

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**UIARAN DE OLIVEIRA MAGALHÃES**

**MODELAGEM MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-  
ATIVIDADE ACOPLADOS A ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS,  
FARMACOCINÉTICOS E TOXICOLÓGICOS *IN SILICO* DE DERIVADOS  
HETEROCÍCLICOS COM ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

**Rio de Janeiro**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UIARAN DE OLIVEIRA MAGALHÃES**

**MODELAGEM MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-  
ATIVIDADE ACOPLADOS A ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS,  
FARMACOCINÉTICOS E TOXICOLÓGICOS *IN SILICO* DE DERIVADOS  
HETEROCÍCLICOS COM ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

---

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, Faculdade de  
Farmácia, Universidade Federal  
do Rio de Janeiro, como parte  
dos requisitos necessários para a  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas.

---

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues

**Rio de Janeiro**

**2009**

**UIARAN DE OLIVEIRA MAGALHÃES**

**MODELAGEM MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-  
ATIVIDADE ACOPLADOS A ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS,  
FARMACOCINÉTICOS E TOXICOLÓGICOS *IN SILICO* DE DERIVADOS  
HETEROCÍCLICOS COM ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

---

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, Faculdade de  
Farmácia, Universidade Federal  
do Rio de Janeiro, como parte  
dos requisitos necessários para a  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas.

---

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009

---

Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues  
Faculdade de Farmácia – UFRJ

---

Profa. Dra. Magaly Girão Albuquerque  
Instituto de Química – UFRJ

---

Profa. Dra. Alice Maria Rolim Bernardino  
Instituto de Química – UFF

---

Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral  
Faculdade de Farmácia – UFRJ

**Rio de Janeiro**

**2009**

## Ficha Catalográfica

Magalhães, Uiaran de Oliveira

Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Físico-Químicos, Farmacocinéticos e Toxicológicos *In Silico* de Derivados Heterocíclicos com Atividade Leishmanicida – 2009.

XX, 86f.:il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 2009.

Orientador: Carlos Rangel Rodrigues

1. Leishmanicidas 2. *Leishmania braziliensis*. 3. *Leishmania amazonensis*. 4. Modelagem Molecular. 5. SAR. 6. ADMET. 7. Regra de Lipinski. I. Rodrigues, Carlos Rangel (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Farmácia. III. Título.

*Aos meus pais com amor e cuidado.  
Dedico-lhes esta obra com infinita gratidão.*

## **Agradecimentos**

Ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo, por ter aberto todas as portas possíveis para que eu alcançasse essa importante etapa da minha vida. Toda honra, toda a glória seja dada a Ele.

Ao meu orientador, por toda atenção, cuidado e créditos concedidos a mim, fazendo-me mergulhar em um novo mundo de conhecimentos e descobertas. Foi uma pessoa essencial para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Ao meu pai, Ubiratan de Souza Magalhães, que por muitas e muitas vezes foi o meu braço forte, encorajando-me a prosseguir e a continuar com meus sonhos.

Às minhas “mães”, Jaíra Gomes de Oliveira e Jacira Oliveira da Silva, pessoas essenciais na formação do meu caráter e da minha dignidade, sem às quais poderia ter me perdido nas dificuldades da vida.

A mais nova, e não menos importante companheira, Ana Paula Torres, pelos momentos de conversa e de orações que foram muito úteis quando minhas forças pareciam ir embora.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, sempre dispostos a ajudar e orientar os alunos em suas dúvidas e problemas.

Ao grande amigo e considerado irmão, Ilidio F. Afonso, que em muitos momentos soube me orientar com inteligência e clareza nas minhas dúvidas e dificuldades.

A grande amiga e orientadora nos momentos vagos, Profa. Dra. Monique Araújo de Brito, que com sua disposição e vontade de ajudar, auxiliou-me a dar passos importantes nesse trabalho.

Aos amigos de turma, Michele Villardi e Alex Moura que sempre estenderam a mão amiga nos momentos de dificuldade.

Aos queridos Thiago e Marilene da Secretaria de Pós-Graduação que sempre me recebiam com disposição e um sorriso no rosto.

A todos aqueles que de certa forma contribuíram para a confecção deste trabalho e de mais uma etapa importante da minha vida.



**"Pois quando a sabedoria entrar no teu coração,  
e o conhecimento for agradável à tua alma,  
o bom siso te guardará e a inteligência te conservará."**

Provérbios 2:10-11

*Bíblia Sagrada*

## RESUMO

MAGALHÃES, Uiaran de Oliveira. Modelagem molecular e avaliação da relação estrutura-atividade acoplados a estudos físico-químicos, farmacocinéticos e toxicológicos *in silico* de derivados heterocíclicos com atividade leishmanicida. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Neste trabalho, uma série de derivados da 4-metóxi-chalcona (**3**) e 4-metóxi-chalcona sulfonamida (**3a-i**) foi avaliada biologicamente e mostrou que esses derivados possuem uma atividade inibitória contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis*. O estudo de relação estrutura-atividade revelou que o melhor perfil inibitório, frente a *L. braziliensis*, da série 4-metóxi-chalcona ocorre com a inserção de um átomo de carbono presente na estrutura de **3i**, comparativamente com o composto **3e** que não apresenta este átomo espaçador. A análise dos orbitais de fronteira revelou que a intensidade da densidade de HOMO dos compostos mais ativos contra a espécie de *L. braziliensis* está concentrada na região da ligação  $\alpha$ - $\beta$  ceto insaturada da molécula, sugerindo uma importância desta região para a atividade. O composto menos ativo da série **3e** reorienta a densidade HOMO para o anel anilina substituído, reforçando a importância deste descritor para SAR. Neste estudo estes compostos também foram testados contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* a fim de identificar o seu perfil antileishmanial contra esta espécie, em comparação com *L. braziliensis*. Curiosamente, todos os compostos testados foram capazes de afetar a forma promastigota de *L. amazonensis* de maneira dependente da concentração e com baixa citotoxicidade, exceto para derivado **3g**. No entanto, nossos resultados mostraram que o composto **3f** apresenta o melhor perfil contra ambas as formas (promastigota e amastigota) de *L. amazonensis*, diferentemente ao que foi observado para *L. braziliensis*, quando o composto **3i** foi o mais ativo. O estudo de Relação estrutura-atividade (SAR) desses derivados apontou o volume molecular, densidade de

HOMO e os aspectos conformacionais como características importantes para o perfil parasitário. Comparativamente, os resultados de atividade para a espécie de *L. amazonensis* revelaram que o aumento do volume dos substituintes para os derivados **3a-i** