3	-7,122	1	HIS39	430	2	1
SBM9	-6,765	1	HIS39	345	1	1
SBM2	-6,552	2	HIS39, GLU183	344	1	0
SBM13	-6,516	1	GLY129	311	1	1
SBM8	-6,473	0	-	337	2	0
SBM5	-6,380	1	GLU183	290	1	0
SBM11	-6,320	1	ASP178	303	1	1

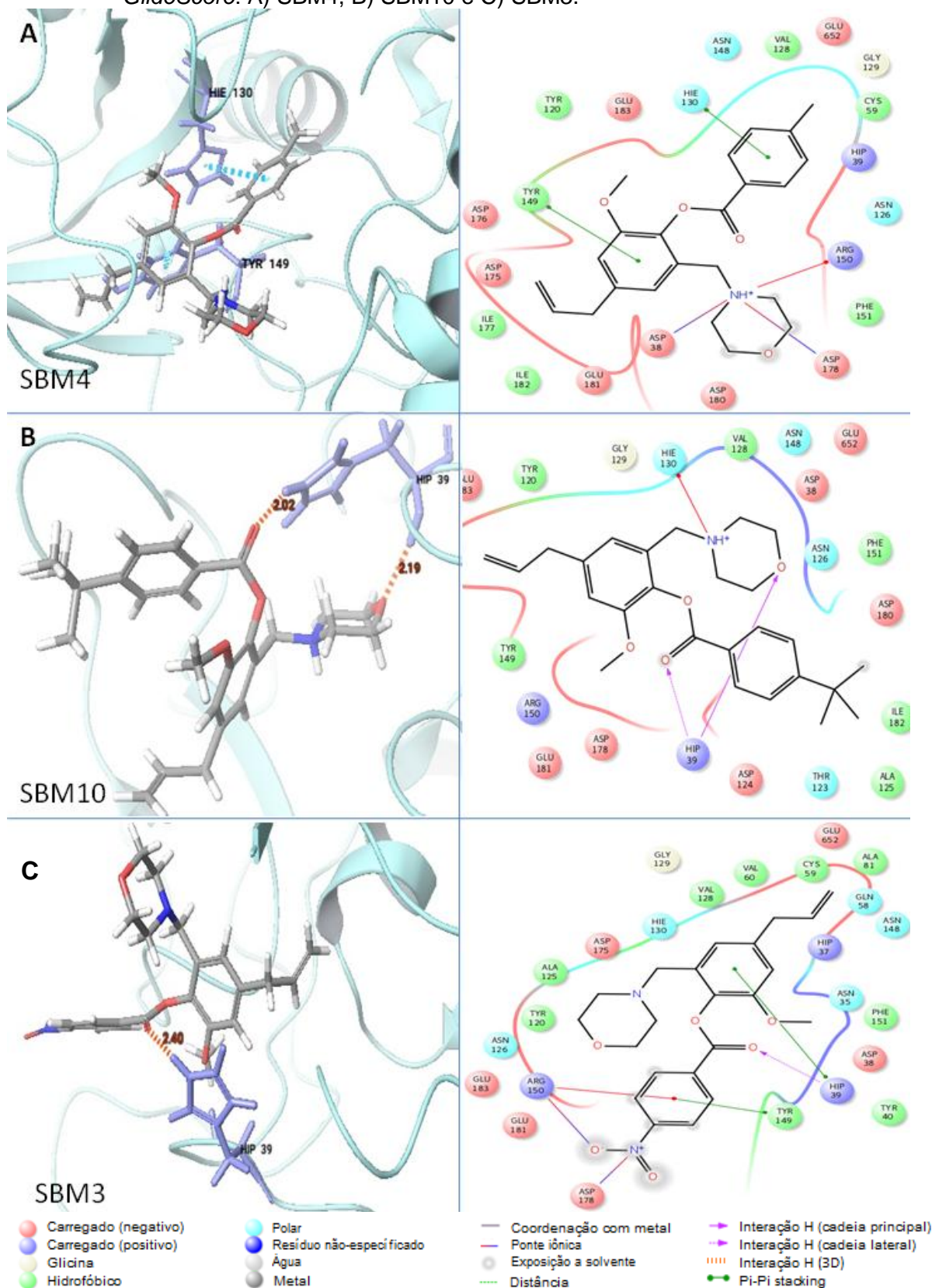
Fonte: Da autora.

O grupamento carbonila do éster é essencial para a interação entre os compostos e a enzima tripanotiona sintetase por interagir com a HIS39, aminoácido com cadeia lateral carregado positivamente. Este perfil de interação foi verificado para os compostos **SBM2** [H], **SBM3** [NO₂], **SBM9** [CF₃] e **SBM10** [*terc*-butil].

A presença dos grupamentos metila, *terc*-butila, nitro e trifluorometil como substituintes no anel *para*-dissubstituído conferiu maior afinidade à série de compostos diante dos estudos *in silico* com a enzima tripanotiona sintetase, porém este perfil não foi verificado nos testes *in vitro*, já que os compostos **SBM10** [*terc*-butil] e **SBM9** [CF₃] não apresentaram atividade leishmanicida e o composto **SBM3** apresentou atividade leishmanicida *in vitro* inferior a outros compostos.

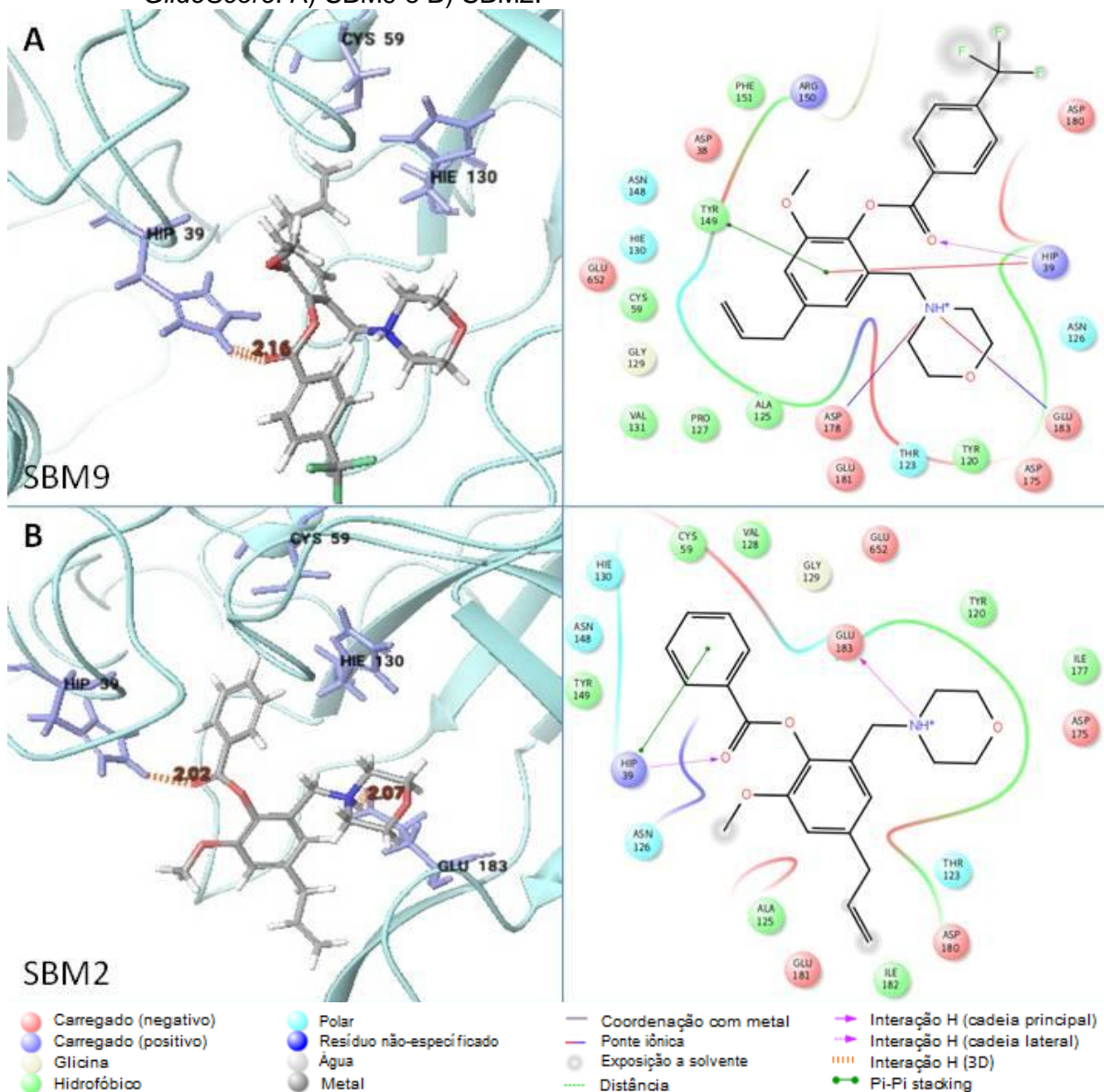
As Figuras 58 e 59 demonstram as interações e os resíduos envolvidos em cada ancoramento molecular observado entre a enzima tripanotiona sintetase e os 5 ligantes com melhor resultado de *GlideScore*.

Figura 58 - Estrutura tridimensional representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada de cor laranja), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima tripanotona sintetase e as moléculas com melhor *GlideScore*: A) SBM4, B) SBM10 e C) SBM3.



Fonte: Da autora.

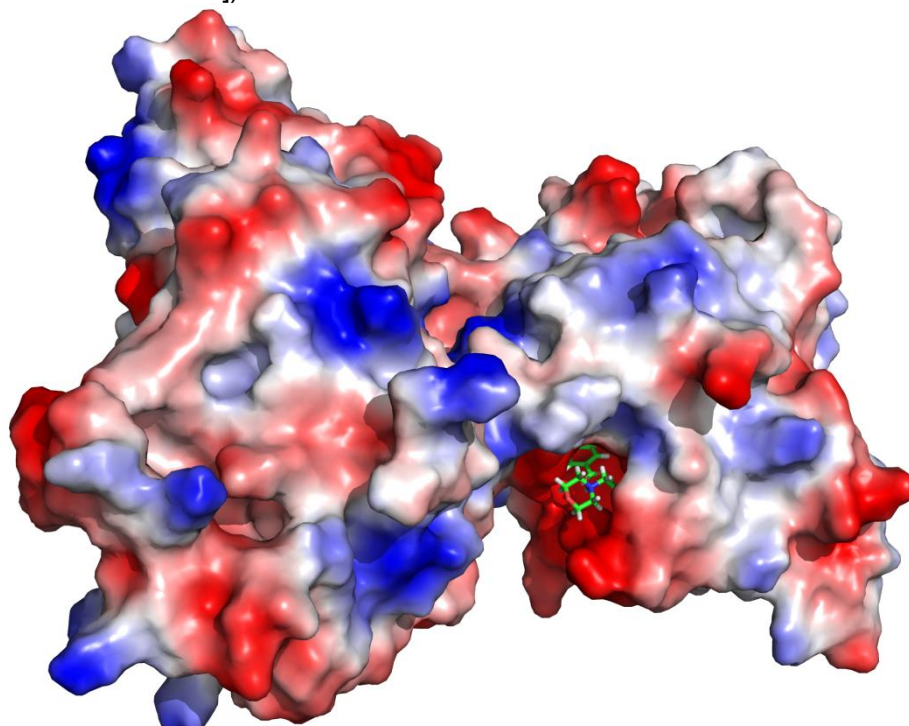
Figura 59 - Estrutura tridimensional representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada de cor laranja), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima tripanotona sintetase e as moléculas com melhor *GlideScore*: A) SBM9 e B) SBM2.



Fonte: Da autora.

A Figura 60 ilustra a superfície da enzima tripanotona sintetase ligada ao composto **SBM4** demonstrando a fenda em que se encontra o sítio ativo. O ligante se encontra ancorado completamente na fenda, possibilitando uma maior interação entre o ligante e o receptor, constituída em sua maior parte de um potencial negativo na região de interação com este ligante.

Figura 60 – Potencial de superfície eletrostática da enzima tripanotona sintetase ligada ao composto SBM4 (escala de -70,232 [negativo, vermelho] a 70,232 [positivo, azul]).



Fonte: Da autora.

6.3.6 Ancoramento molecular utilizando a proteína cisteíno protease (rCPB2.8)

O inibidor Morpholino-Leu-homoPhe-FMK (1EWP_015), presente na estrutura cristalográfica da enzima cruzaina (código PDB 1EWP) apresentou valor de energia de interação com enzima rCPB2.8 melhor do que os valores observados com os compostos da série de ésteres de base de Mannich, listadas na Tabela 10, mas bem próximo do valor de interação com o composto **SBM13** [NH₂].

A Tabela 10 lista os valores de *GlideScore* obtidos no estudo de ancoramento molecular utilizando a proteína rCPB2.8 de *Leishmania*.

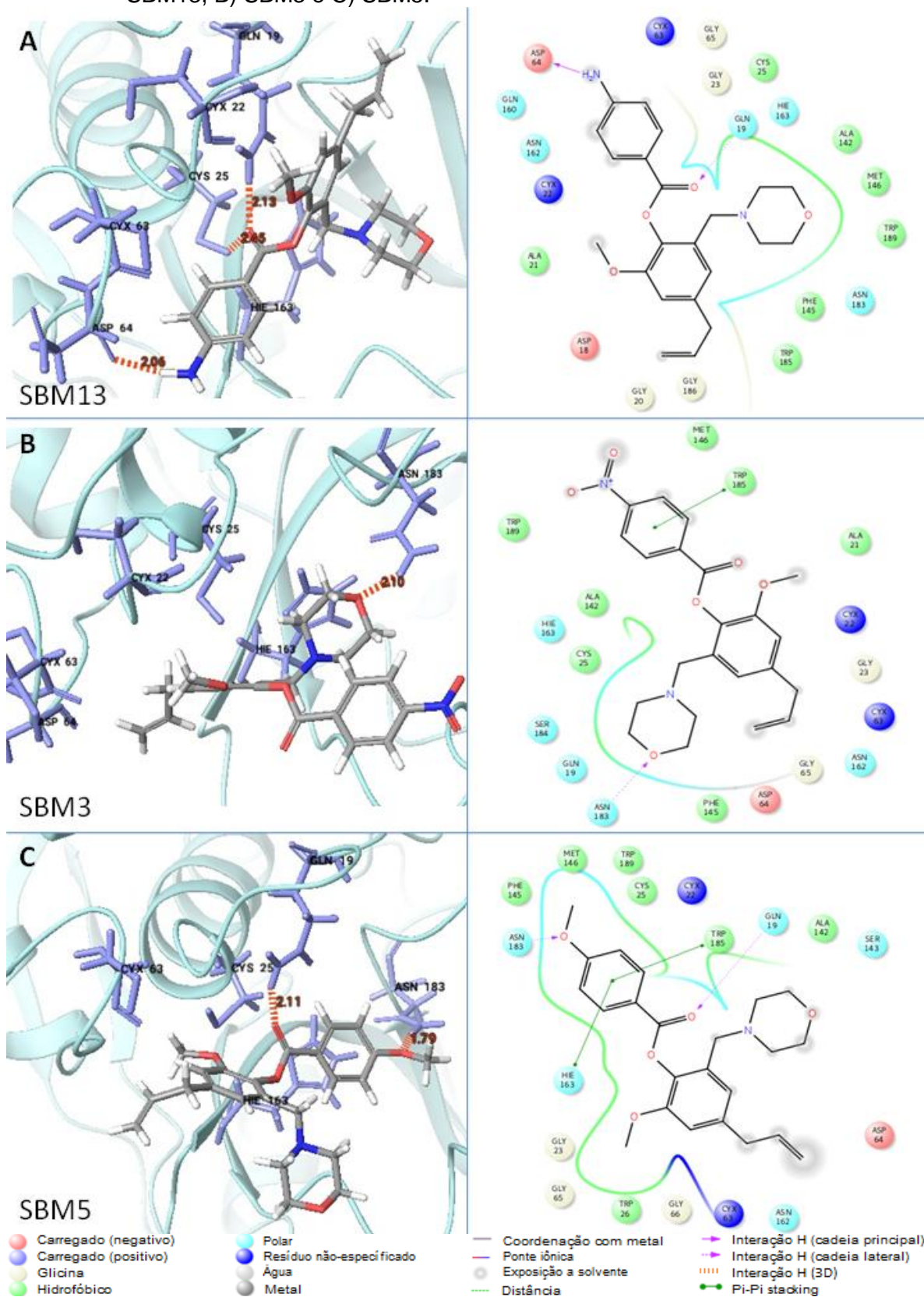
Tabela 10 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (*GlideScore*), em ordem decrescente, entre as moléculas da série proposta e a enzima rCPB2.8, o número de interações de hidrogênio e os resíduos que participam desta interação, boas interações de van der Waals, interações cátion- π e π -stacking.

Ligante	<i>Glide Score</i> (Kcal. mol ⁻¹)	Interação de hidrogênio	Resíduos de AA que fazem interação de H	Boas interações de vDW	Interação π Stacking	Interação cátion π
1EWP_015	-6,727	3	ASP64, GLY66, LEU161	297	0	0
SBM 13	-6,248	3	GLN19, ASP64, CYS25	297	0	0
Pentamidina	-6,128	4	MET59, ASP61, ASP64	208	0	0
SBM 3	-5,967	1	ASN183	263	1	0
SBM 5	-5,780	2	GLN19, ASN183	330	2	0
SBM 11	-5,643	0	-	245	2	0
SBM 4	-5,634	2	GLN19, ASN183	253	0	0
SBM 10	-5,618	1	GLN19	317	1	0
SBM 2	-5,234	0	-	315	0	0
SBM 9	-4,759	1	GLN160	271	0	0
SBM 8	-4,109	1	GLN70	223	0	0

Fonte: Da autora.

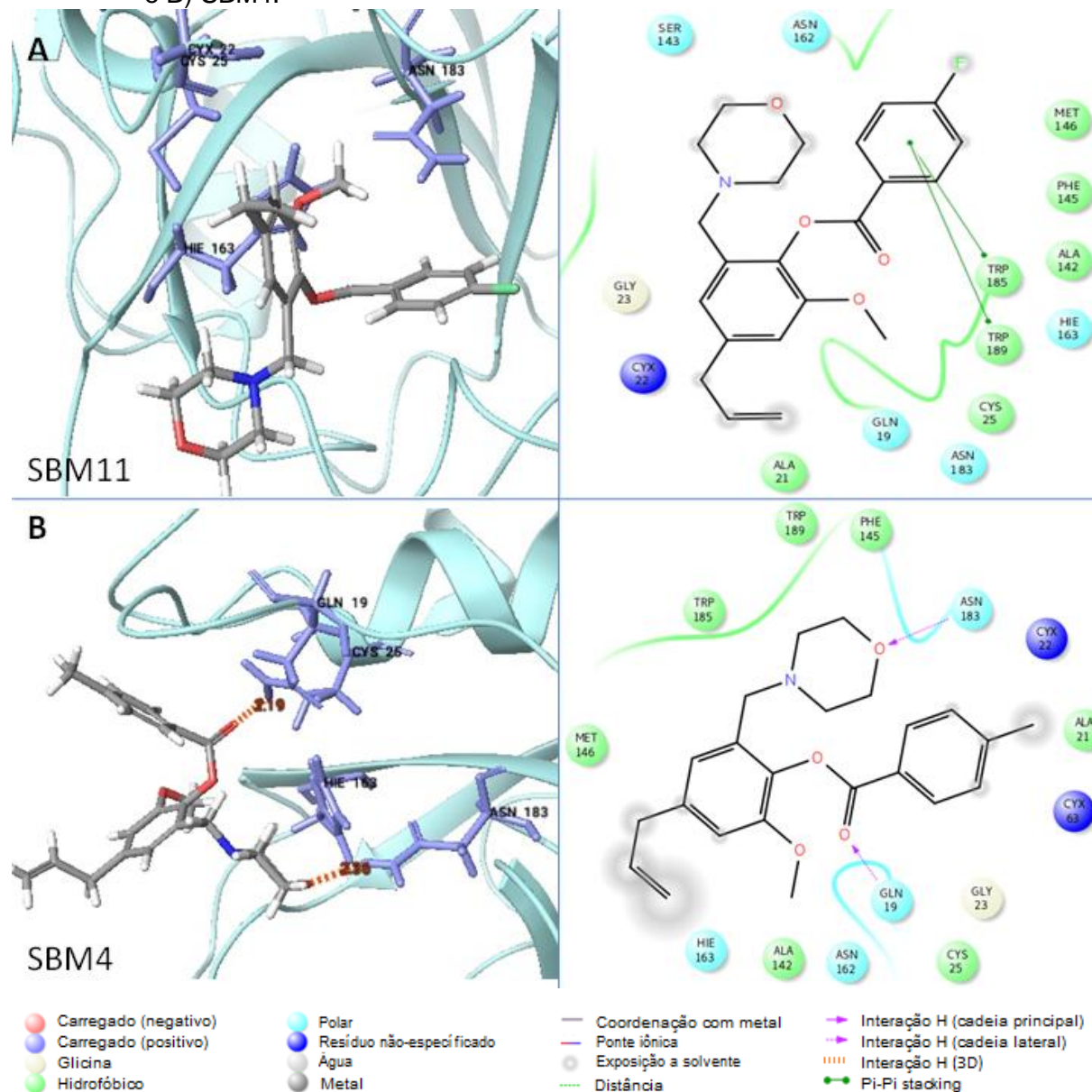
As Figuras 61 e 62 demonstram as interações e os resíduos envolvidos em cada ancoramento molecular obtido entre a rCPB2.8 e os 5 ligantes com melhor resultado de *GlideScore*.

Figura 61 - Estrutura tridimensional representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada de cor laranja), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima rCPB2.8 e as moléculas com melhor *GlideScore*: A) SBM13, B) SBM3 e C) SBM5.



Fonte: Da autora.

Figura 62 - Estrutura tridimensional representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada de cor laranja), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima rCPB2.8 e as moléculas com melhor *GlideScore*: A) SBM11 e B) SBM4.



Fonte: Da autora.

O grupamento carbonila dos compostos **SBM4** [CH_3], **SMB5** [OCH_3] e **SBM13** [NH_2] manteve um perfil de interação com o resíduo de GLN19, aminoácido com cadeia lateral polar não carregado contendo um grupamento amida, atuando como um grupamento receptor de interação de hidrogênio.

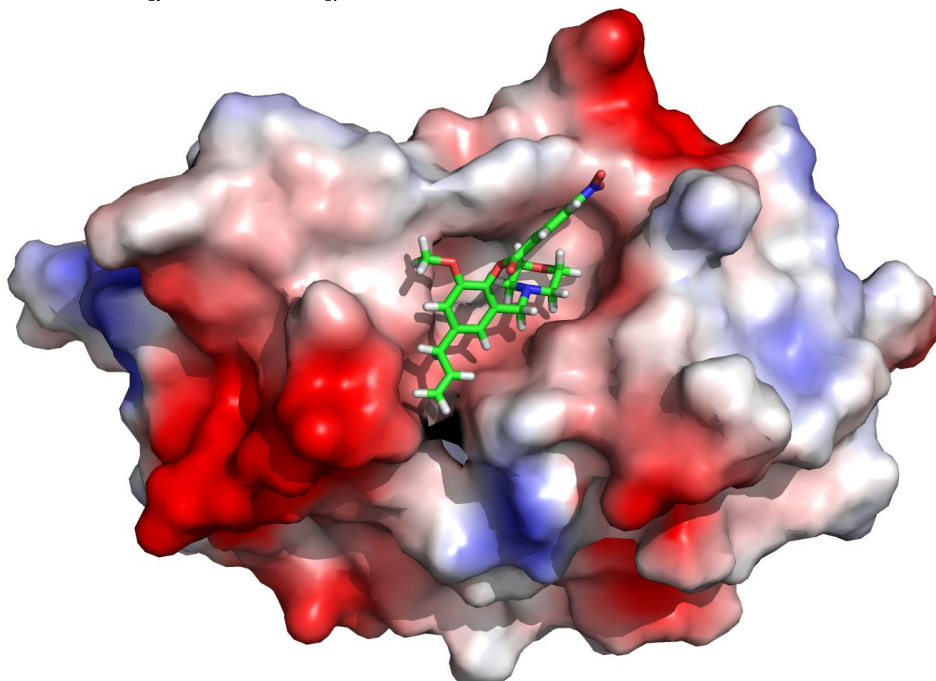
Os 4 compostos que apresentaram melhores valores de *GlideScore* possuem também atividade inibitória sobre a enzima rCPB2.8 *in vitro*, porém com magnitude diferente entre elas, com inibição de 2,1% para o composto **SBM13**, 88,2% para o

composto **SBM3**, 7,2% para o composto **SBM5** e 28,3% para o composto **SBM11**. Os compostos **SBM3** [NO₂] e **SBM11** [F] apresentaram atividade mais expressivas *in vitro*, inibindo 88,24 e 28,25% da atividade enzimática na concentração de 100 µM, respectivamente. Estes compostos se caracterizam por possuírem grupamentos eletronegativos, retiradores de elétrons do anel aromático, possibilitando a interação π *stacking* entre este anel aromático e o anel aromático rico em elétrons do TRP185.

A interação demonstrada pelo estudo de ancoramento do tipo ligação de hidrogênio entre o oxigênio do anel morfolínico do composto **SBM3** [NO₂] com o grupamento amida do aminoácido asparagina ASN183, pertencente à tríade catalítica da enzima rCPB2.8, pode ter sido essencial para a atividade inibitória deste composto demonstrada em estudos *in vitro*. Outros fatores que não são previstos pelo estudo de ancoramento molecular podem ter contribuído para a maior afinidade entre o composto **SBM3** e a enzima rCPB2.8 resultando em uma atividade inibitória expressiva sobre a enzima, entre eles a interação do nitrogênio com carga formal positiva do grupamento nitro com o aminoácido glutamato (GLU205) altamente flexível, capaz de se orientar no interior ou fora do subsítio S2, quando favorável. Outro fator que não é previsto pelos estudos de ancoramento molecular é a formação de ligações covalentes que podem ocorrer entre a enzima e o composto inibidor.

A Figura 63 ilustra a superfície da enzima rCPB2.8 ligada ao composto **SBM3** apresentando a fenda em que se encontra o sítio ativo, na qual a molécula está ancorada, constituída em sua maior parte de um potencial negativo na região de interação com este ligante.

Figura 63 – Potencial de superfície eletrostática da enzima rCPB2.8 ligada ao composto SBM3 (escala de -70,232 [negativo, vermelho] a 70,232 [positivo, azul]).

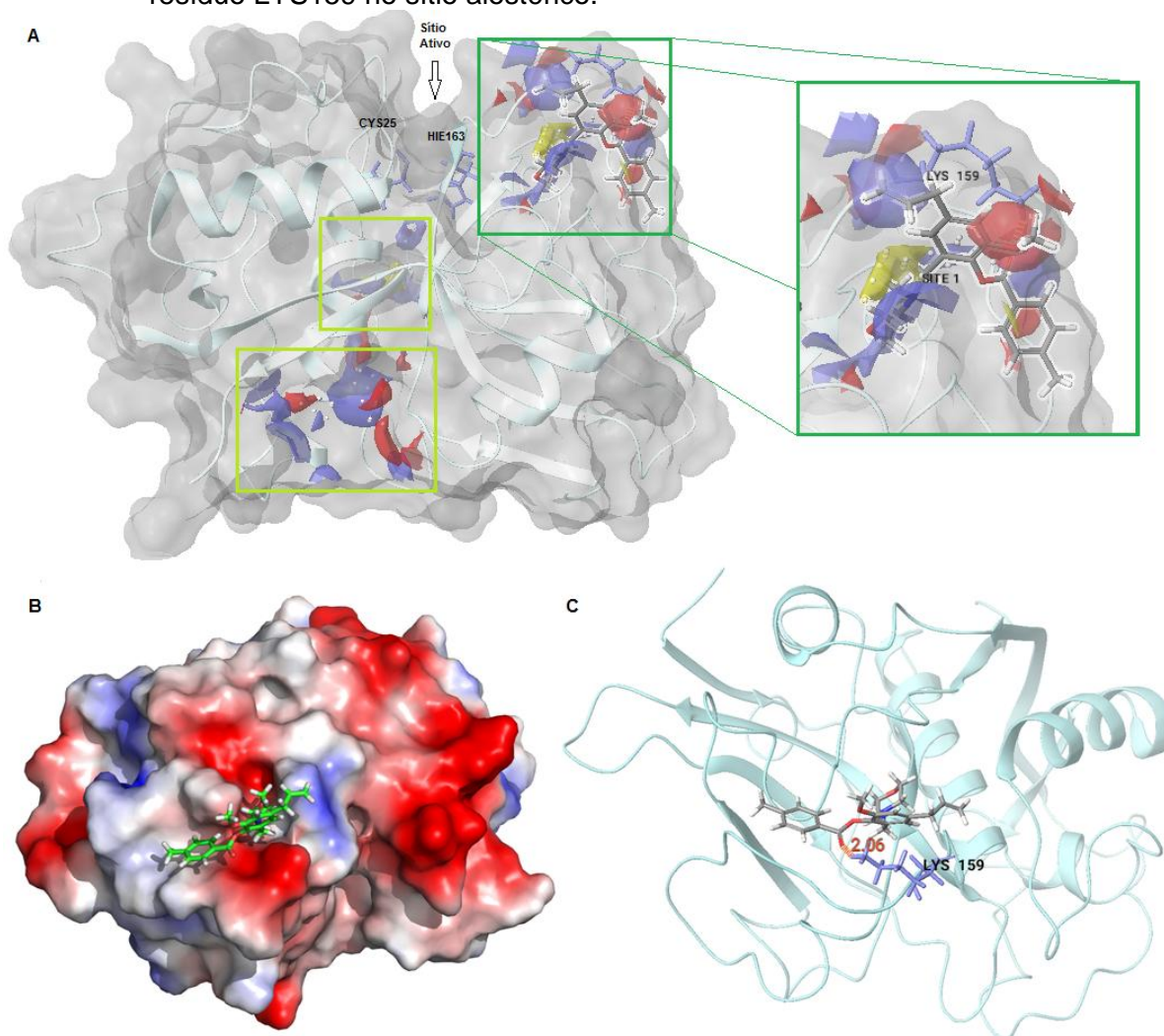


Fonte: Da autora.

A ativação e o aumento da atividade proteolítica da enzima rCPB2.8 frente à ligação com alguns compostos da série pode estar relacionada com a preferência destes compostos em se ligar a outros sítios de interação da enzima, conhecidos como sítios alostéricos. Os sítios alostéricos são conhecidos por causar mudanças conformacionais no sítio ativo quando induzidos pela ação de uma molécula ligante, fazendo com que a enzima se ligue mais fortemente a seu substrato, podendo levar à ativação e aumento da atividade da enzima, ou a sua inibição por impedir a ligação com o substrato.

Na busca por cavidades na superfície da enzima rCPB2.8 utilizando o pelo programa *SiteMaps*, descrito por Schrödinger (2015e) da plataforma Schrödinger foram encontrados três possíveis sítios de interação com micromoléculas, destacados na Figura 64 em verde. Dentre as cavidades estudadas, uma apresentou um perfil de interação similar ao obtido nos estudos *in vitro* que resultaram no aumento da atividade proteolítica da enzima rCPB2.8, e pode caracterizar uma possível interação dos compostos da série com um sítio alostérico da enzima rCPB2.8. Esta cavidade possivelmente está localizada na região do resíduo de lisina LYS159, próxima ao sítio ativo, e está destacada em verde escuro na Figura 64 ancorada com o composto **SBM4**.

Figura 64 - Perfil de interação entre o composto SBM4 e uma das cavidades de interação da enzima rCPB2.8. A) Superfície da enzima rCPB2.8 demonstrando o sítio ativo e os 3 sítios de interação previstos pelo programa *SiteMap* da plataforma Schödinger destacados de verde, com ampliação do sítio com melhor perfil de interação de ancoragem do composto SBM4. B) Potencial de superfície eletrostática da enzima contendo o ligante SBM4 no sítio alostérico de melhor interação com o ligante (escala de -70,232 [negativo, vermelho] a 70,232 [positivo, azul]). C) Ligante SBM4 formando uma interação de hidrogênio com o resíduo LYS159 no sítio alostérico.



Fonte: Da autora.

A Tabela 11 lista os valores de *GlideScore* obtidos no estudo de ancoramento molecular utilizando o sítio alostérico da proteína rCPB2.8 de *Leishmania* com melhor perfil de interação com os compostos da série.

Tabela 11 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (*GlideScore*), em ordem decrescente, entre as moléculas da série proposta e um dos sítios alostéricos da enzima rCPB2.8, número de interações de hidrogênio e os resíduos que participam desta interação, boas interações de van der Waals, interações cátion- π e π -stacking.

Ligante	<i>GlideScore</i> (Kcal. mol ⁻¹)	Interação de hidrogênio	Resíduos de AA que fazem interação de H	Boas interações de vDW	Interação π Stacking	Interação cátion π
Pentamidina	-6,868	4	ASP64, LEU161, GLY158, CYS204	282	0	0
Intermediário 2	-5,820	4	GLY158, LYS159, GLN160	273	0	0
SBM 4	-5,753	1	LYS159	371	0	0
SBM 9	-5,431	1	LYS159	332	0	1
SBM 13	-5,252	2	LEU205, GLU208	261	0	0
SBM 11	-4,997	1	LYS159	308	0	0
SBM 2	-4,960	3	LYS159, GLN160	242	0	0
SBM 5	-4,948	2	LYS159, CYS204	346	0	0
SBM 10	-4,917	1	GLU208	240	1	0
SBM 8	-4,816	1	LYS159	311	0	1
SBM 3	-4,165	3	LYS159, CYS204, LEU205	246	0	0

Fonte: Da autora.

De acordo com os valores de *GlideScore* as moléculas que apresentaram maior interação com o sítio alostérico estudado foram o intermediário **2** e os compostos **SBM4** [CH₃], **SBM9** [CF₃] e **SBM13** [NH₂]. Dentre elas apenas a molécula **SBM13** não exerceu um aumento da atividade da enzima rCPB2.8, sendo que o intermediário **2** e o composto **SBM4** promoveram a ativação desta enzima tanto nos estudos *in vitro* quanto teve bons resultados de interação com o sítio alostérico nos estudos *in silico*.

Pela análise do perfil de interação no sítio alostérico estudado é possível verificar maior afinidade deste por moléculas menores e com maior lipofilicidade. O logP calculado para as moléculas **SBM4**, **SBM8** e **SBM9** foram 3,609; 3,867 e 4,292, respectivamente, caracterizando-as como as moléculas mais lipofílicas da série.

6.3.7 Ancoramento molecular utilizando a proteína CRK3

O inibidor SFC conhecido por inibir a enzima CDC2 humana, presente na estrutura cristalográfica cocrystalizado com esta enzima (código PDB: 2R3I), foi estudado para se avaliar sua afinidade com a enzima CRK3 de *Leishmania*, devido à similaridade entre as duas enzimas. A molécula **SBM2** [H], listada na Tabela 12, apresentou valor de *GlideScore* melhor que aquele observado com o fármaco Pentamidina, provavelmente devido ao maior número de interações boas de van der Waals; porém menor que o apresentado pelo inibidor (SFC).

A Tabela 12 lista os valores de *GlideScore* observados no estudo de ancoramento molecular utilizando a proteína CRK3 de *Leishmania*.

Tabela 12 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (*GlideScore*), em ordem decrescente, entre as moléculas da série proposta e a enzima CRK3, o número de interações de hidrogênio e e os resíduos que participam desta interação, interações de van der Waals, interações tipos cátion- π e π -stacking.

Ligante	<i>Glide Score</i> (Kcal. mol ⁻¹)	Interação de hidrogênio	Resíduos de aa que fazem interação de H	Boas interações de vDW	Interação π Stacking	Interação cátion π
SFC	-8,095	4	LYS33, VAL83, LYS89	331	0	0
SBM2	-7,201	2	THR14, TYR15, ASN 131	418	1	0
Pentamidina	-6,887	5	LEU10, GLU12, ASP86, GLU161	252	0	0
SBM4	-6,472	0	-	382	0	0
SBM11	-6,343	0	-	326	0	0
SBM13	-6,341	1	THR14	319	0	0
SBM8	-5,785	0	-	345	0	0
SBM5	-5,599	0	-	360	0	0
SBM10	-5,509	1	ALA130	389	0	0
SBM3	-5,462	2	ARG20, TYR82	350	0	0
SBM9	-5,345	0	-	289	0	0

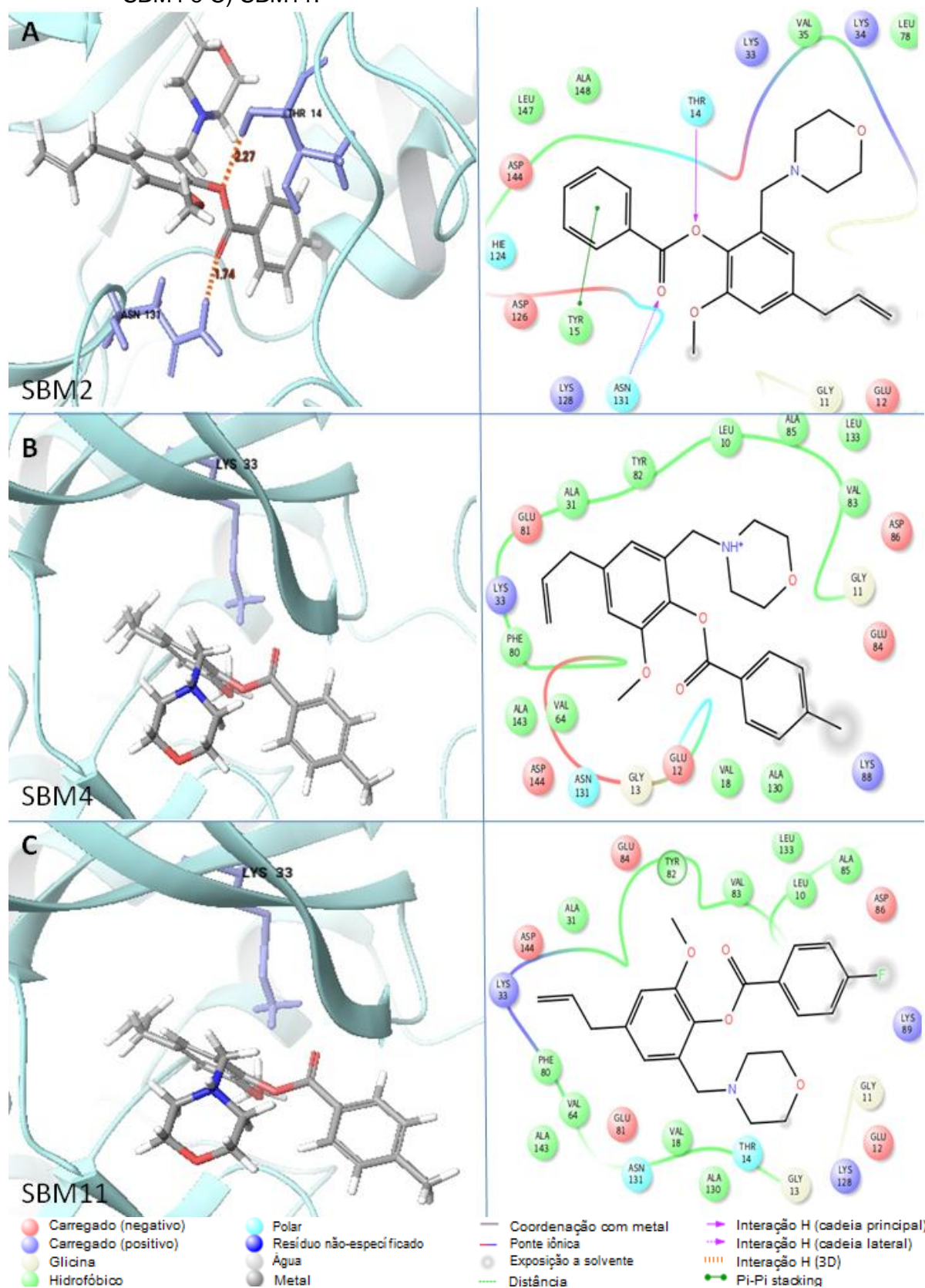
Fonte: Da autora.

A hidroxila do resíduo de aminoácido THR14 participa da interação entre a enzima CRK3 e os ligantes **SBM2** [H] e **SBM13** [NH₂] por ligação de hidrogênio, e

faz parte do sítio de ligação do ATP na enzima, essencial para sua atividade (WALKER et al., 2011). A ocupação da região localizada entre o resíduo THR14 pelo ligante pode resultar na redução da atividade desta enzima.

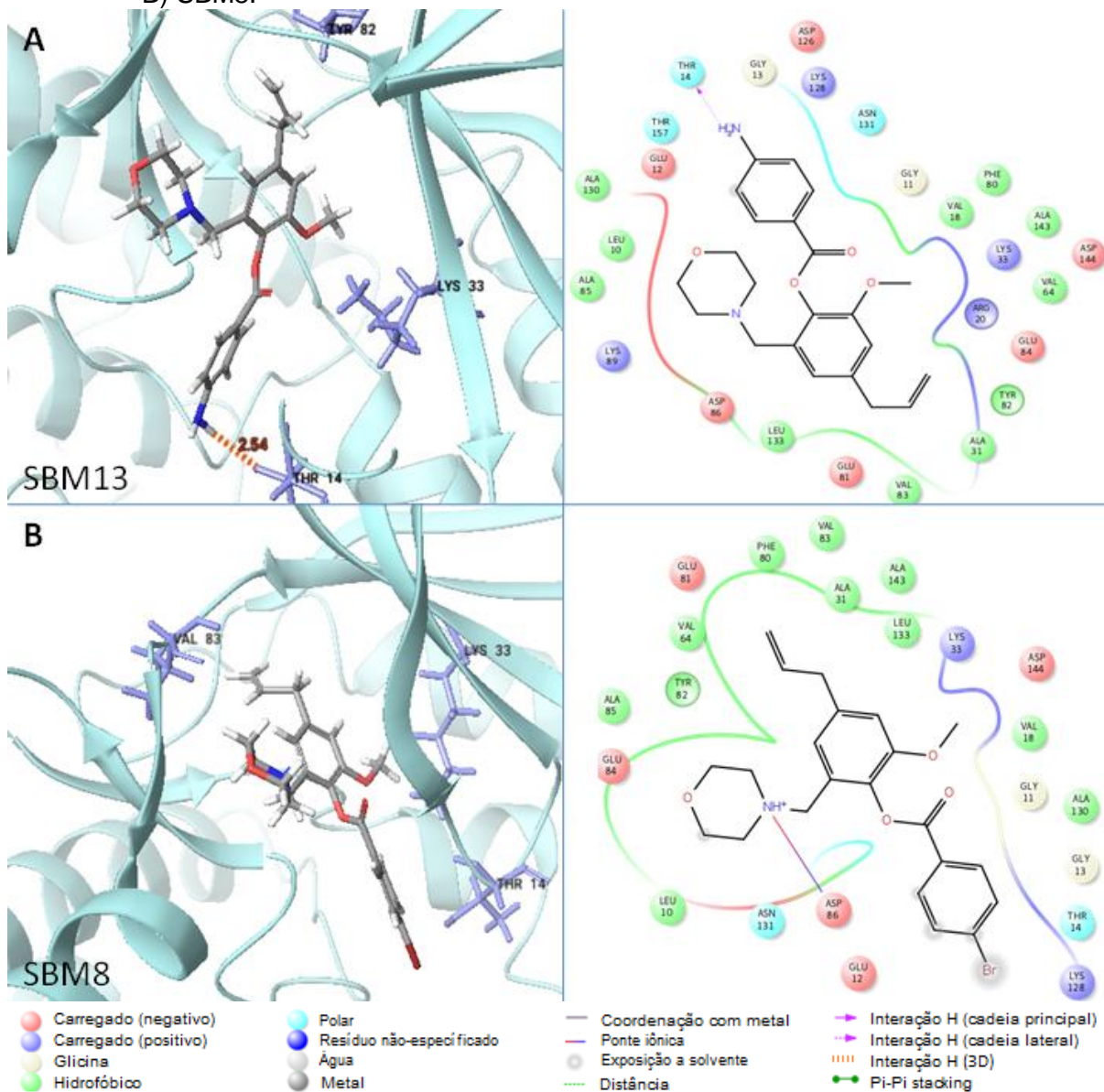
As Figuras 65 e 66 demonstram as interações e os resíduos envolvidos em cada ancoramento molecular observado entre a enzima CRK3 e as 5 melhores substâncias.

Figura 65 - Estrutura tridimensional representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada de cor laranja), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima CRK3 e as moléculas com melhor *GlideScore*: A) SBM2, B) SBM4 e C) SBM11.



Fonte: Da autora.

Figura 66 - Estrutura tridimensional representando as interações de hidrogênio (reta pontilhada de cor laranja), assim como a distância entre os átomos que participam desta interação, e esquema 2D demonstrando interações entre resíduos da enzima CRK3 e as moléculas com melhor *GlideScore*: A) SBM13 e B) SBM8.

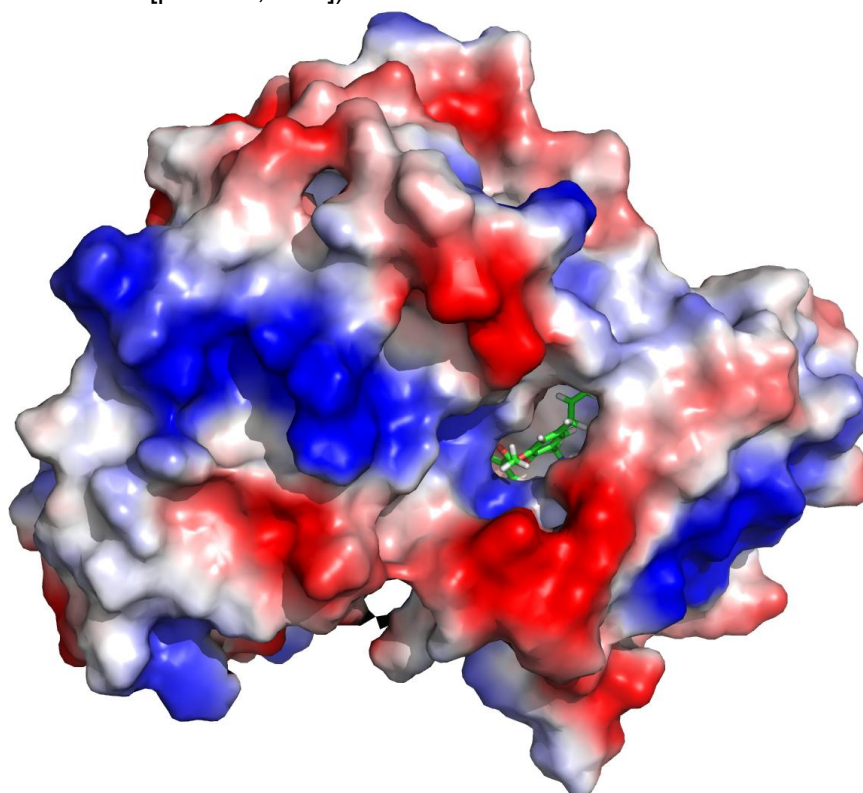


Fonte: Da autora.

Os compostos que apresentaram melhor afinidade com a enzima CRK3 levando-se em consideração o valor de *GlideScore* são compostos pouco volumosos, doadores de elétrons para o anel aromático (**SBM2** [H], **SBM4** [CH₃], **SBM5** [OCH₃] e **SBM13** [NH₂]), podendo exercer ação receptora de ligação de hidrogênio (**SBM11** [F] e **SBM8** [Br]) ou doadora de ligação de hidrogênio (**SBM13** [NH₂]). Este perfil de atividade condiz com o resultados de atividade leishmanicida *in vitro*, de um modo geral.

A Figura 67 ilustra a superfície da enzima CRK3 ligada ao composto **SBM2** apresentando a fenda onde se localiza o sítio ativo. O ligante se encontra ancorado completamente na fenda, possibilitando uma maior interação entre ele e o receptor, constituída em sua maior parte de um potencial positivo na região de interação com este ligante.

Figura 67 – Potencial de superfície eletrostática da enzima CRK3 ligada ao composto SBM2 (escala de -70,232 [negativo, vermelho] a 70,232 [positivo, azul]).



Fonte: Da autora.

6.3.8 Estudo de ancoramento molecular utilizando a proteína CDC2 de humano

Com o objetivo de se evitar efeitos adversos indesejáveis devido a possibilidade de existir baixa seletividade dos compostos propostos com a enzima alvo em relação à enzima humana, já que as enzimas CRK3 de *Leishmania* e CDC2 humana possuem aproximadamente 57% de identidade, buscou-se verificar a afinidade entre as moléculas propostas e a enzima CDC2 humana com código PDB 2R3I por estudos de ancoramento molecular.

A Tabela 13 lista os valores de *GlideScore* das melhores poses de todas as moléculas da série proposta obtidos no estudo de ancoramento molecular utilizando a proteína CDC2 humana.

Tabela 13 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (*GlideScore*) entre as moléculas da série proposta e a enzima CDC2 humana, o número de interações de hidrogênio, número de interação iônica, interações de van der Waals, interações tipos cátion- π e π -stacking.

Ligante	<i>Glide Score</i> (Kcal. mol ⁻¹)	Interação de hidrogênio	Resíduos de AA que fazem interação de H	Boas interações de vDW	Interação π Stacking	Interação cátion π
SBM13	-8,825	1	THR14	514	1	1
SBM4	-8,770	1	LEU83	466	0	0
SBM10	-8,472	1	GLN131	467	0	0
SBM3	-8,434	1	LYS89	393	0	0
SBM2	-8,405	2	LYS89, ASN132	396	0	0
Pentamidina	-8,403	5	GLU8, GLU12, GLU162, LEU298	207	0	1
SBM5	-7,810	3	LYS33, LEU83, LYS89	399	0	0
SBM11	-7,600	1	LEU83	394	0	0
SBM9	-7,482	2	LEU83, ASP86	370	0	0
SBM8	-7,458	1	LYS33	431	0	0

Fonte: Da autora.

Os estudos de ancoramento molecular utilizando a enzima CDC2 humana permite observar que as moléculas propostas possuem afinidade com esta enzima, e a escolha de uma molécula como protótipo a fármaco leishmanicida deve ser criteriosa.

Estudos *in vitro* demonstraram citotoxicidade em macrófagos de camundongos exercida por alguns compostos da série. Os compostos **SBM8** [Br] e **SBM11** [F] foram menos tóxicos nos testes de citotoxicidade e apresentaram maior valor de *GlideScore* nos estudos *in silico*, com menor afinidade por esta enzima, quando comparados aos outros compostos.

Não é possível inferir que a citotoxicidade demonstrada pelos compostos provém da afinidade destes pela enzima CDC2, porém as ferramentas de

ancoramento molecular possibilitariam o estudo e o planejamento de substâncias com maior seletividade pela enzima CRK3 de *Leishmania* e menor toxicidade frente a interação com a enzima CDC2, a partir de estudos dos diferentes resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima CRK3 e que não são encontrados na enzima humana.

7 CONCLUSÃO

Os ésteres de base de Mannich do eugenol (**SBM2-SBM13**) foram sintetizados com rendimentos variáveis e suas estruturas foram caracterizadas por determinação de suas faixas de fusão, fator de retenção em cromatografia em camada delgada, espectroscopia de absorção na região do IV, por RMN e EM.

Os compostos apresentaram resultados de propriedades físico-químicas desejáveis nos estudos teóricos, indicando boa solubilidade e permeabilidade em membranas pela administração via oral. Porém, a alta lipofilicidade e o alto peso molecular apresentado pelos compostos **SBM9** e **SBM10**, em relação aos demais compostos, pode ser o fator responsável pela baixa atividade antipromastigotas *in vitro* apresentada por estes.

Os compostos da série apresentaram atividade antipromastigota satisfatória, com exceção dos compostos **SBM9** e **SBM10**. O estudo biológico permitiu verificar que os compostos **SBM2**, **SBM3**, **SBM4**, **SBM5**, **SBM8**, **SBM11** e **SBM13** possuem atividade leishmanicida. A presença de um grupamento volumoso como o grupo *terc*-butila no anel *p*-dissubstituído não foi favorável para que o composto **SBM10** apresentasse atividade leishmanicida. Compostos contendo grupamentos doadores de elétrons ao anel aromático *p*-dissubstituído pelo efeito de ressonância apresentaram uma atividade leishmanicida de magnitude ligeiramente maior que aqueles contendo grupamentos retiradores de elétrons devido ao aumento da densidade eletrônica neste anel e possibilitando uma interação mais forte do tipo π -*stacking* e cátion- π .

Nos estudos de inibição da atividade enzimática da enzima rCPB2.8 apenas o composto **SBM3** apresentou atividade significativa na concentração de 100 μ M, reduzindo 88% da atividade da enzima rCPB2.8 nesta concentração. A possível interação da enzima rCPB2.8 com grupamentos carregados positivamente já foi descrita devido a presença de um aminoácido glutamato (GLU205) flexível e pode ser responsável pela afinidade entre o composto **SBM3**, que contém um nitrogênio com carga formal positiva no grupamento nitro. Os compostos **SBM2**, **SBM5**, **SBM10**, **SBM11** e **SBM13** apresentaram atividade inibitória baixa, com inibição de 4,3; 7,2; 3,8; 28,3 e 2,2%, respectivamente, da atividade da enzima rCPB2.8 também na concentração de 100 μ M.

A ativação da enzima rCPB2.8 exercida pelos compostos intermediário **2**, **SBM4**, **SBM8** e **SBM9** pode estar relacionada com a interação destes compostos em um sítio alostérico, o que levaria a uma alteração conformacional no sítio ativo com o aumento da catálise enzimática e aumento da velocidade de reação. Dentre as cavidades estudadas pelo programa *SiteMap* (Schrödinger), uma apresentou um perfil de interação similar ao observado nos estudos *in vitro* que resultou no aumento da atividade proteolítica da enzima rCPB2.8. Esta cavidade está localizada na região do resíduo de LYS159, próxima ao sítio ativo, e apresenta maior afinidade por moléculas menores e com maior lipofilicidade.

O composto **SBM3** demonstrou toxicidade, entretanto a toxicidade e o potencial carcinogênico exercida por nitrobenzenos já é conhecida. Apenas os compostos halogenados **SBM8** e **SBM11** apresentaram baixa citotoxicidade e alto valor de índice de seletividade.

Por meio dos estudos de modelagem molecular realizados foi possível validar os alvos enzimáticos escolhidos como alvos promissores para os estudos de protótipos à fármacos leishmanicidas, o que pode levar a resultados equivalentes entre estudos farmacológicos *in vivo* e os estudos de ancoramento molecular. Os resultados obtidos por ancoramento molecular permitem inferir que a série de substâncias propostas apresentou um perfil leishmanicida promissor como inibidores das enzimas estudadas e podem suscitar o desenvolvimento de uma nova série de inibidores correlatos.

A presença do grupamento carbonila foi essencial para interação entre os compostos da série e as enzimas arginase, tripanotiona sintetase e rCPB2.8 (enzimas da classe hidrolases e proteases) nos estudos de ancoragem molecular. O sítio ativo destas enzimas é caracterizado por apresentar uma superfície eletrostática negativa, possibilitando a interação destas com moléculas carregadas positivamente ou com regiões de baixa densidade eletrônica.

O resultado de ancoragem molecular que mais se aproximou com os resultados *in vitro* antipromastigota foi o ancoramento com a enzima CRK3, que possui afinidade com os compostos da série pouco volumosos, doadores de elétrons para o anel *para*-dissubstituídos.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, P. H. O. et al. Synthesis and biological evaluation of new eugenol Mannich bases as promising antifungal agents. **Chemical Biology & Drug Design**, Oxford, v. 86, p. 259-465, 2015.
- ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT. ACD/Chemsketch. versão C30E41, Inc., Toronto, ON, Canada, 2016.
- ALI, N.O. et al. An investigation of CRK protein kinases of *Leishmania* and the assessment of their potential as drug targets. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Polônia, v. 8. n. 2A, 2003.
- ALI, N. O. M. et al. Isolation and characterization of a cdc2-related protein kinase 3 (CRK3) from a Sudanese strain of *Leishmaniadonovani*. **International Research Journal of Pharmacy and Pharmacology**, India, v. 2, p. 215-224, 2012.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Estados Unidos da América, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANANDAKRISHNAN, R.; AGUILAR, B.; ONUFRIEV, A. V. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, p. w537-w541, 2012.
- ANDRICOPULO, A. D. SALUM; L. B. ABRAHAM, D. J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Doylestown, v. 9, p. 771-790, 2009.
- AYDIN, G. Synthesis and α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Activity Evaluation of Azido- and Aminocyclitols. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, v. 2014, n. 31, p. 6903-6917, 2014.
- AZIZI, H. et al. Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans *Leishmania tarentolae*. **Parasitology**, Inglaterra, v. 136, n. 7, p. 723-735, 2009.
- BANDYOPAD-HYAY, S. et al. **Activity of extract of piper betle leaves against leishmania**. WO2002045731. 2002. Disponível em: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2002045731&recNum=6&maxRec=33&office=&prevFilter=&sortOption=Pub+Date+Asc&queryString=FP%3A%28leishmani*+extract%29&tab=PCT+Biblio>. Acessado em: 11 de maio de 2017.
- BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, Brasil, v. 25, n. 6B, p. 1172-1180, 2002.
- BARREIRO, E. J. et al. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, Brasil, v. 20, n. 1, 1997.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**: as bases moleculares de ação dos fármacos. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BASSELIN, M. et al. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated and pentamidine-resistant *Leishmania*. **Experimental parasitology**, Berlin, v. 85, n. 3, p. 274-282, 1997.

BELLAMY, F. D.; OU, K. Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 839-842, 1984.

BITTENCOURT, A. L. et al. Leishmaniasis recidiva cutis in american cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, Estados Unidos da América, v. 32, n. 11, p. 802-805, 1993.

BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure. **Science**, Inglaterra, v. 253, p. 164-170, 1991.

BRAND, S. et al. **IMIDAZO[1,2-B][1,2,4]TRIAZINE DERIVATIVES AS ANTIPARASITIC AGENTS**. WO2016193111A1. 2016. Disponível em: <<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2016193111&recNum=1&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PCT+Biblio>>. Acessado em: 10 de maio de 2017.

BRASIL. DATASUS. 2012. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/d0205.def>>. Acessado em: 15 de set. de 2015.

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

BRUCKNER, R. **Advanced Organic Chemistry: Reaction Mechanisms**. 1. ed. California: Academic Press, 2002

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, Estados Unidos da América, v. 126, n. 1, 2007.

CABALLERO, A. B.; SALAS, J. M.; SÁNCHEZ-MORENO M. Metal-based therapeutics for leishmaniasis. **Intech**, 2015. Disponível em: <<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/46398.pdf>>. Acessado em: 27 de set. de 2015.

CARUGO, O.; PONGOR, S. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. **Protein Science**, Connecticut, v. 10, p. 1470-1473, 2001.

CASE, D. A. et al. **AMBER 2017**, University of California, San Francisco, 2017.

CHOW, L. M. et al. **Synthesis and use of amine-containing flavonoids as potent anti-leishmanial agents**. US2015239870A1. 2015. Disponível em: <<https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=US&NR=2015239870A1&KC=A1&FT=D&ND=1&date=20150827&DB=&locale=>>. Acessado em: 15 de maio de 2015.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2. ed. Grã-bretanha: Oxford UK Print On, 2012.

CLEGHORN, L. A. T. et al. Identification of inhibitors of the *leishmania* cdc2-related protein kinase CRK3. **ChemMedChem**, Alemanha, v. 6, p. 2214-2224, 2011.

CLUSTAL OMEGA - Multiple Sequence Alignment. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>. Acessado em: 20 de maio de 2017.

CROUCH, R. D. Selective deprotection of silyl ethers. **Tetrahedron**, Oxford, v. 69, n. 997, p. 2383-2417, 2013.

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

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, Estados Unidos da América, v. 98, p. 10089-10092, 1993.

DAS, P. et al. Protease inhibitors in potential drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, Índia, v. 50, p. 363-376, 2013.

DEWITT, H. D.; INGERSOLL, A. W. The Preparation of Pure N-Acetyl-L-leucine and L-Leucine. **Journal of the American Chemical Society**, Estados Unidos da América, v. 73, n. 7, p. 3359-3360.

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

DUGGLEBY, R. G. Product inhibition of reversible enzyme-catalysed reactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alemanha, v. 1209, p. 238-240, 1994.

FAIRLAMB, A. et al. **Treatment of parasitic disease**. WO2017072523A1. 2017. Disponível em: <<https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=WO&NR=2017072523A1&KC=A1&FT=D&ND=&date=20170504&DB=&locale=>>>. Acessado em: 15 de maio de 2017.

FIROUZABADI, H.; IRANPOOR, N.; SHATERIAN, H. R. Effective silylation of carboxylic conditions with tert-butyldimethylsilyl chloride (tbdmscl) and triisopropylsilyl chloride (tipscl). **Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements**, v. 166, p. 71-81, 2000.

FRADE, A. F. et al. TGFB1 and IL8 gene polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infection, Genetics and Evolution**, França, v. 11, p. 912-916, 2011.

FRIESNER, R. A. et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, Estados Unidos da América, v. 47, p. 1739-1749, 2004.

FYFE, P. K. et al. *Leishmania* Trypanothione Synthetase-Amidase Structure Reveals a Basis for Regulation of Conflicting Synthetic and Hydrolytic Activities. **The Journal**

of **Biological Chemistry**, Estados Unidos da América, v. 283, n. 25, p. 17672-17680, 2008.

GAMBLE, A. B. et al. Aryl Nitro Reduction with Iron Powder or Stannous Chloride under Ultrasonic Irradiation. **Synthetic Communications**, Inglaterra, v. 37, p. 2777-2786, 2007.

GILLES, V. et al. A new, simple and efficient method of steglich esterification of juglone with long-chain fatty acids: synthesis of a new class of non-polymeric wax deposition inhibitors for crude oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 26, n. 1, 2015.

GILLMOR, S. A.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. **Protein Science**, Connecticut, v. 6, n. 8, p. 1603-1611, 1997.

GOMES, J. R. B. et al. **Density Functional Theory**. 1. ed. New York: Nova Science Publishers, 2013.

GONTIJO, V. S. et al. Leishmanicidal, antiproteolytic, and mutagenic evaluation of alkyltriazoles and alkylphosphocholines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, França, v. 101, p. 24-33, 2015.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinical of North America**, Boston, v. 26, p. 293-307, 2012.

GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniase. **Infectious Disease Clinical of North America**, Boston, v. 26, p. 309-322, 2012.

GRIENSVEN, J. et al. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. **Clinical Microbiology and Infection**, Israel, v. 20, p. 286-299, 2014.

GROVES, M. R. et al. The prosequence of procaricain forms an α -helical domain that prevents access to the substrate-binding cleft. **Research Article**, v. 4, n. 10, p. 1193-1203, 1996.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, 2010.

HANN, M.; KESERÜ, G. M. Finding the sweet spot: the role of nature and nurture in medicinal chemistry. **Nature Reviews**, Inglaterra, v. 11, p. 355-365, 2012

HESS, B. et al. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, Estados Unidos da América, v. 4, n. 3, p. 435-447, 2008.

HESS, B. et al. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, Estados Unidos da América, v. 18, p. 1463-1472, 1997.

HILAIRE, P. M. St. et al. The substrate specificity of a recombinant cysteine protease from *Leishmania Mexicana*: Application of a combinatorial peptide library approach. **Chembiochem**, Alemanha, v. 1, p. 115-122, 2000.

HORNAK, V. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. **Proteins**, Nova Jérσία, v. 65, n. 3, p. 712-725, 2006.

HUANG, X. et al. Anti-inflammatory effects of eugenol on lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in acute lung injury via regulating inflammation and redox status. **International Immunopharmacology**, Estados Unidos da América, v. 26, n. 1, p. 265-271, 2015.

ISLAMUDDIN, M.; SAHAL, D.; AFRIN, F. Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by eugenol-rich oil of *Syzygium aromaticum*. **Journal of Medical Microbiology**, Inglaterra, v. 63, p. 74-85, 2014.

JEAN-MORENO V. et al. *Leishmania donovani*: Differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. **Experimental Parasitology**, v. 112, n.1, p. 21–30, 2006.

JIN, F. et al. Equilibration and thermalization of classical systems. **New Journal of Physics**, Alemanha, v. 15, 2013.

JUDICE, W. A. S. et al. Heparin Modulates the Endopeptidase Activity of *Leishmania mexicana* Cysteine Protease Cathepsin L-LikerCPB2.8. **PLOS ONE**, Estados Unidos da América, v. 8, n. 11, p. 1-12, 2013.

KERNS, E. H.; DI, L. **Drug-like properties; Concepts, structure, design and methods**. 1. ed. London: Elsevier, 2008.

KHALIKOV, S. K.; KODIROV, M.; ALIEVA, S. V. Synthesis and anti-inflammatory activity of acetylsalicylamino acids and peptides. **Chemistry of Natural Compounds**, Alemanha, v. 42, p. 204-207, 2006.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. **Journal of Applied Toxicology**, Estados Unidos da América, v. 34, n. 8, p. 810-824, 2014.

KROEMER, R. T. Structure-based drug design: docking and scoring. **Current Protein and Peptide Science**, Estados Unidos da América, v. 8, n. 4, p. 312-328, 2007.

LASKOWSKI, R. A. et al. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, Alemanha, v. 8, p. 477-486, 1996.

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

LOISEAU, P. M.; COJEAN, S.; SCHRÉVEL, J. Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance. **Parasite : Journal de La Société Française de Parasitologie**, França, v. 18, n. 2, p. 115–119, 2011.

- LOVELL, S. C. et al. Structure validation by C α geometry: phi,psi and C β deviation. **Proteins: Structure, Function & Genetics**, v. 50, n. 3, p. 437-450, 2002.
- MING-CHEUNG, C. L. et al. **Synthesis and use of amine-containing flavonoids as potent anti-leishmanial agents**. US2015239870A1. Disponível em: <<https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=US&NR=9562037B2&KC=B2&FT=D>>. Acessado em: 10 de maio de 2017.
- MODJINO, T. et al. Antibacterial and antioxidant bio-based networks derived from eugenol using photo-activated thiol-ene reaction. **Reactive and Functional Polymers**, Japão, v. 101, P. 47-53, 2016.
- MOLTENI, V. et al. **Compounds and compositions as lxr modulators**. WO2005077124A2. Disponível em: <<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2005077124> >. Acessado em: 10 de out. de 2016.
- MONDOLFI, A. E. P. et al. Intermediate/borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. **Tropical Medicine Rounds**, v. 52, p. 446-455, 2013.
- MORAIS, S. M. et al. Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Estados Unidos da América, v. 22, n. 21, p. 6250-6255, 2014.
- MOTTRAM, J. C. et al. The Multiple cpb Cysteine Proteinase Genes of *Leishmania mexicana* Encode Isoenzymes That Differ in Their Stage Regulation and Substrate Preferences. **The Journal of Biological Chemistry**, Estados Unidos da América, v. 272, n. 22, p. 14285-14293, 1997.
- MUKHOPADHYAY, D. et al. Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery. **Trends in Parasitology**, Estados Unidos da América, v. 30, n. 2, p. 65-74, 2014.
- NAGLE, A. S. et al. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, Estados Unidos da América, v. 114, p. 11305-11347, 2014.
- NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; SILVA, H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármaco. **Eclética Química**, Brasil, v. 33, n. 4, p. 13-23, 2008.
- NEISES, B.; STEGLISH, W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. **Angewandte Chemie International Edition**, Alemanha, v. 17, n. 7, p. 522-524, 1978.
- NEITZEL, J. J. Enzyme Catalysis: The Serine Proteases. **Nature Education**, Inglaterra, v. 3, n.9, p. 21, 2010.
- PACHECO, A. G. M. **Modelagem molecular comparativa e estudos De acoplamento molecular da enzima Lanosterol 14 α -desmetilase do *moniliophthora Perniciosa***. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

PAI, C. et al. Structure and mechanism of *Escherichia coli* glutathionylspermidine amidase belonging to the family of cysteine; histidine-dependent amidohydrolases/peptidases. **Protein Science**, Estados Unidos da América, v. 20, p. 557-566, 2011.

PAO, W. et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Estados Unidos da América, v. 101, n. 36, p. 13306-13311, 2004.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, Estados Unidos da América, v. 52, p. 7182-7190, 1981.

PAVIA, D. L. et al. **Introduction to Spectroscopy**. 4 ed. Washington: Cengage Learning, 2010.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Inglaterra, v. 22, p. 1-13, 1996.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, E. O. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**, Inglaterra, v. 51, n. 5, 2013.

PEREIRA, F. S. S. et al. Modelagem molecular por homologia e validação estrutural da CRK3 de *leishmania mexicana*. **Revista eletrônica de farmácia**, Brasil, v. x(2), p. 42-52, 2013.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, Holanda, v. 17, p. 339-345, 2010.

PISCOPO, T. V.; AZZOPARDI, C. M. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, Inglaterra, v. 83, n. 976, p. 649–657, 2006.

PUBCHEM. Amphotericin B. 2005a. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/amphotericin_b#section=Top>. Acessado em: 24 de jul. de 2016.

PUBCHEM. Miltefosine. 2005b. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3599>>. Acessado em: 24 de jul. de 2016.

PUBCHEM. Pentamidine. 2005c. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pentamidine#section=Top>>. Acessado em: 24 de jul. de 2016.

PUBCHEM. Sitamaquine. 2005c. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/42548#section=Top>>. Acessado em: 24 de jul. de 2016.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química nova**, Brasil, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

- REIS, M. B. G. et al. Inhibition of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Rat Arginases by Green Tea EGCG, (+)-Catechin and (-)-Epicatechin: A Comparative Structural Analysis of Enzyme-Inhibitor Interactions. **PLoS ONE**, Estados Unidos da América, v. 8, n. 11, p. e78387.
- ROBERTS, S. C. Leishmania donovani Polyamine Biosynthetic Enzyme Overproducers as Tools to Investigate the Mode of Action of Cytotoxic Polyamine Analogs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Estados Unidos da América, v. 51, n. 2, p. 438-444, 2007.
- SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, Holanda, v. 234, p. 779-815, 1993.
- SANDERSON, S. J. et al. Expression and characterization of a recombinant cysteine proteinase of Leishmania mexicana. **Biochemical Journal**, Estados Unidos da América, v. 347, p. 383-388, 2000.
- SANGSHETTI, J. N. et al. Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. **Royal Society of Chemistry Advances**, Inglaterra, v. 5, p. 32376-32415, 2015.
- SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista virtual de Química**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009.
- SARAIVA, L. A. et al. Structural bioinformatics approach of cyclin-dependent kinases 1 and 3 complexed with inhibitors. **Molecular Informatics**, Alemanha, v. 30, p. 219-231, 2011.
- SCHRÖDINGER. **Schrödinger Release 2015-2**: Maestro, version 10.2.010, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015a.
- SCHRÖDINGER. **Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-2**: Schrödinger Suite 2015-2 Induced Fit Docking protocol; Glide version 6.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015; Prime version 4.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015b.
- SCHRÖDINGER. **Schrödinger Release 2015-2**: LigPrep, version 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015c.
- SCHRÖDINGER. **Schrödinger Release 2015-2**: Schrödinger Suite 2015-2 Protein Preparation Wizard; Epik version 3.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015; Impact version 6.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015; Prime version 4.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015d.
- SCHRÖDINGER. **Schrödinger Release 2015-2**: SiteMap, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015e.
- SCHRÖDINGER. **The PyMOL Molecular Graphics System**, Version 1.74 Schrödinger, LLC. 2015f.
- SCHRÖDINGER. What is the difference between GlideScore and Emodel, and which should I use for ranking poses. **Knowledge Base**, 2016. Disponível em: <<http://www.schrodinger.com/kb/1027>>. Acessado em: 30 de jun. de 2016.

SETH, S. P. The role of bioisosterism in molecular modification and drug design: a review. **Asian Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, Japão, v. 3, n. 1, p. 61-87.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, Estados Unidos da América, Alemanha, v. 7, n. 539, 2011.

SIKLOS, M. et al. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, China, v. 5, n. 6, p. 506-519, 2015.

SINGH, H. B.; JHA, A.; KESWANI C. **Intellectual property issues in biotechnology**. 1. ed. Boston: CABI, 2016.

SILVA, E. R. et al. Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and subcellular localization of native enzyme. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Estados Unidos da América, v. 159, p. 104-111, 2008.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Tailândia, p. 485-497, 2012.

SMITH, M. B. **Organic Synthesis**. 1. ed. Nova York: McGraw-Hill Companies, 1994.

SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure**. 6. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007, p. 1818.

SOUSA, A. F. M. **Ação da saliva de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) sobre o sistema complemento de cães (*Canis familiaris*), galinhas (*Gallus gallus*) e cobaias (*Cavia porcellus*)**. 2012. 72f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

TRINCONI, C. T. Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Inglaterra, v. 71, p. 1314-1322, 2016.

TURK, V. et al. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. **Biochimica et Biophysica Acta**, Holanda, v. 1824, p. 68-88, 2012.

UEDA-NAKAMURA et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, Japão, v. 55, p. 99–105, 2006.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, Flexible and Free. **Journal of Computational Chemistry**, Estados Unidos da América, v. 26, p. 1701-1718, 2005.

VICKERS, T. J.; BEVERLEY, S. M. Folate metabolic pathways in *leishmania*. **Essays in Biochemistry**, Inglaterra, v. 51, p. 5-19, 2011.

WALKER, R. G. et al. High throughput screens yield small molecule inhibitors of *leishmania* CRK3:CYC6 cyclin-dependent kinase. **PLoS Neglected tropical diseases**, Estados Unidos da América, v. 5, n.4, p. 1-11, 2011.

WANG, Z. Prilezhaev Reaction. **Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents**, Estados Unidos da América, n. 513, p. 2270-2274, 2010.

WESTPHAL, E. et al. Polar order and symmetry breaking at the boundary between bent-core and rodlike molecular forms: when 4-cyanoresorcinol meets the carbosilane end group. **Chemistry - A European Journal**, Alemanha, v. 22, p. 8181 - 8197, 2016.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, Inglaterra, v. 35, p. W407-W410, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases executive summary neglected tropical diseases - a roadmap for implementation. 2012a. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/NTD_RoadMap_2012_Fullversion.pdf>. Acessado em: 01 de maio de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. 2010a. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acessado em: 20 de maio de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Annex 6 - Costs of medicines in current use for the treatment of leishmaniasis. 2010b. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/research/978_92_4_12_949_6_Annex6.pdf>. Acessado em: 02 de maio de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Integrating neglected tropical diseases into global health and development. 2017. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255011/1/9789241565448-eng.pdf?ua=1>>. Acessado em: 02 de maio de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2012. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png>. Acessado em: 15 de set. de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Strategic framework for leishmaniasis control in the WHO European Region 2014–2020, 2014. Disponível em: <http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0017/245330/Strategic-framework-for-leishmaniasis-control-in-the-WHO-European-Region-20142020.pdf?ua=1>. Acessado em: 20 de maio de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Post-kala-azar dermal leishmaniasis: a manual for case management and control**, 2012b. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78608/1/9789241505215_eng.pdf>. Acessado em: 24 de ago. de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Leishmaniasis**, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acessado: 04 de maio de 2017.

WYATT, P. G. et al. Identification of inhibitors of the Leishmania cdc-related protein kinase CRK3. **ChemMedChem**, Estados Unidos da América, v. 6, p. 2214 – 2224, 2011.

YAN, J. Experimental and theoretical evaluation of nanodiamonds as pH triggered drug carriers. **New Journal of Chemistry**, Inglaterra, v. 36, p. 1479-1484, 2012.

YAN, Y. et al. Synthesis of hydroxypyrrone- and hydroxythiopyrrone-based matrix metalloproteinase inhibitors: Developing a structure–activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Estados Unidos da América, v. 19, n. 7, p. 1970-1976, 2009.

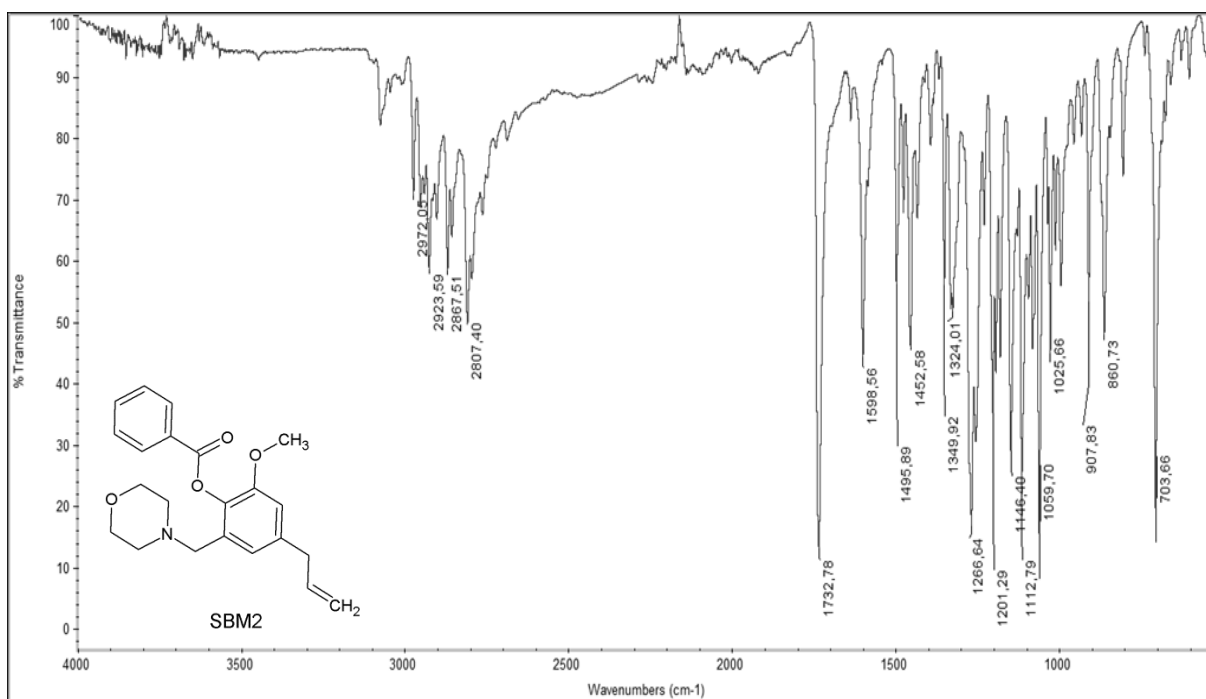
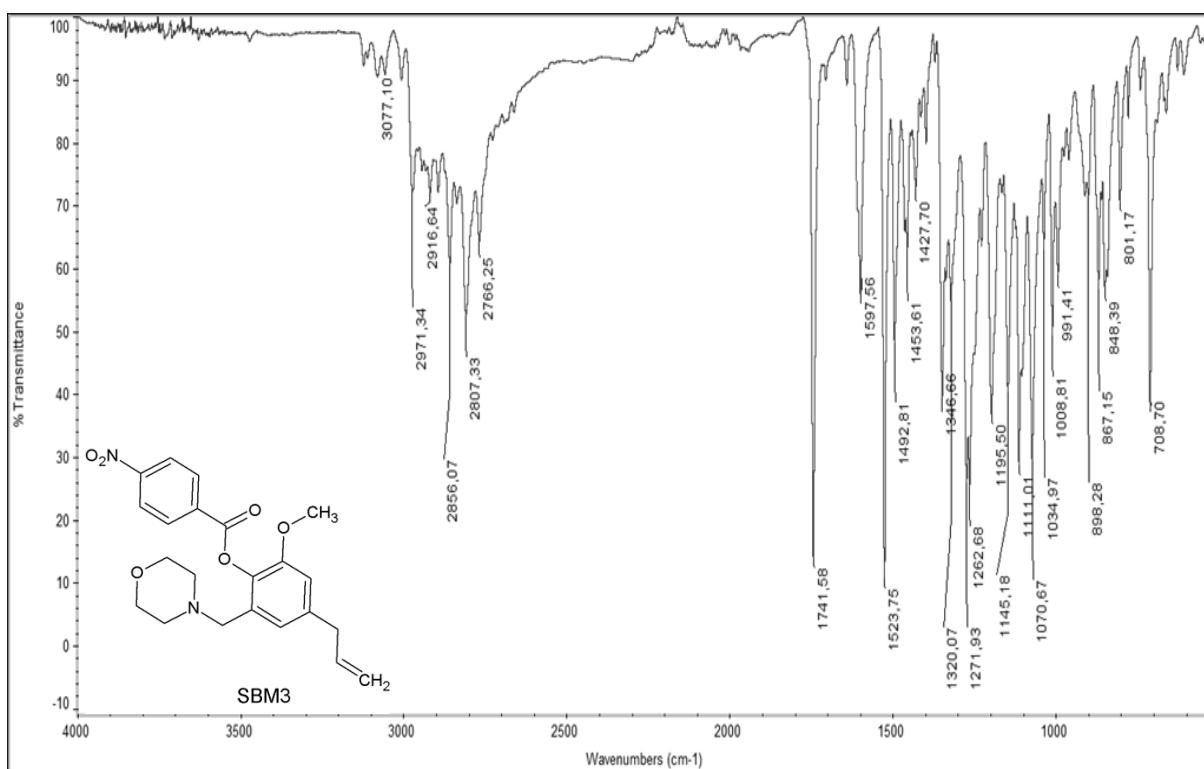
YUSUF, D. et al. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Estados Unidos da América, v. 48, n. 7, p. 1411-22, 2008.

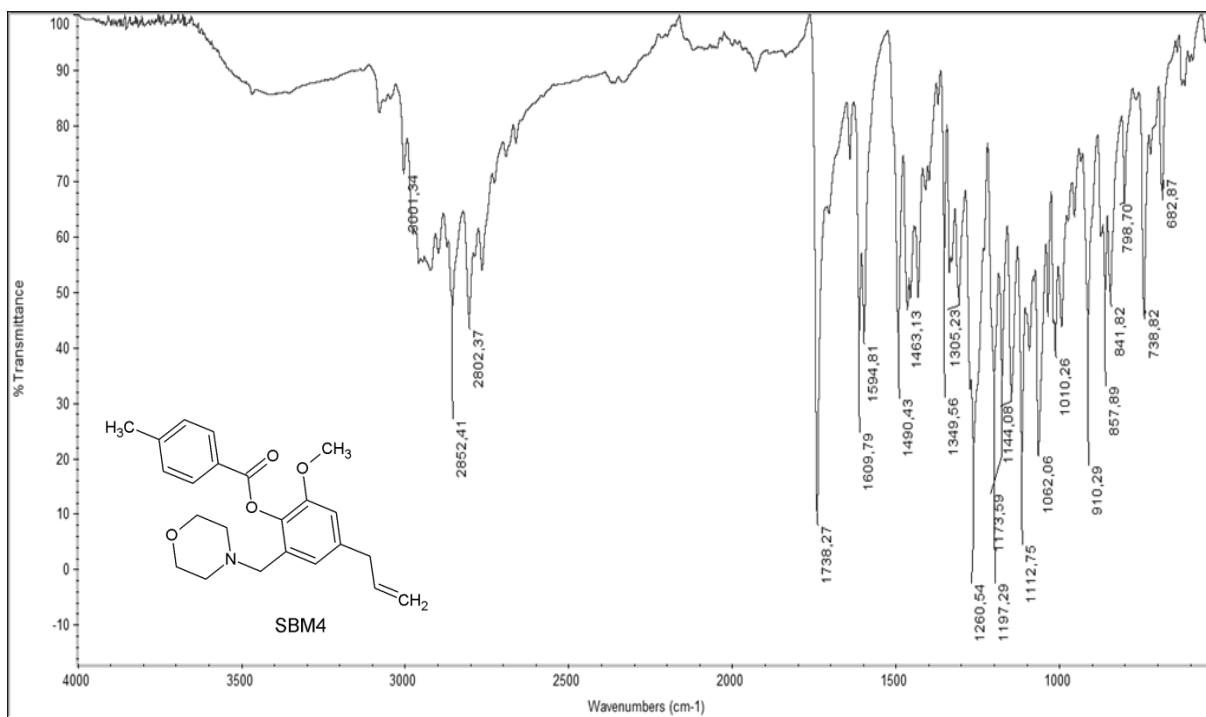
ZHANG, C. Synthesis and Antifungal Activities of New Pyrazole Derivatives via 1,3-dipolar Cycloaddition Reaction. **Chemical Biology & Drug Design**, Inglaterra, v. 75, p. 489-493, 2010.

ZIJLSTRA, E. E. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). **Parasites & Vectors**, Inglaterra, v. 9, p. 1-9, 2016.

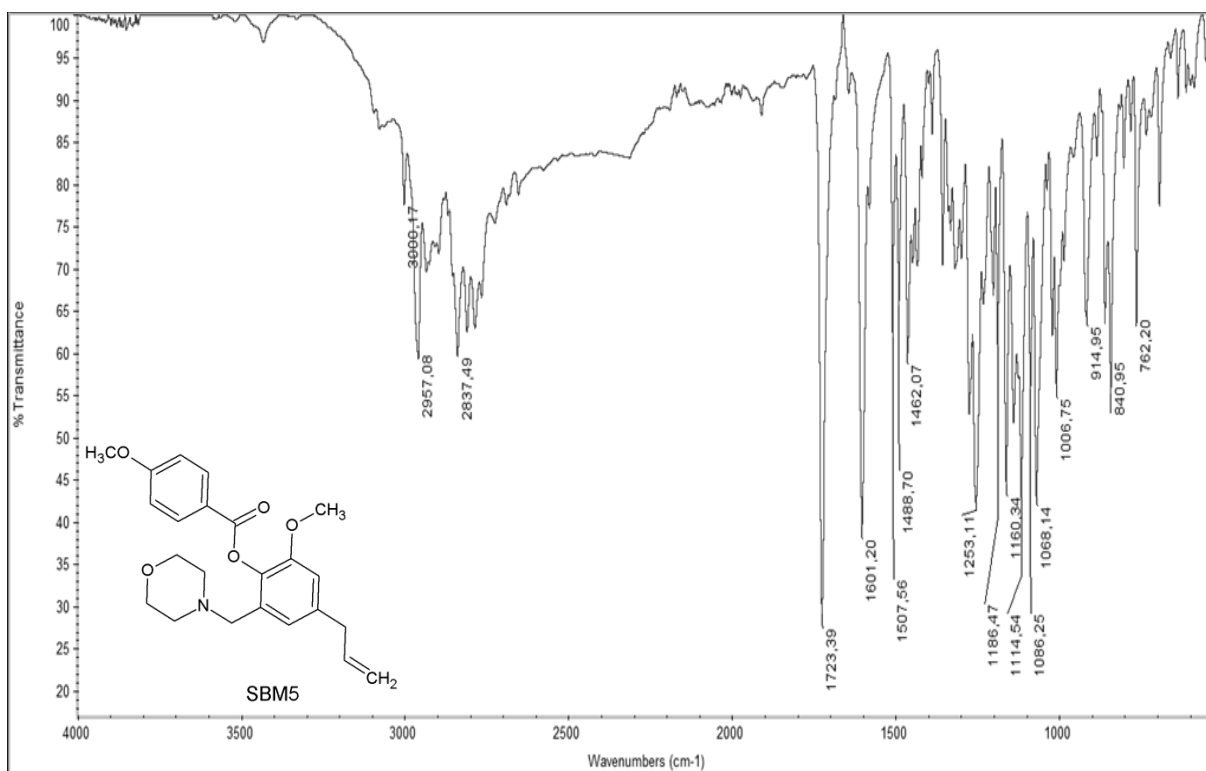
APÊNDICES

APÊNDICE A - Espectros de absorção na região do infravermelho.

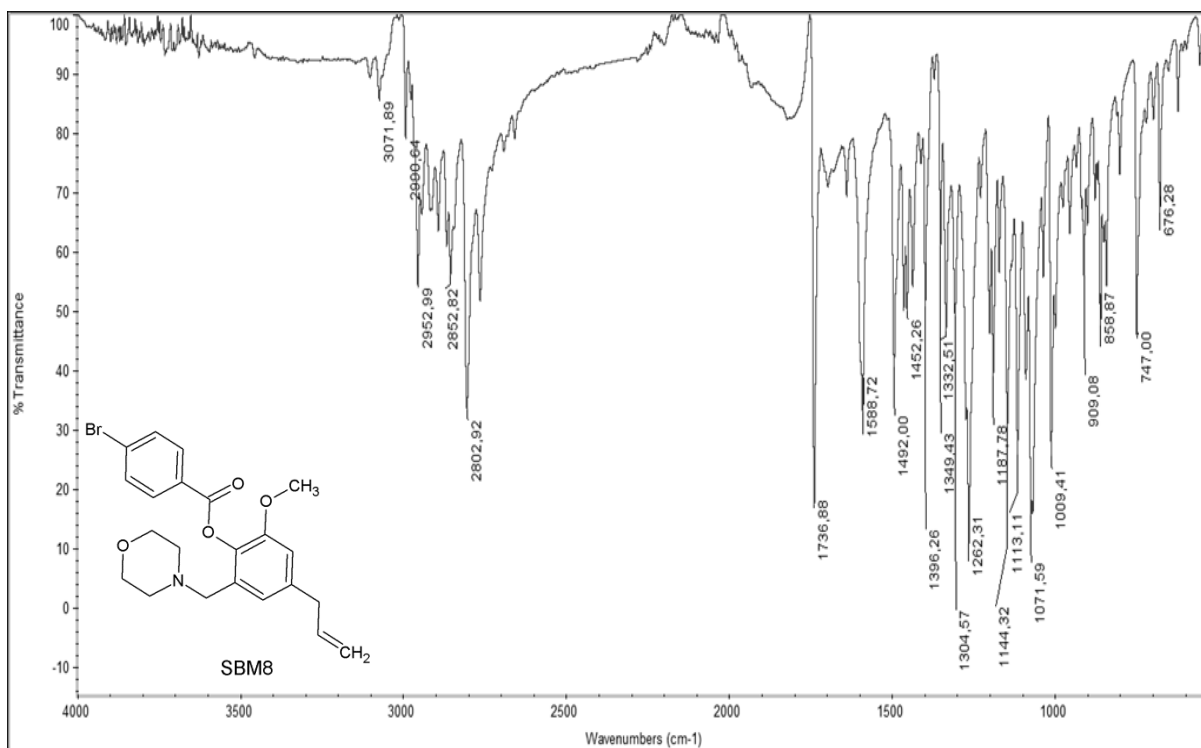
Espectro 1 - Espectro de absorção na região do IV da substância **SBM2** (cm⁻¹).Espectro 2 - Espectro de absorção na região do IV da substância **SBM3** (cm⁻¹).



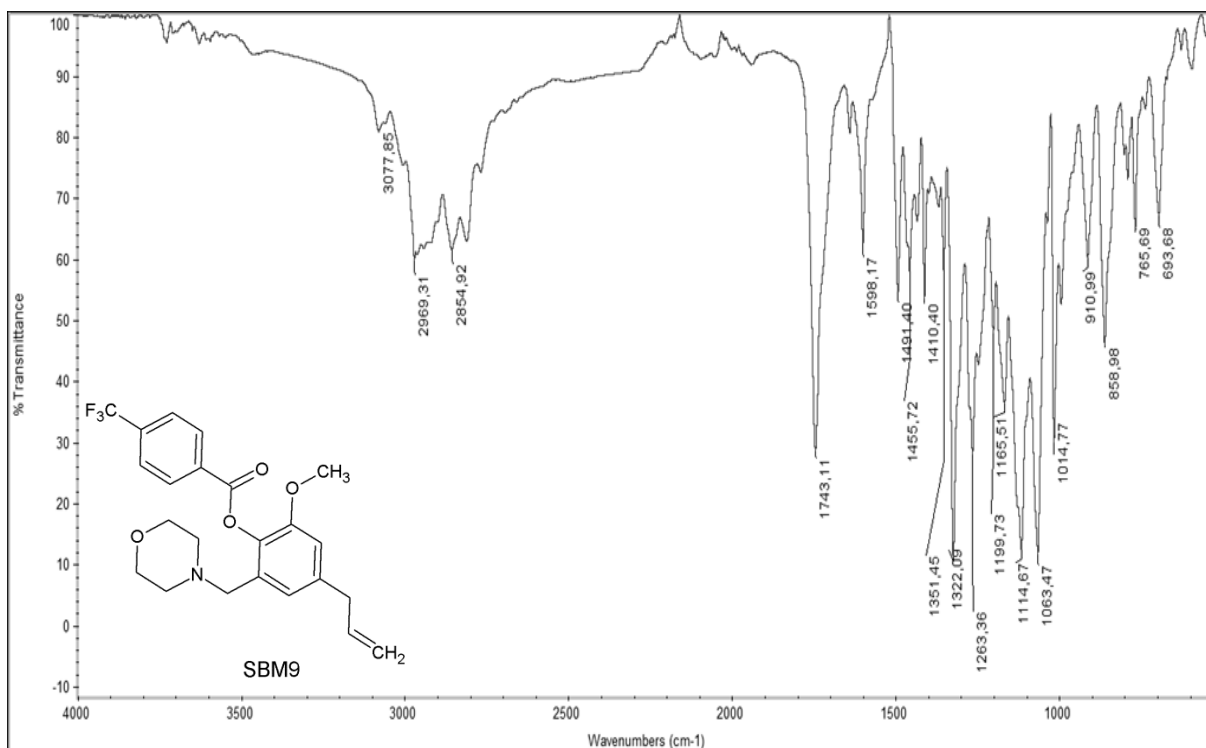
Espectro 3 - Espectro de absorção na região do IV da substância **SBM4** (cm⁻¹).



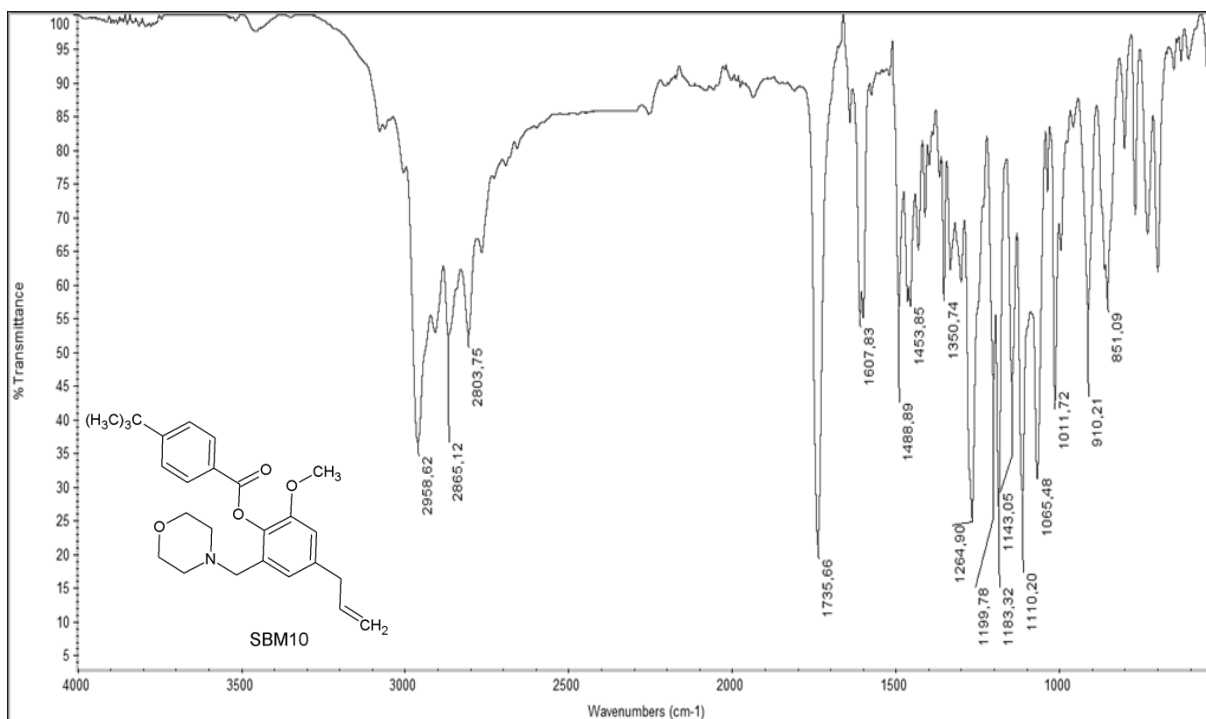
Espectro 4 - Espectro de absorção na região do IV da substância **SBM5** (cm⁻¹).



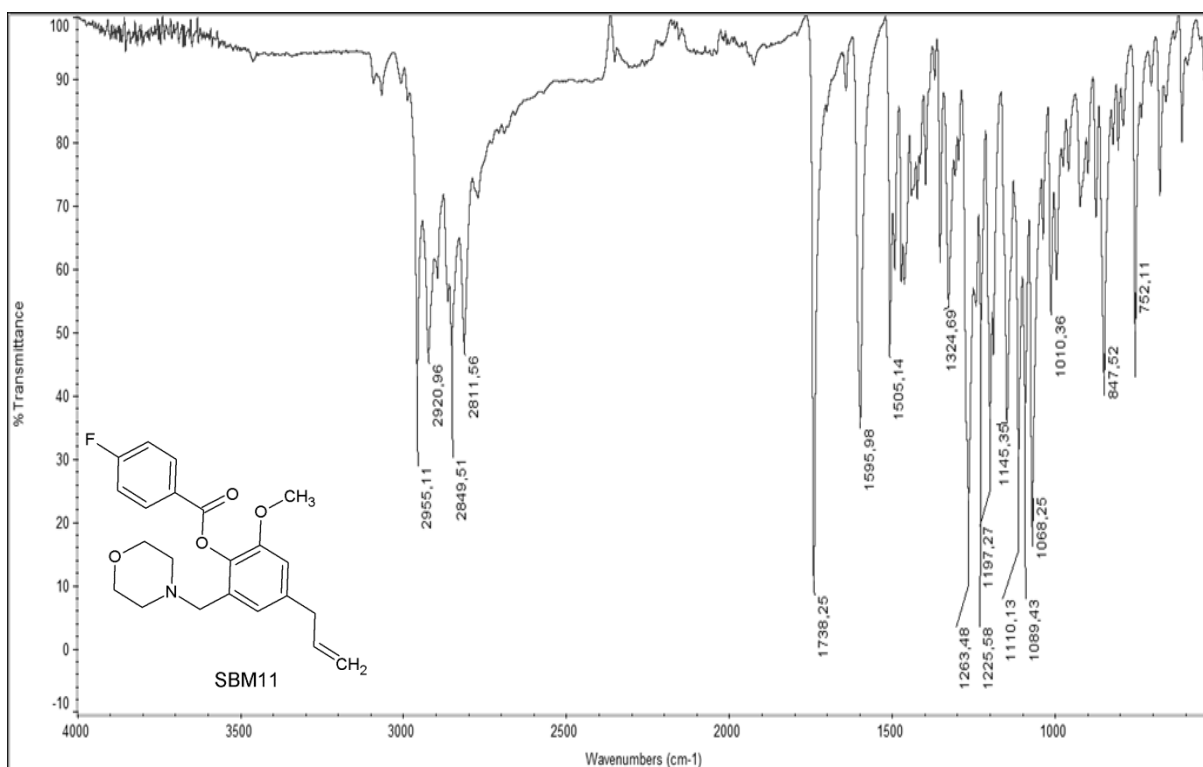
Espectro 5 - Espectro de absorção na região do IV da substância **SBM8** (cm⁻¹).



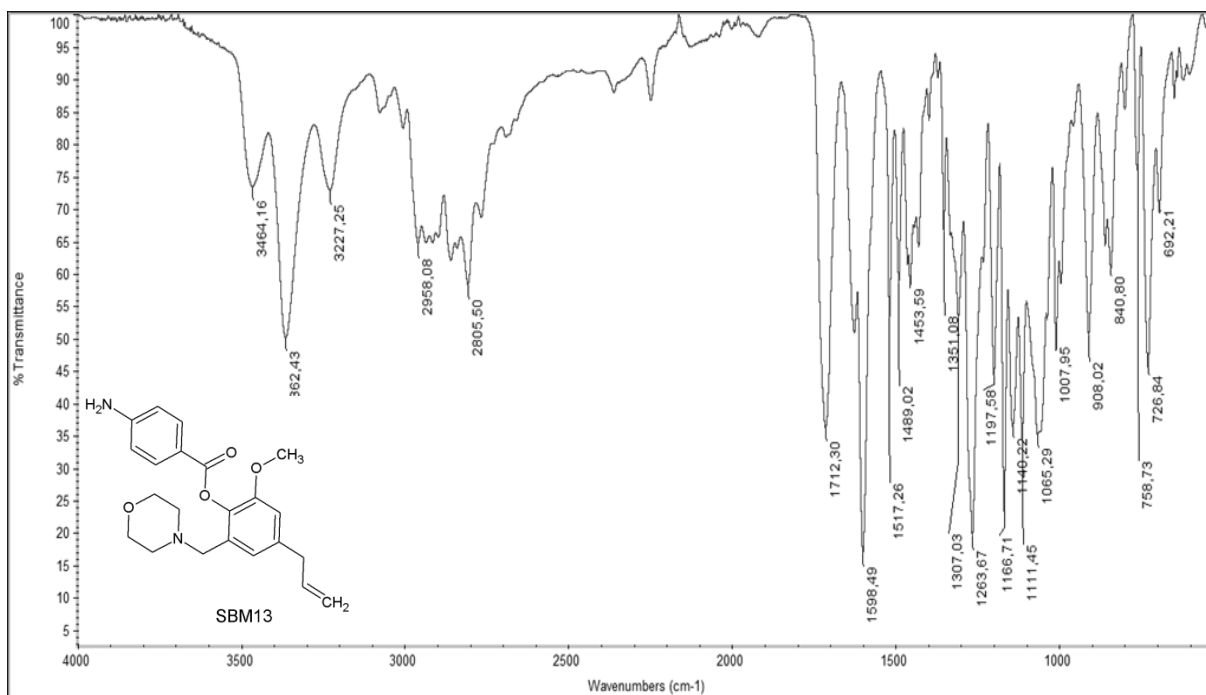
Espectro 6 - Espectro de absorção na região do IV da substância **SBM9** (cm⁻¹).



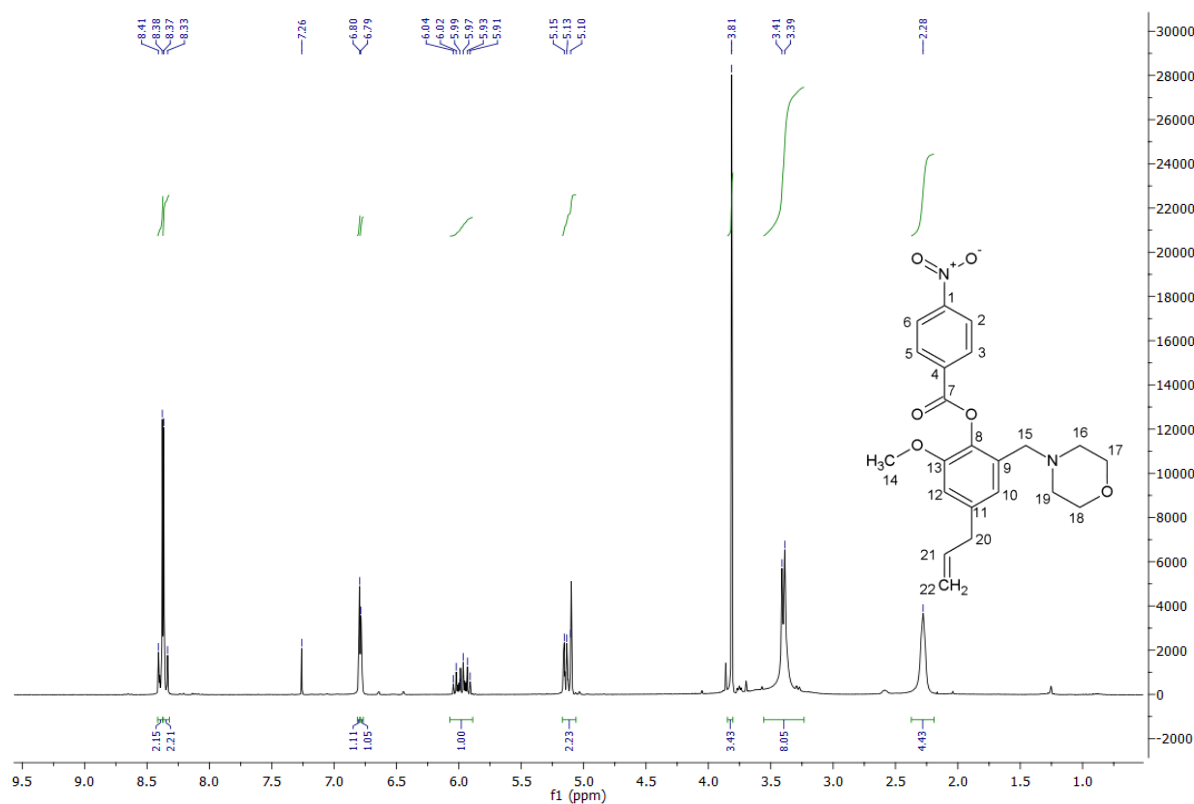
Espectro 7 - Espectro de absorção na região do IV da substância **SBM10** (cm⁻¹).



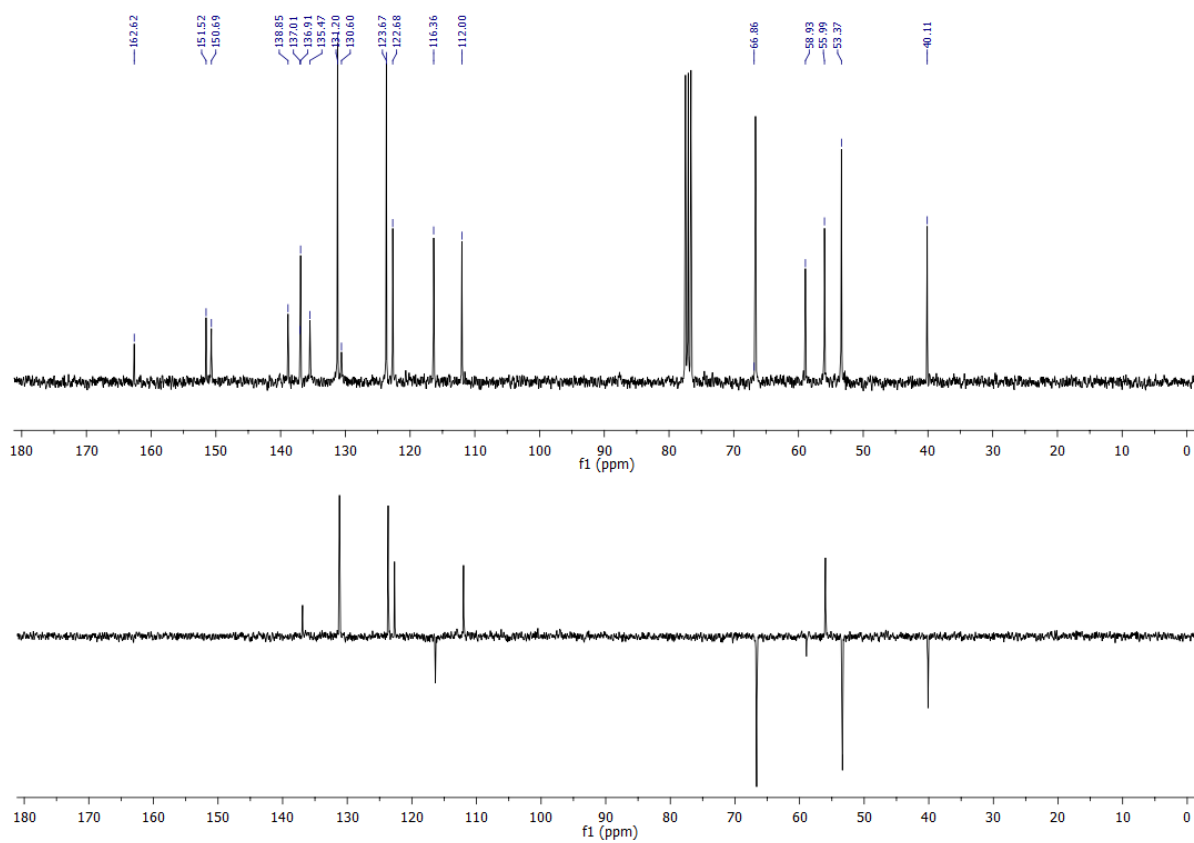
Espectro 8 - Espectro de absorção na região do IV da substância **SBM11** (cm⁻¹).



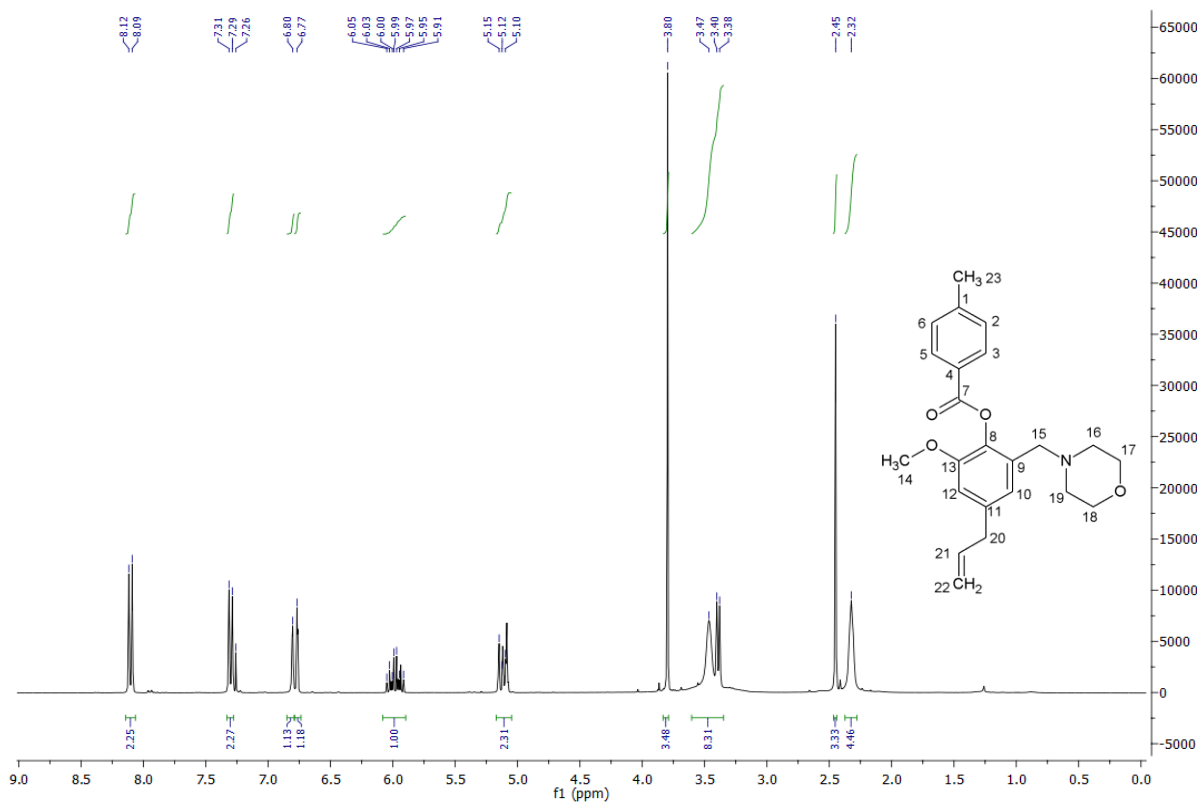
Espectro 9 - Espectro de absorção na região do IV da substância **SBM13** (cm⁻¹).



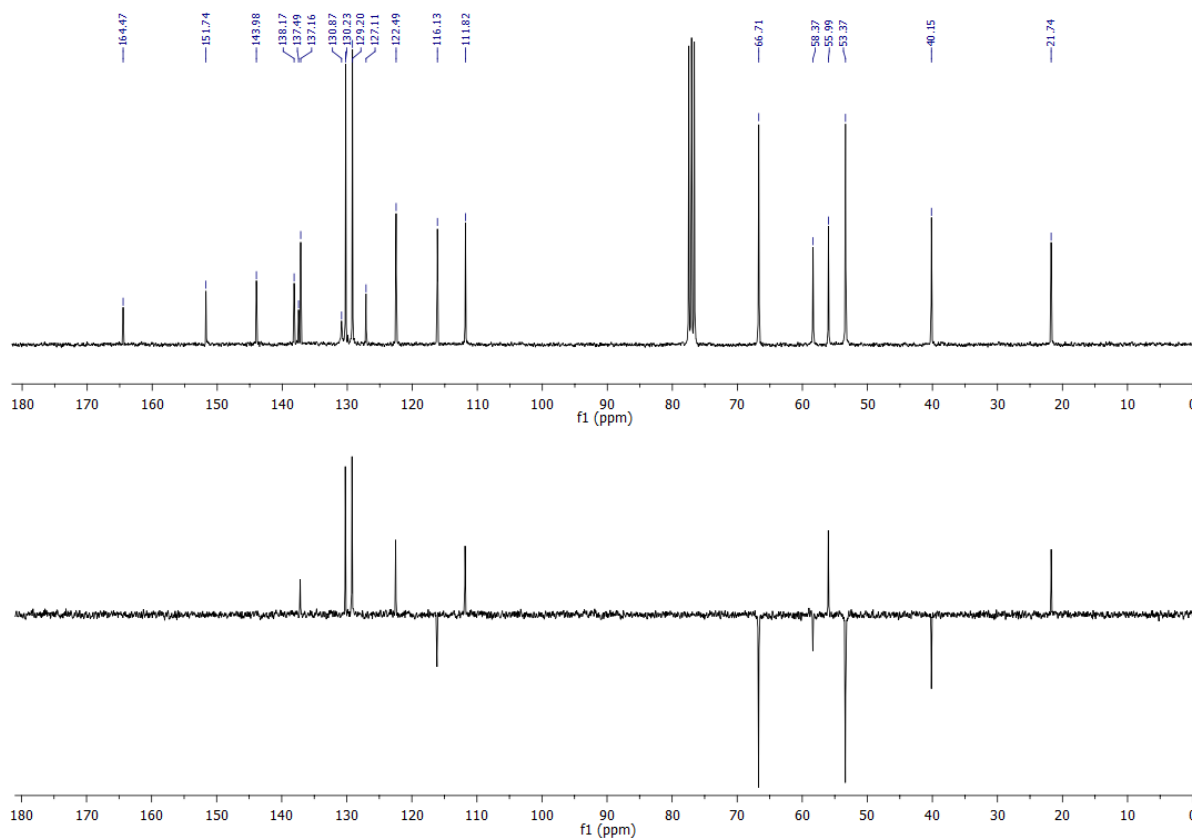
Espectro 12 - Espectro de RMN de ¹H da substância **SBM3** (CDCl₃, 300 MHz).



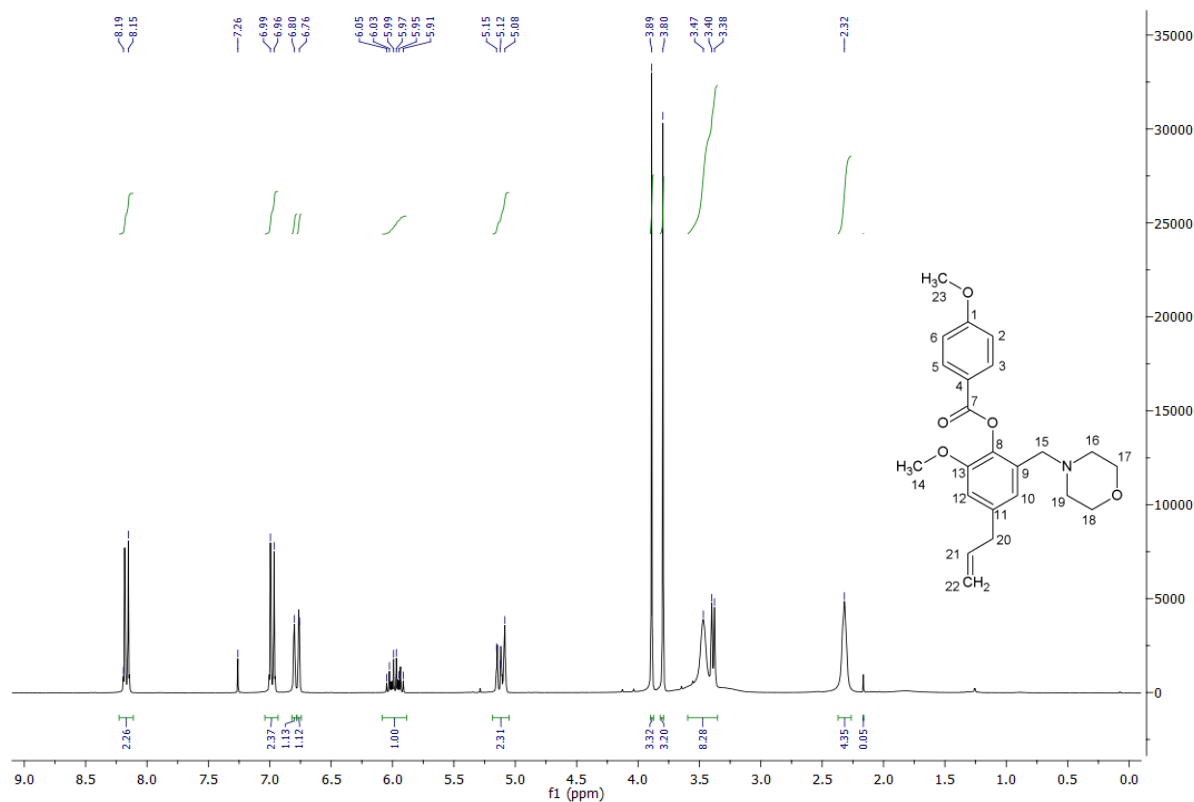
Espectro 13 - Espectro de RMN de ¹³C e Subespectro DEPT-135 de ¹³C da substância **SBM3** (CDCl₃, 75 MHz).



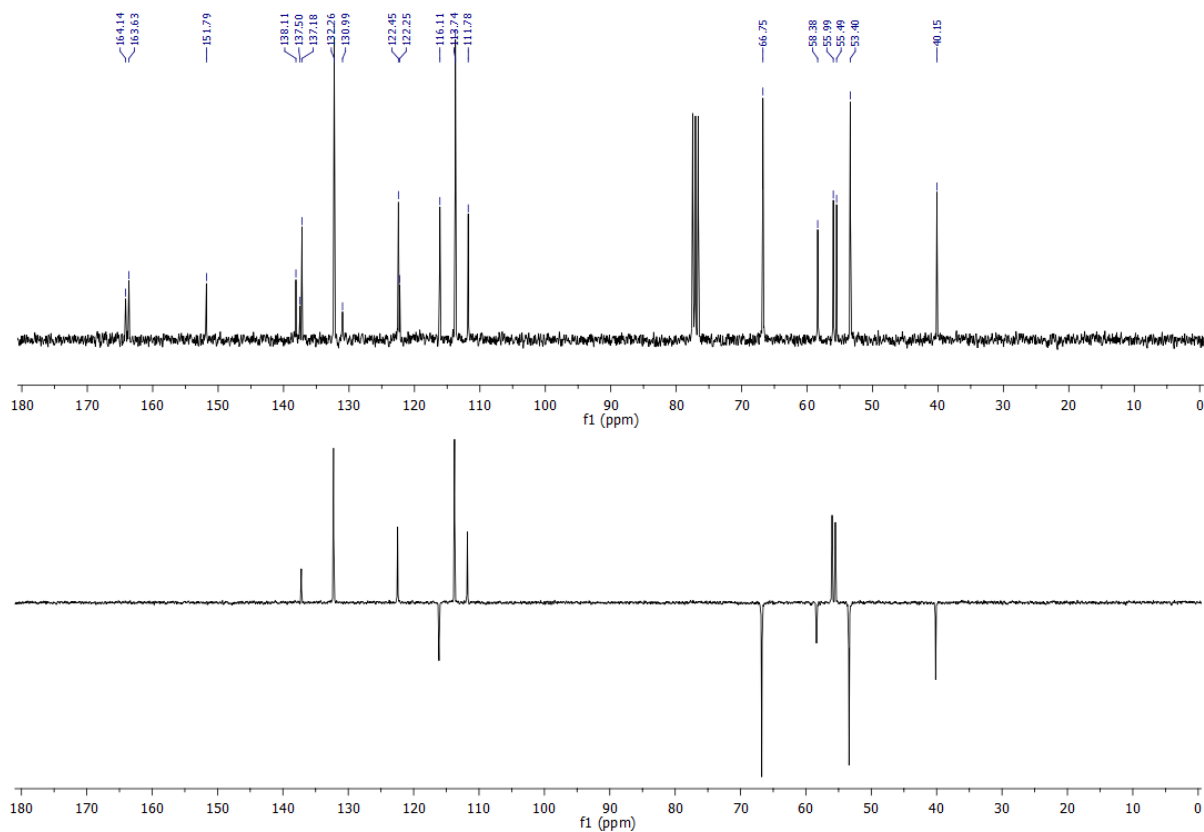
Espectro 14 - Espectro de RMN de ^1H da substância **SBM4** (CDCl_3 , 300 MHz).



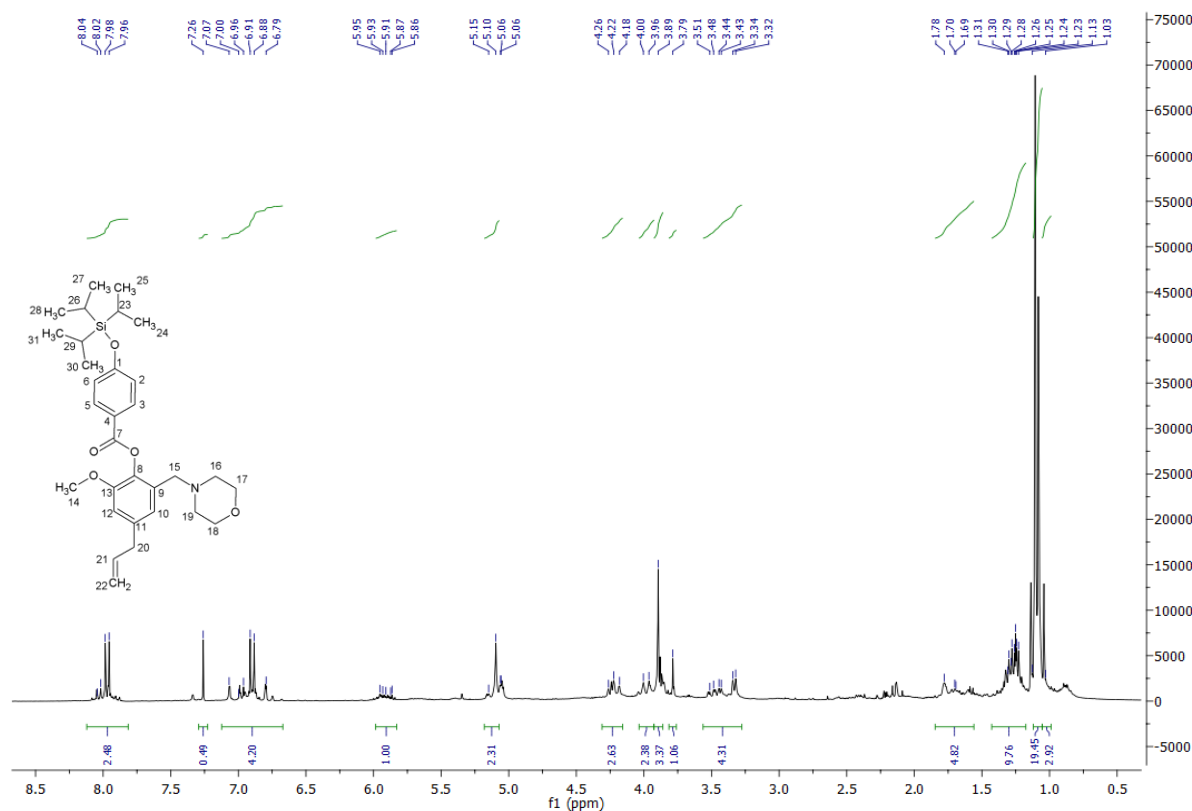
Espectro 15 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **SBM4** (CDCl_3 , 75 MHz).



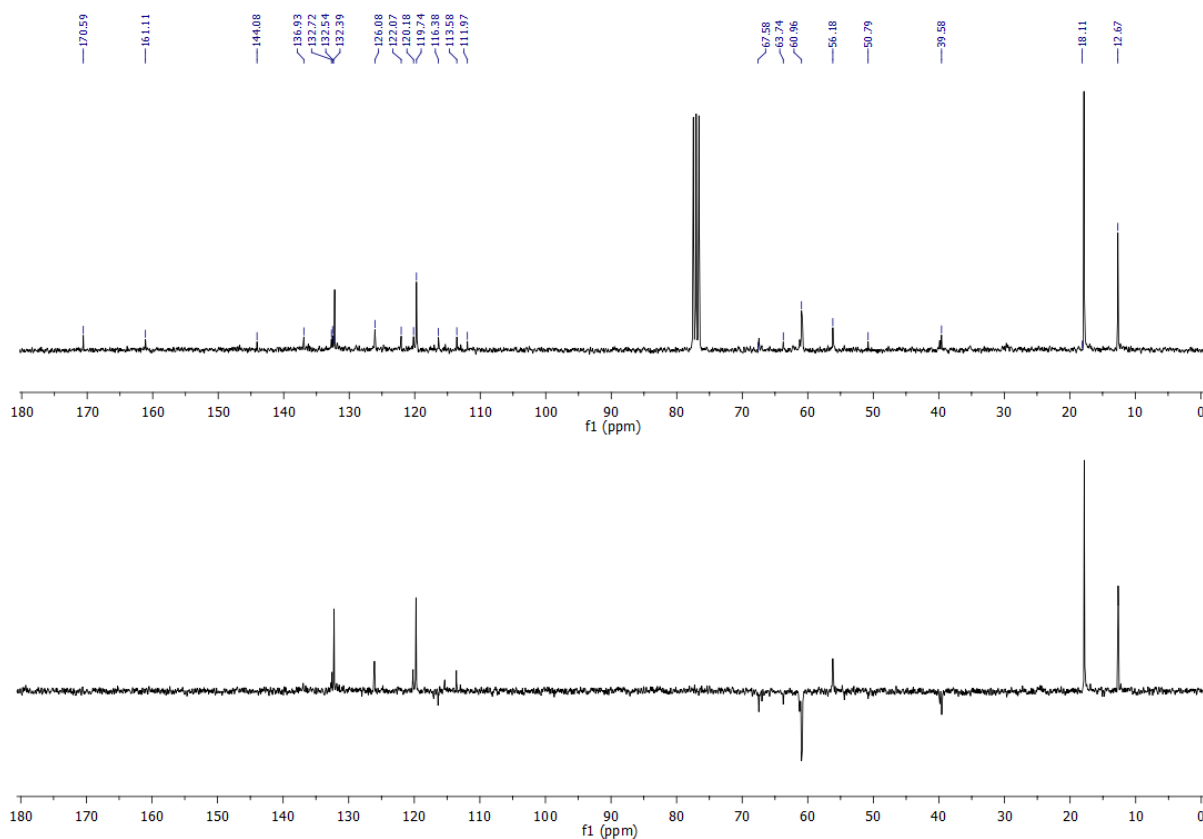
Espectro 16 - Espectro de RMN de ¹H da substância **SBM5** (CDCl₃, 300 MHz).



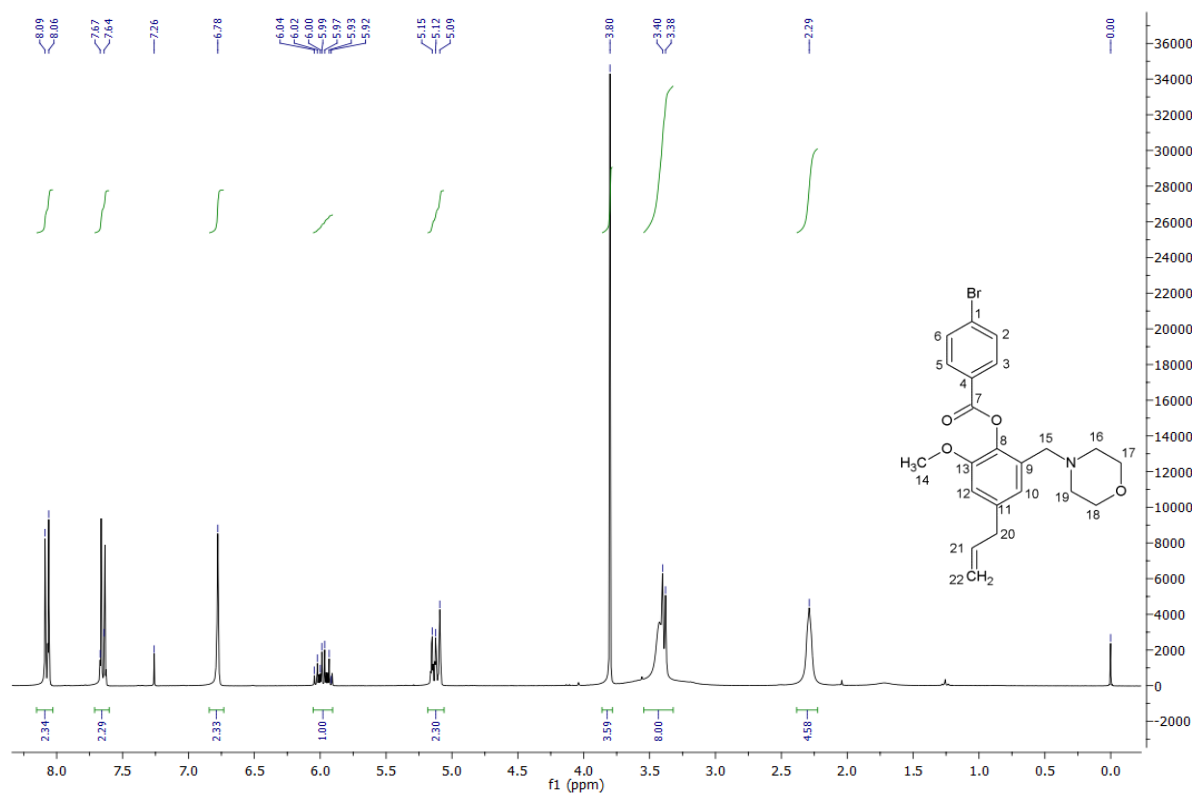
Espectro 17 - Espectro de RMN de ¹³C e Subespectro DEPT-135 de ¹³C da substância **SBM5** (CDCl₃, 75 MHz).



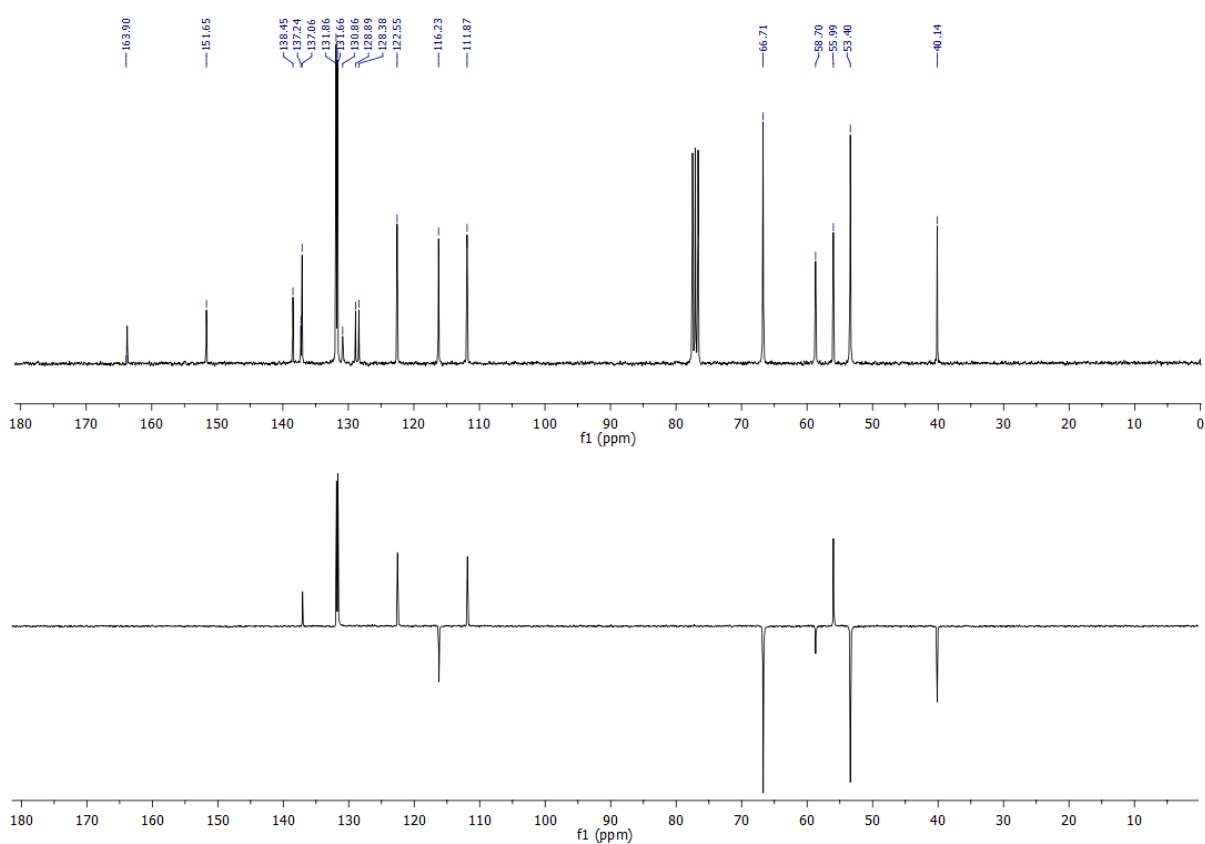
Espectro 18 - Espectro de RMN de ^1H da substância éster *p*-(Triisopropilsiloxi)benzoato de base de Mannich (CDCl_3 , 300 MHz).



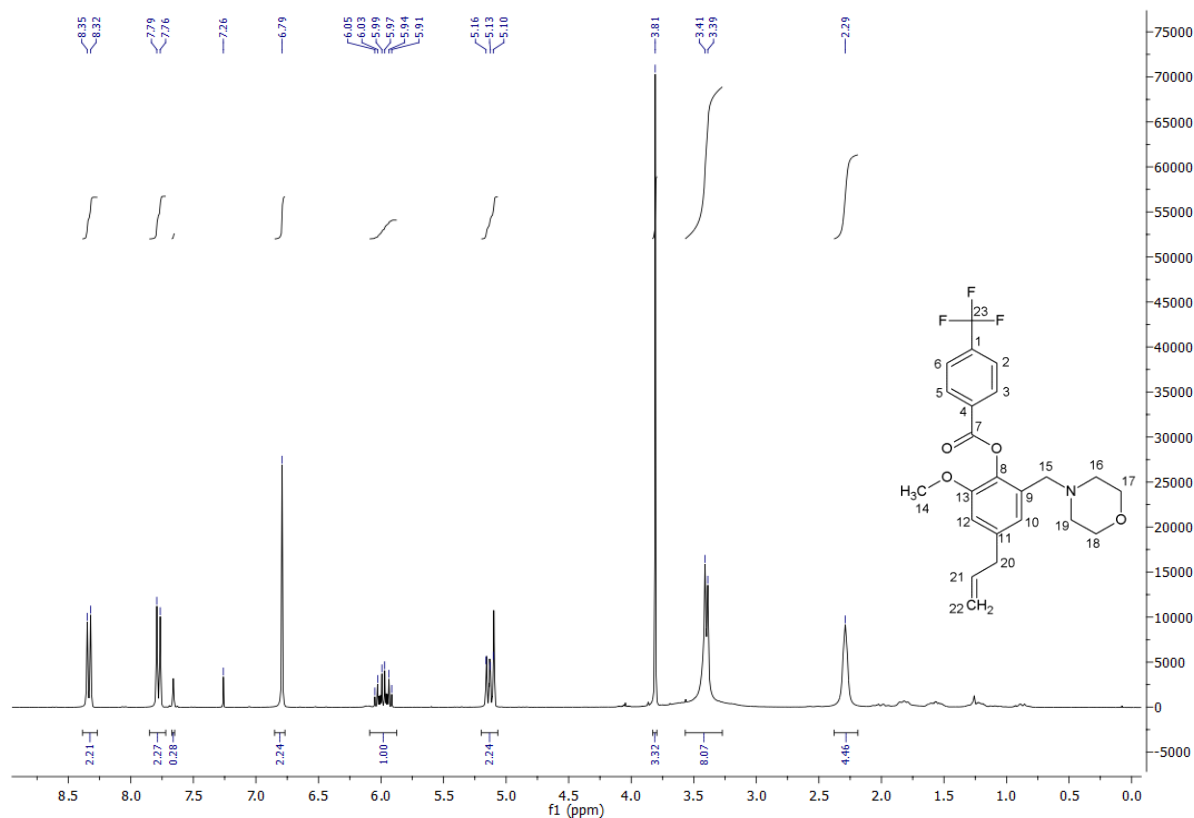
Espectro 19 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância éster *p*-(Triisopropilsiloxi)benzoato de base de Mannich (CDCl_3 , 75 MHz).



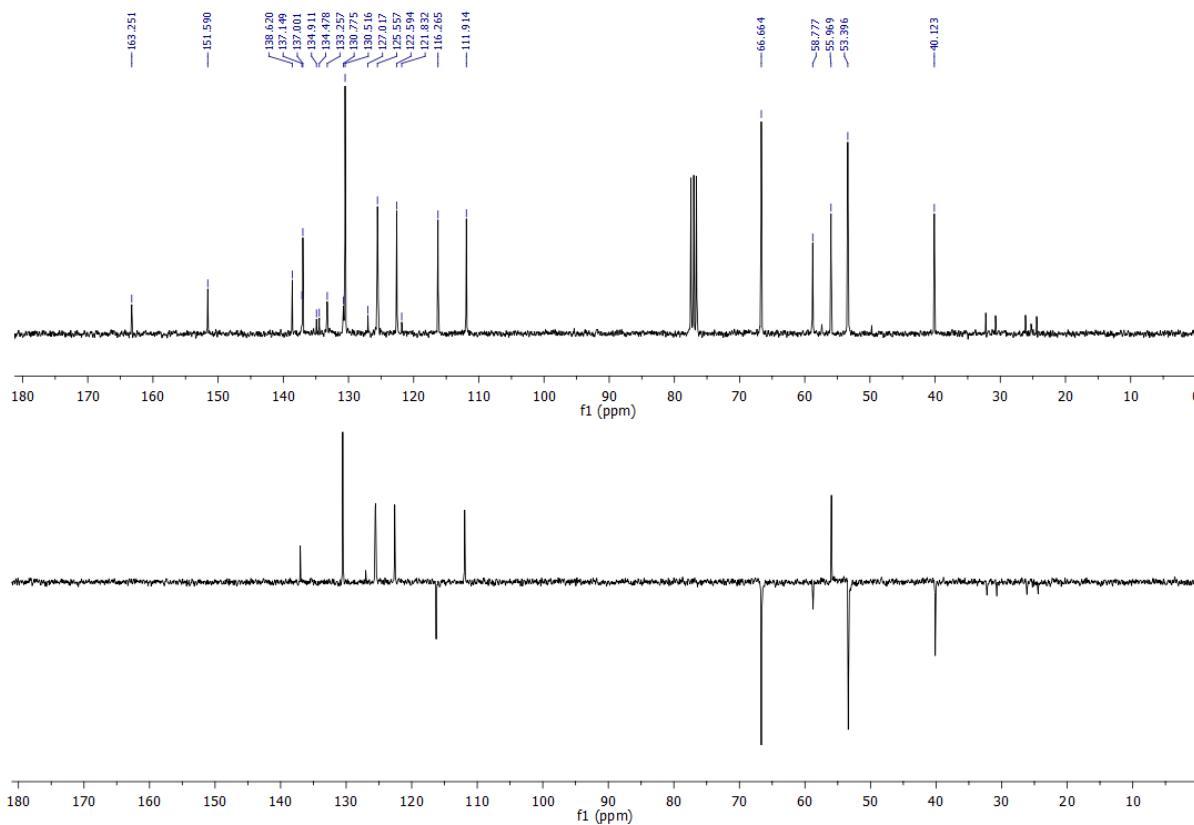
Espectro 20 - Espectro de RMN de ^1H da substância **SBM8** (CDCl_3 , 300 MHz).



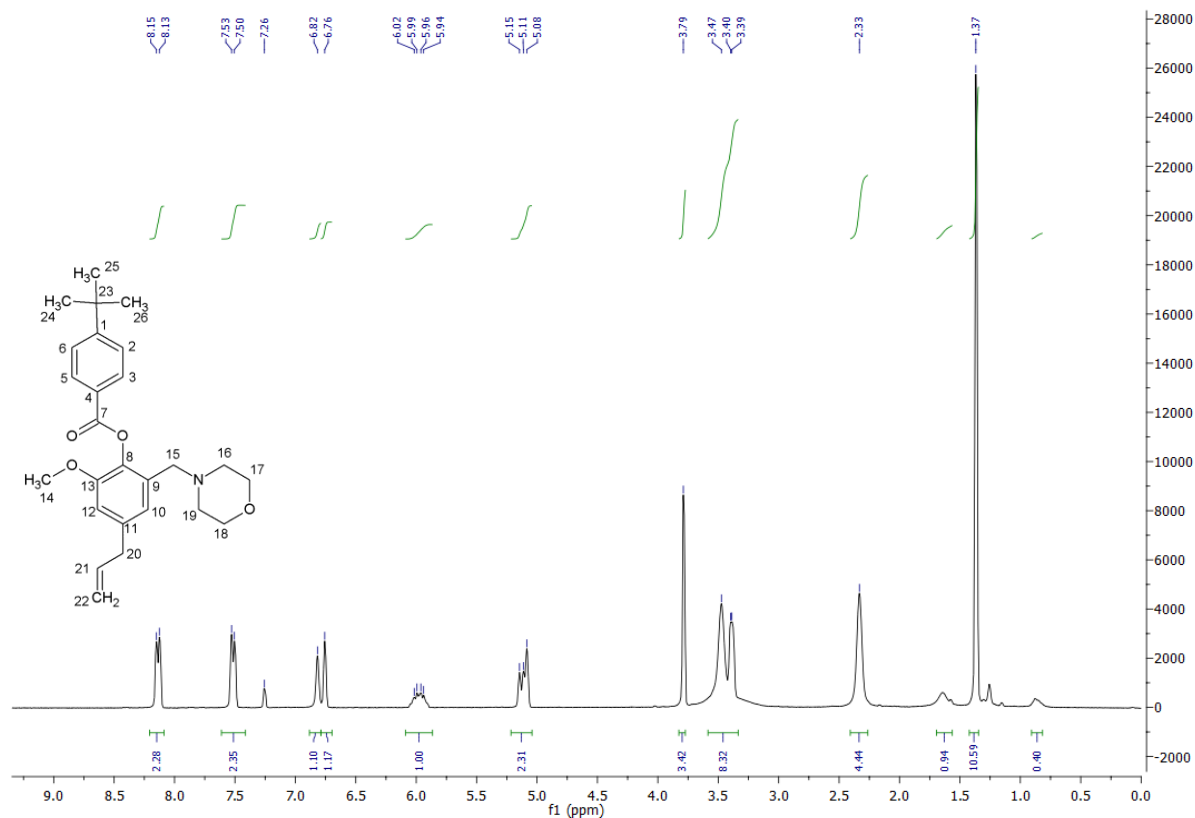
Espectro 21 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **SBM8** (CDCl_3 , 75 MHz).



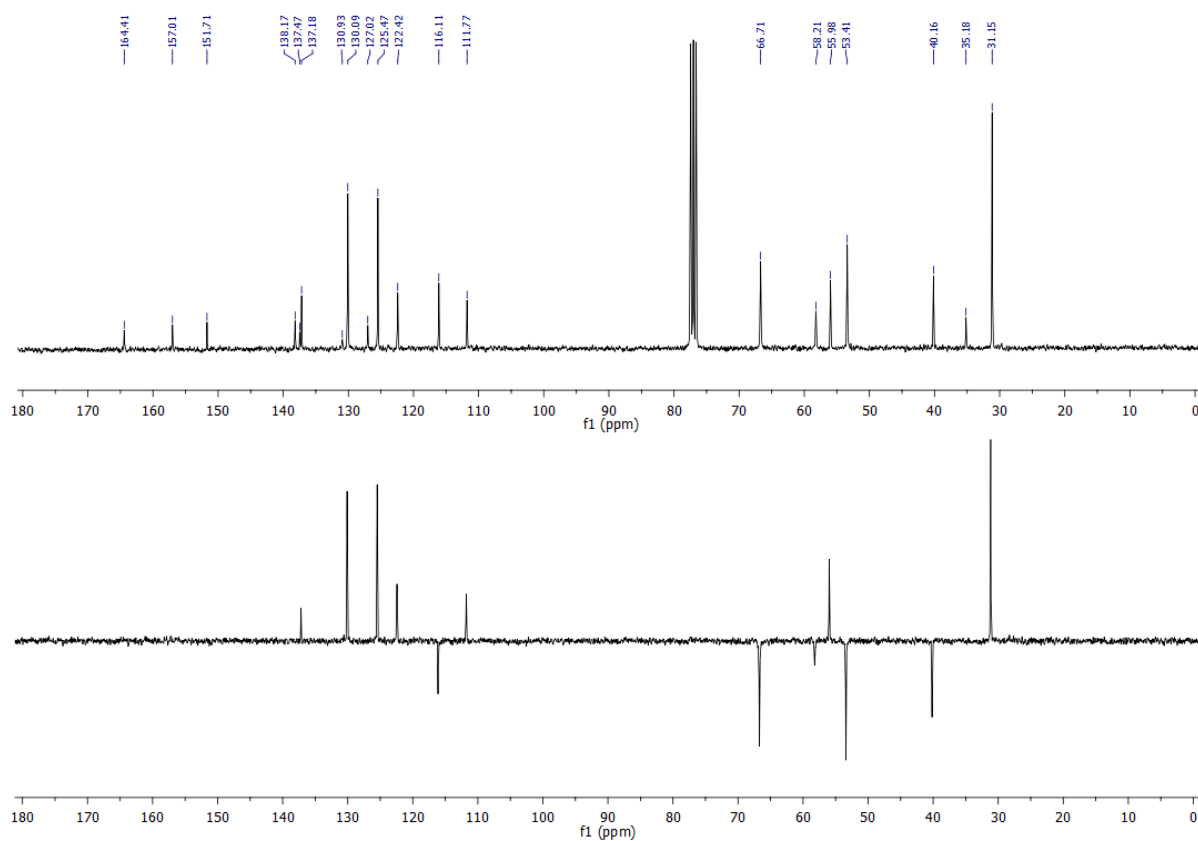
Espectro 22 - Espectro de RMN de ^1H da substância **SBM9** (CDCl_3 , 300 MHz).



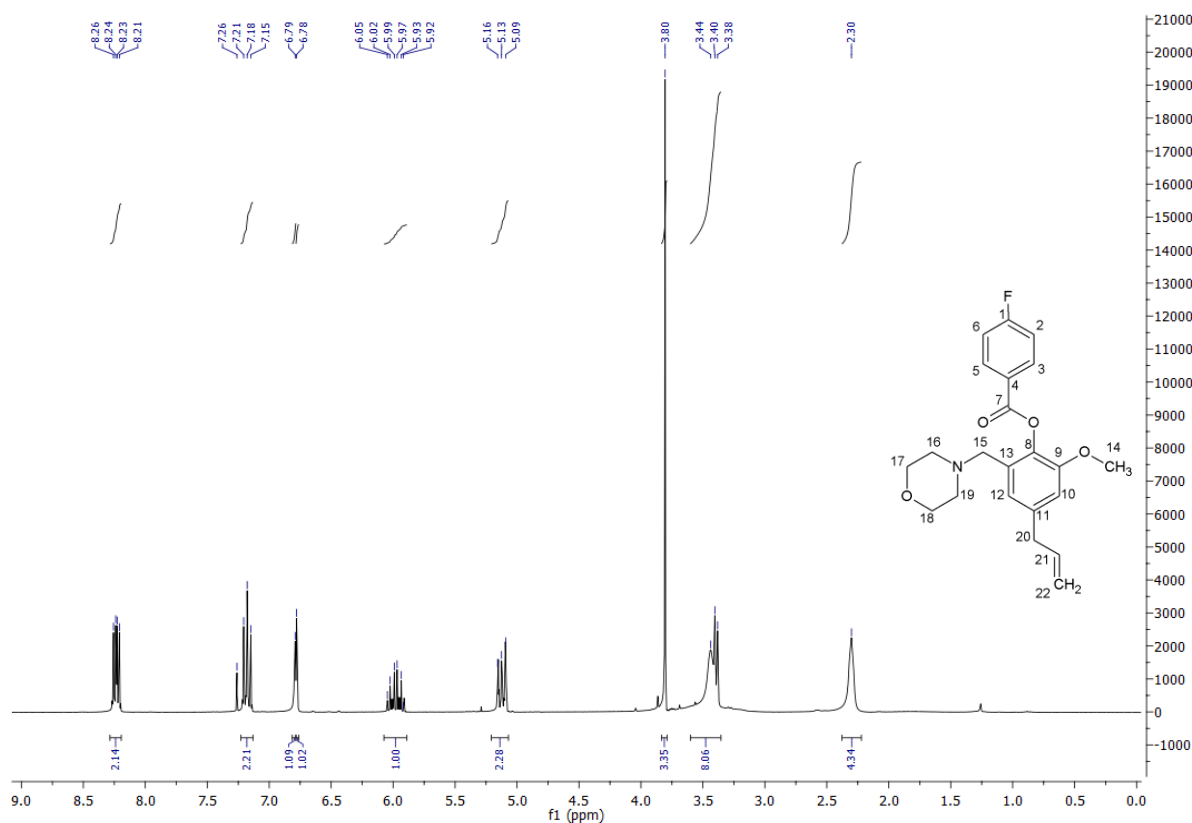
Espectro 23 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **SBM9** (CDCl_3 , 75 MHz).



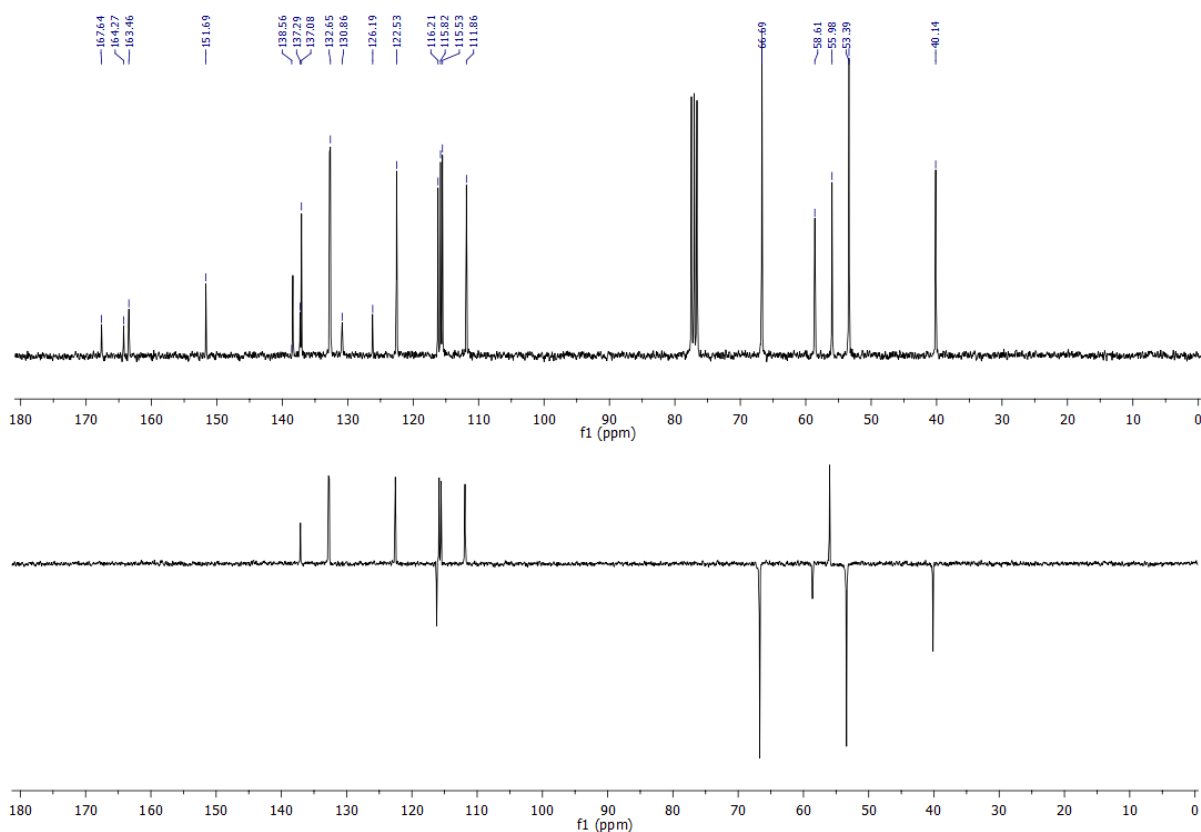
Espectro 24 - Espectro de RMN de ^1H da substância **SBM10** (CDCl_3 , 300 MHz).



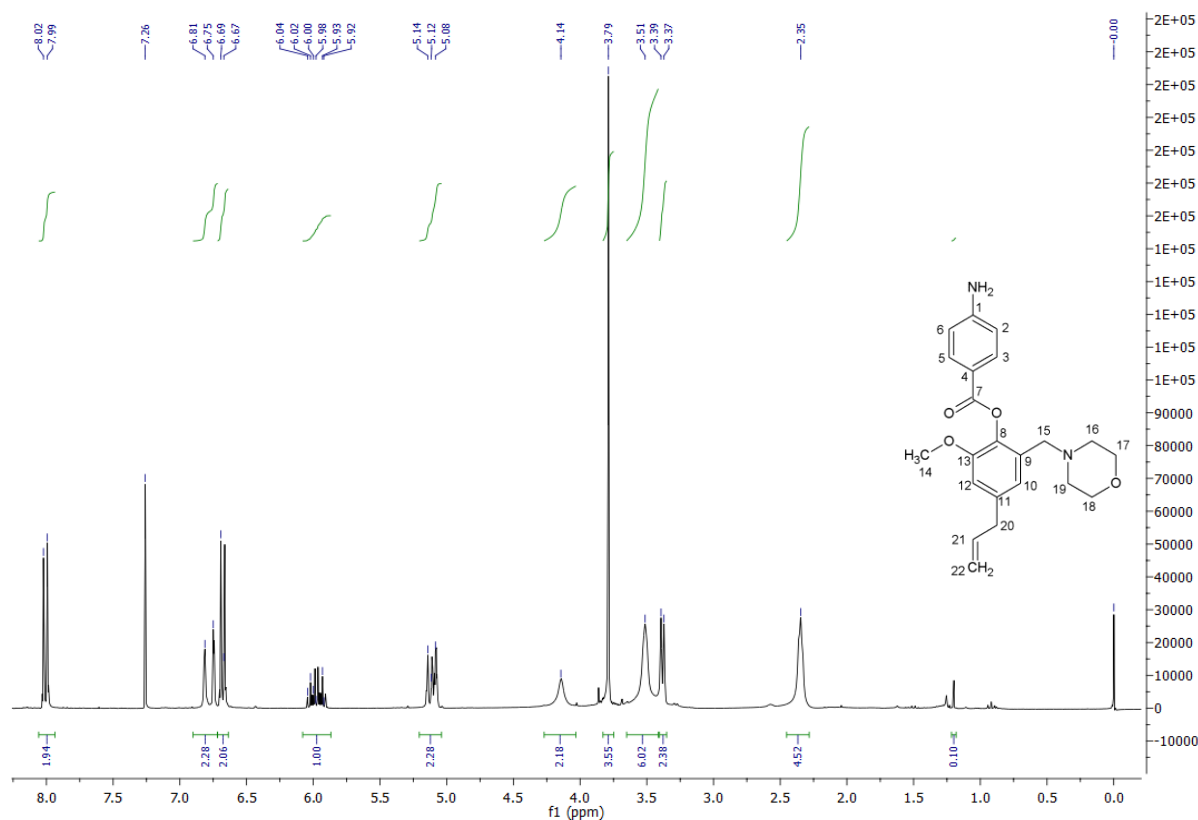
Espectro 25 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **SBM10** (CDCl_3 , 75 MHz).



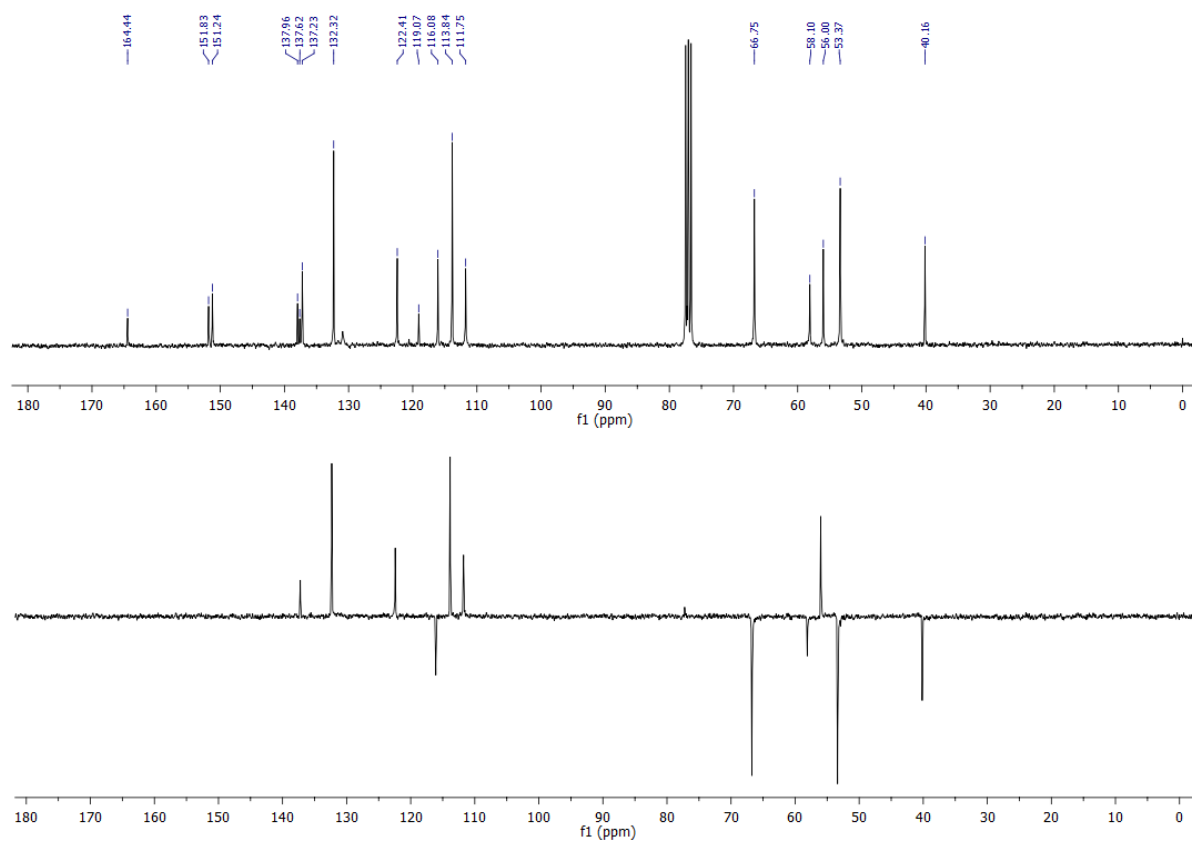
Espectro 26 - Espectro de RMN de ^1H da substância **SBM11** (CDCl_3 , 300 MHz).



Espectro 27 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **SBM11** (CDCl_3 , 75 MHz).



Espectro 28 - Espectro de RMN de ^1H da substância **SBM13** (CDCl_3 , 300 MHz).



Espectro 29 - Espectro de RMN de ^{13}C e Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **SBM13** (CDCl_3 , 75 MHz).

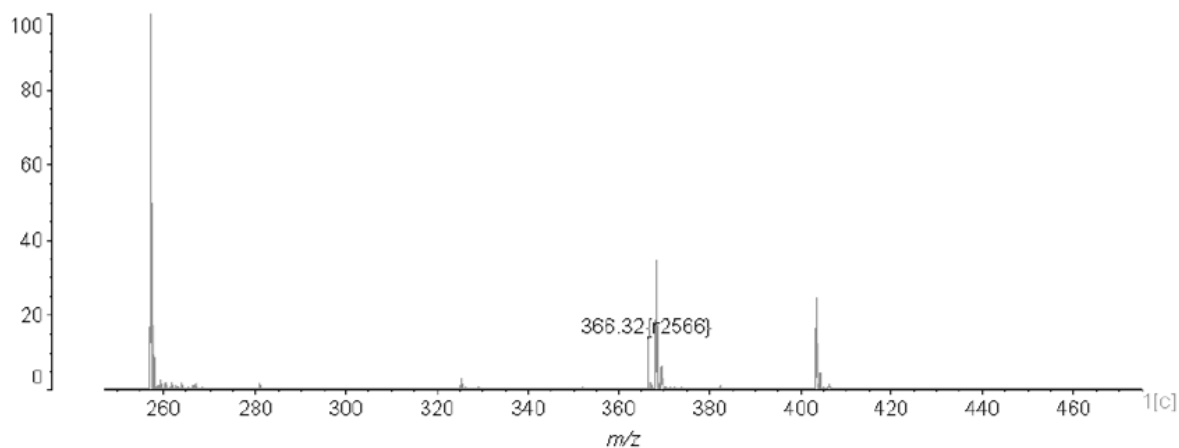
APÊNDICE C - Espectros de massas.

Performance

Data: SBM20001.A2[c] 22 Jun 2017 14:13 Cal: SEL_tof 22 Jun 2017 14:12

Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624: Mode Reflectron, Power: 80, P.Ext. @ 100 (bin 48)

%Int. 94 mV[sum= 28201 mV] Profiles 1-300 Smooth Gauss 5 -Baseline 15

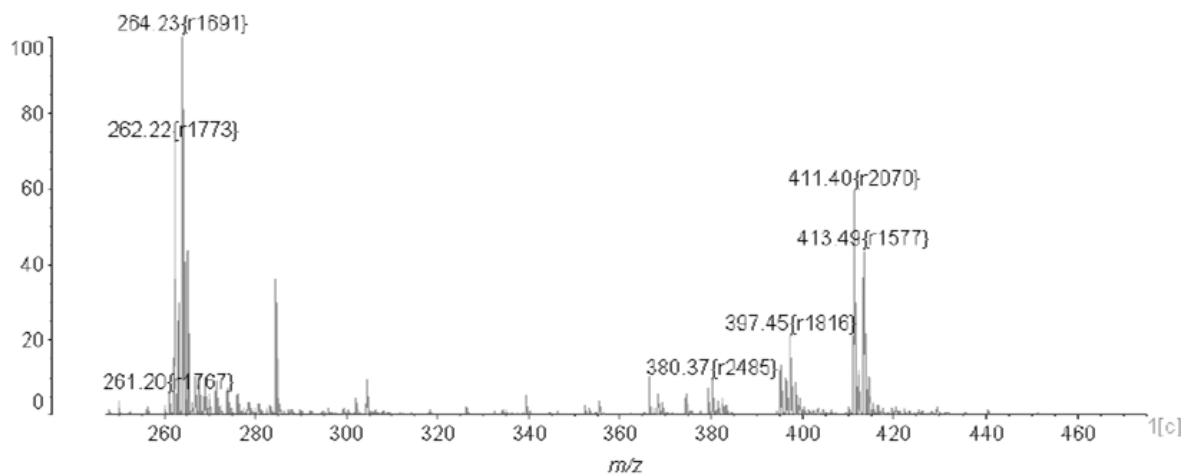
Espectro 30 - Espectro de massas da substância **SBM2**.

Performance

Data: SBM30001.A3[c] 22 Jun 2017 14:33 Cal: SBL_tof 22 Jun 2017 14:12

Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110524: Mode Reflectron, Power: 80, P.Ext. @ 100 (bin 48)

%Int. 43 mV[sum= 12986 mV] Profiles 1-300 Smooth Gauss 5 -Baseline 15

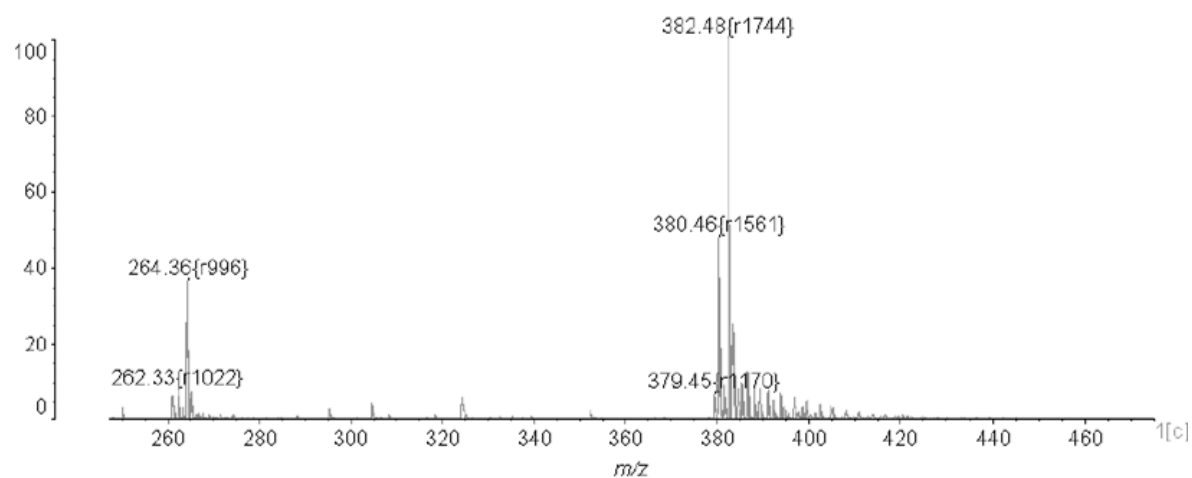
Espectro 31 - Espectro de massas da substância **SBM3**

Performance

Data: SBM40002.B4[c] 22 Jun 2017 15:13 Cal: SBL_tof 22 Jun 2017 14:12

Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624. Mode Reflectron, Power: 80, P.Ext. @ 100 (bin 48)

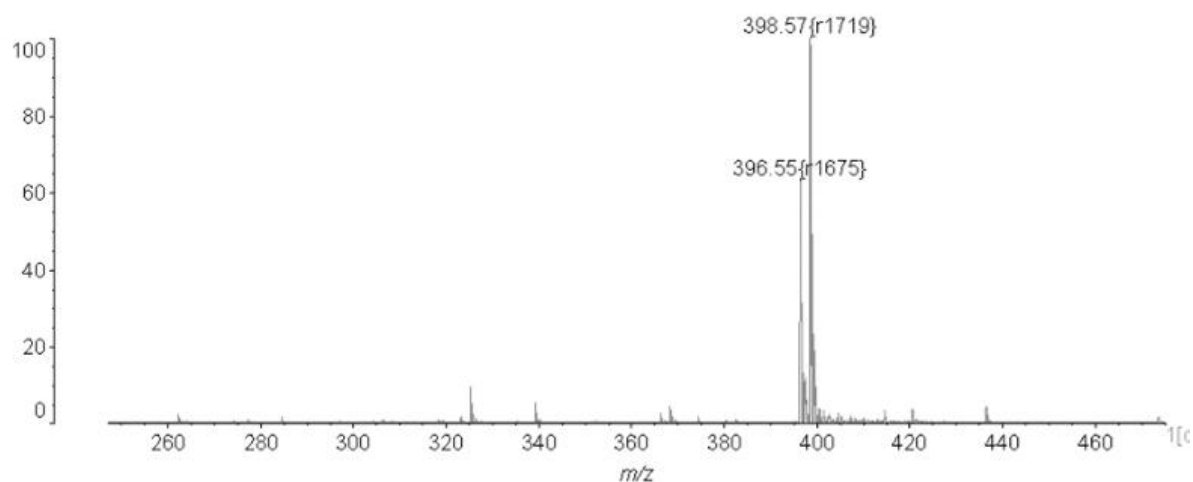
%Int. 99 mV[sum= 29762 mV] Profiles 1-300 Smooth Gauss 5 -Baseline 15

Espectro 32 - Espectro de massas da substância **SBM4**

Data: SBM50001.C2[c] 22 Jun 2017 15:32 Cal: SBL_tof 22 Jun 2017 14:12

Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624. Mode Reflectron, Power: 80, P.Ext. @ 100 (bin 48)

%Int. 118 mV[sum= 35366 mV] Profiles 1-300 Smooth Gauss 5 -Baseline 15

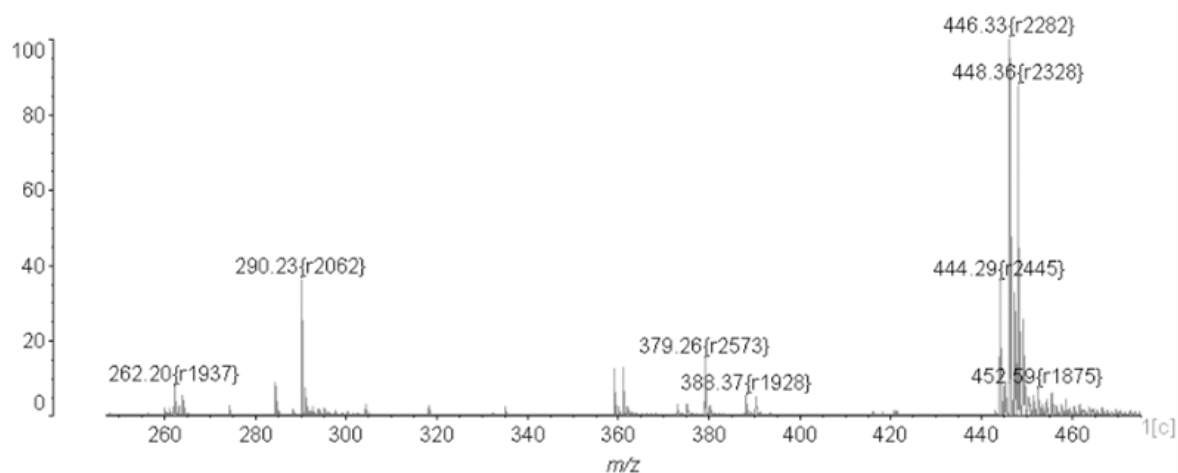
Espectro 33 - Espectro de massas da substância **SBM5**.

Performance

Data: SBM80002.A5[c] 26 Jun 2017 8:12 Cal: SBL_tof 22 Jun 2017 14:12

Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624: Mode Reflectron, Power: 80, P.Ext. @ 100 (bin 48)

%Int. 684 mV[sum= 205301 mV] Profiles 1-300 Smooth Gauss 5 -Baseline 15

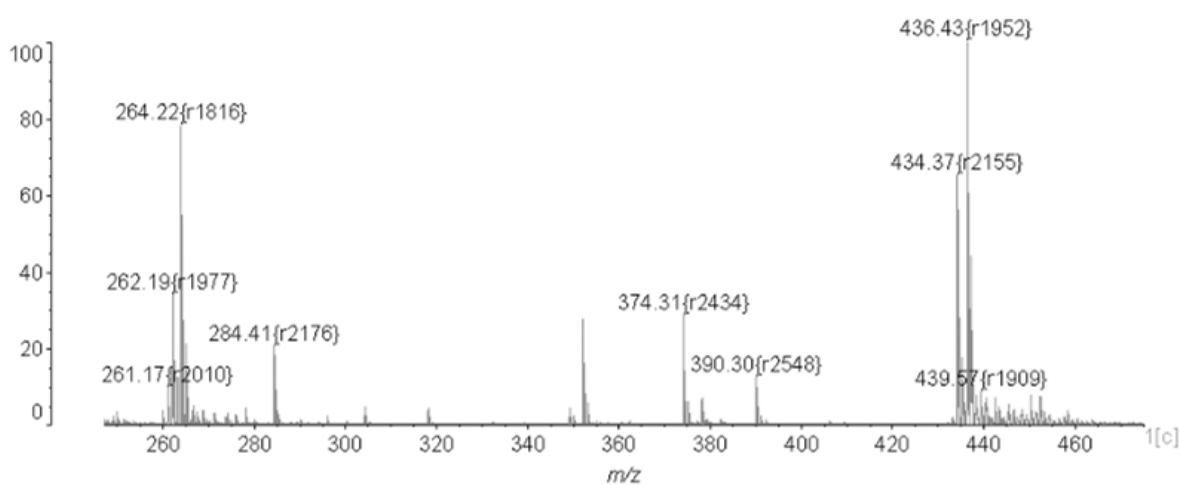
Espectro 34 - Espectro de massas da substância **SBM8**.

Performance

Data: SBM90001.A6[c] 26 Jun 2017 8:20 Cal: SBL_tof 22 Jun 2017 14:12

Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624: Mode Reflectron, Power: 80, P.Ext. @ 100 (bin 48)

%Int. 593 mV[sum= 177825 mV] Profiles 1-300 Smooth Gauss 5 -Baseline 15

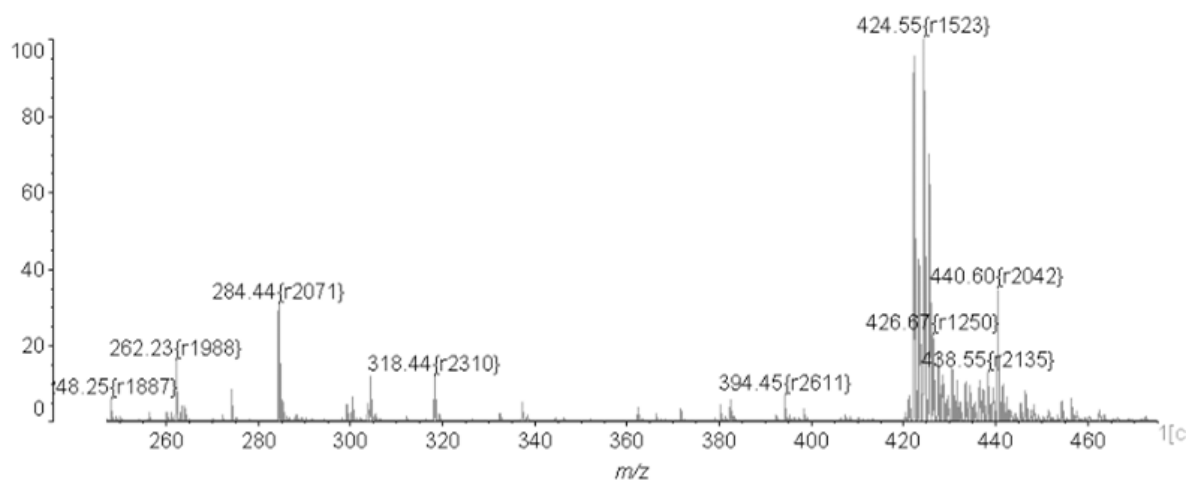
Espectro 35 - Espectro de massas da substância **SBM9**.

Performance

Data: SBM100002.B7[c] 26 Jun 2017 8:38 Cal: SBL_tof 22 Jun 2017 14:12

Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624: Mode Reflectron, Power: 80, P.Ext. @ 100 (bin 48)

%Int. 644 mV[sum= 193290 mV] Profiles 1-300 Smooth Gauss 5 -Baseline 15



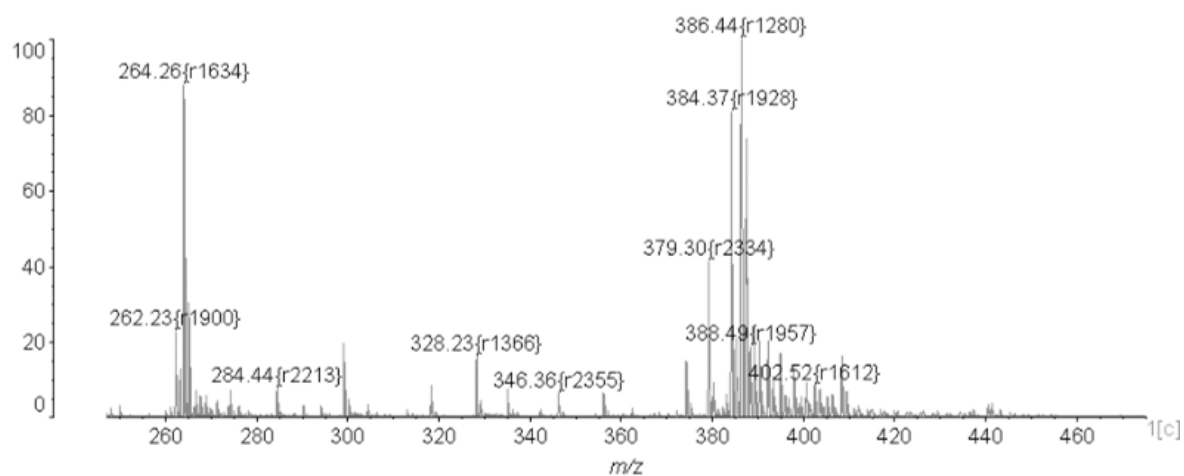
Espectro 36 - Espectro de massas da substância **SBM10**.

Performance

Data: SBM110002.B8[c] 26 Jun 2017 8:50 Cal: SBL_tof 22 Jun 2017 14:12

Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624: Mode Reflectron, Power: 80, P.Ext. @ 100 (bin 48)

%Int. 795 mV[sum= 238419 mV] Profiles 1-300 Smooth Gauss 5 -Baseline 15



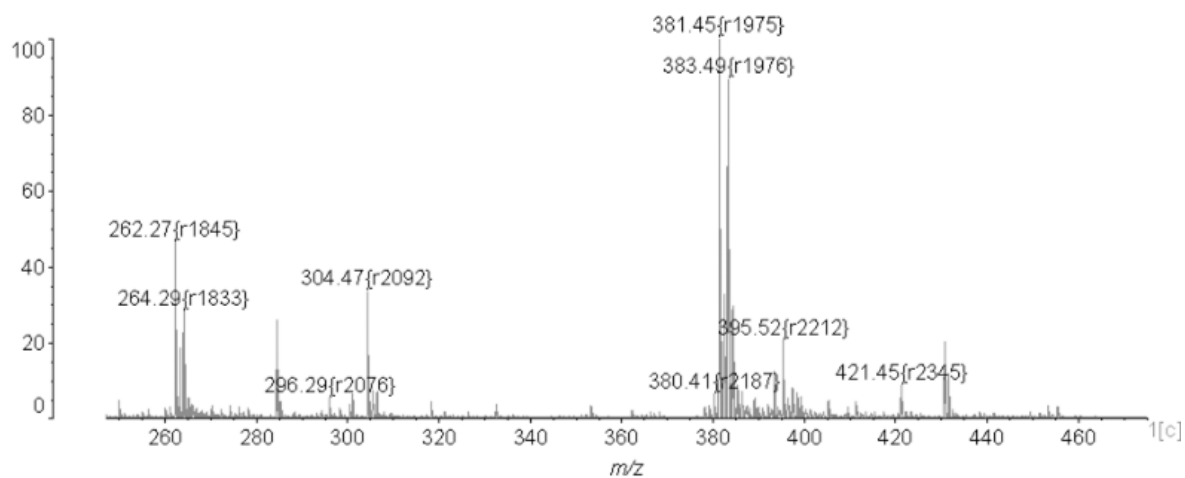
Espectro 37 - Espectro de massas da substância **SBM11**.

Performance

Data: SBM130001.C6[c] 26 Jun 2017 9:07 Cal: SBL_tof 22 Jun 2017 14:12

Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624: Mode Reflectron, Power: 80, P.Ext. @ 100 (bin 48)

%Int. 140 mV[sum= 41946 mV] Profiles 1-300 Smooth Gauss 5 -Baseline 15



Espectro 38 - Espectro de massas da substância **SBM13**.

APÊNDICE D - Conteúdo dos arquivos de parâmetros .MDP

Minimização (EM.mdp)

```

title          = Minimization; Title of run

; Parameters describing what to do, when to stop and what to save
integrator     = steep          ; Algorithm (steep = steepest descent minimization)
emtol         = 1000.0        ; Stop minimization when the maximum force < 10.0 kJ/mol
emstep        = 0.01         ; Energy step size
nsteps        = 100          ; Maximum number of (minimization) steps to perform
energygrps    = Protein      ; Which energy group(s) to write to disk

; Parameters describing how to find the neighbors of each atom and how to calculate the
interactions
nstlist        = 1           ; Frequency to update the neighbor list and long range forces
ns_type        = grid        ; Method to determine neighbor list (simple, grid)
rlist          = 1.2         ; Cut-off for making neighbor list (short range forces)
coulombtype    = PME         ; Treatment of long range electrostatic interactions
rcoulomb       = 1.2         ; long range electrostatic cut-off
rvdw           = 1.2         ; long range Van der Waals cut-off
pbc            = xyz         ; Periodic Boundary Conditions (yes/no)

constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints        = none   ; all bonds (even heavy atom-H bonds) constrained
lincs_iter         = 1      ; accuracy of LINCS
lincs_order        = 4      ; also related to accuracy

; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step          = 0
; Part index is updated automatically on checkpointing (keeps files separate)
simulation_part    = 1
; mode for center of mass motion removal
comm-mode          = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcalcenergy      = 1

```

Equilíbrio NVT (NVT.mdp)

```

define         = -DPOSRES -DPOSRES-LIG ; position restrain the protein and ligand
; Run parameters
integrator     = sd          ;
nsteps        = 250000      ; 2 * 50000 = 100 ps
dt            = 0.002       ; 2 fs
; Output control
nstxout       = 100         ; save coordinates every 0.2 ps
nstvout       = 100         ; save velocities every 0.2 ps
nstenergy     = 100         ; save energies every 0.2 ps
nstlog        = 100         ; update log file every 0.2 ps
energygrps    = Protein
; Bond parameters
continuation   = no         ; first dynamics run

```

```

constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints = h-bonds ; all bonds (even heavy atom-H bonds) constrained
lincs_iter = 1 ; accuracy of LINCS
lincs_order = 4 ; also related to accuracy

; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step = 0
; Part index is updated automatically on checkpointing (keeps files separate)
simulation_part = 1
; mode for center of mass motion removal
comm-mode = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcalcenergy = 5

; Neighborsearching
ns_type = grid ; search neighboring grid cells
nstlist = 20 ; 10 fs
rlist = 1.2 ; short-range neighborlist cutoff (in nm)
rcoulomb = 1.2 ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw = 1.2 ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype = PME ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order = 4 ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.12 ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling
tcoupl = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
tc-grps = Protein Water_and_ions ; two coupling groups - more accurate
tau_t = 0.1 0.1 ; time constant, in ps
ref_t = 300 300 ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling
pcoupl = no ; no pressure coupling in NVT
; Periodic boundary conditions
pbc = xyz ; 3-D PBC
; Dispersion correction
DispCorr = EnerPres ; account for cut-off vdW scheme
; Velocity generation
gen_vel = yes ; assign velocities from Maxwell distribution
gen_temp = 300 ; temperature for Maxwell distribution
gen_seed = -1 ; generate a random seed

```

Equilibraco NPT (NPT.mdp)

```

define = -DPOSRES -DPOSRES-LIG ; position restrain the protein and ligand
; Run parameters
integrator = sd ;
nsteps = 250000 ; 2 * 50000 = 100 ps
dt = 0.002 ; 2 fs
; Output control
nstxout = 100 ; save coordinates every 0.2 ps
nstvout = 100 ; save velocities every 0.2 ps
nstenergy = 100 ; save energies every 0.2 ps
nstlog = 100 ; update log file every 0.2 ps
energygrps = Protein
; Bond parameters
continuation = no ; first dynamics run

```

```

constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints = h-bonds ; all bonds (even heavy atom-H bonds) constrained
lincs_iter = 1 ; accuracy of LINCS
lincs_order = 4 ; also related to accuracy

; For exact run continuation or redoing part of a run
;init_step = 0
; Part index is updated automatically on checkpointing (keeps files separate)
;simulation_part = 1
; mode for center of mass motion removal
comm-mode = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcalcenergy = 5
ld_seed = -1
; Neighborsearching
ns_type = grid ; search neighboring grid cells
nstlist = 5 ; 10 fs
rlist = 1.2 ; short-range neighborlist cutoff (in nm)
rcoulomb = 1.2 ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw = 1.2 ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype = PME ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order = 4 ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.12 ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling
tcoupl = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
tc-grps = Protein Water_and_ions ; two coupling groups - more accurate
tau_t = 0.1 0.1 ; time constant, in ps
ref_t = 300 300 ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling
pcoupl = Parrinello-Rahman ; pressure coupling is on for NPT
pcoupltype = isotropic ; unifromscaling of box vectors
tau_p = 2.0 2.0 ; time constant, in ps
ref_p = 1.0 1.0 ; reference pressure, in bar
refcoord-scaling = com ; restraint absolute
compressibility = 4.5e-5 ; isothermal compressibility of water, bar^-1
; Periodic boundary conditions
pbc = xyz ; 3-D PBC
; Dispersion correction
DispCorr = EnerPres ; account for cut-off vdW scheme
; Velocity generation
gen_vel = no ; velocity generation off after NVT
gen_temp = 300 ; temperature for Maxwell distribution
gen_seed = -1 ; generate a random seed

```

Simulação DM (DM.mdp)

```

; Run parameters
integrator = md ; leap-frog integrator
nsteps = 5000000 ; 2 * 1000000 = 1000 ps
dt = 0.002 ; 2 fs
; Output control
nstxout = 0 ; save coordinates every
nstvout = 0 ; save velocities every
nstenergy = 200 ; save energies every 0.4 ps

```

```

nstlog      = 200      ; update log file every 0.4 ps
nstxtcout   = 200      ; write .xtc trajectory every 0.4 ps
energygrps  = Protein
; Bond parameters
continuation = no      ; first dynamics run
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints  = h-bonds ; all bonds (even heavy atom-H bonds) constrained
lincs_iter   = 1       ; accuracy of LINCS
lincs_order  = 4       ; also related to accuracy

; For exact run continuation or redoing part of a run
;init_step   = 0
; Part index is updated automatically on checkpointing (keeps files separate)
;simulation_part = 1
; mode for center of mass motion removal
comm-mode    = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcalcenergy = 5

ld_seed      = -1
; Neighborsearching
ns_type      = grid    ; search neighboring grid cells
nstlist      = 5       ; 10 fs
rlist        = 1.2     ; short-range neighborlist cutoff (in nm)
rcoulomb     = 1.2     ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw         = 1.2     ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype  = PME     ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order    = 4       ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.12 ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling
tcoupl       = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
tc-grps      = Protein Water_and_ions ; two coupling groups - more accurate
tau_t        = 0.1 0.1 ; time constant, in ps
ref_t        = 300 300 ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling
pcoupl       = Parrinello-Rahman ; pressure coupling is on for NPT
pcoupltype   = isotropic ; unifromscaling of box vectors
tau_p        = 2.0 2.0 ; time constant, in ps
ref_p        = 1.0 1.0 ; reference pressure, in bar
;refcoord-scaling = com ; restraint absolute
compressibility = 4.5e-5 ; isothermal compressibility of water, bar^-1
; Periodic boundary conditions
pbc          = xyz     ; 3-D PBC
; Dispersion correction
DispCorr     = EnerPres ; account for cut-off vdW scheme
; Velocity generation
gen_vel      = no      ; velocity generation off after NVT

```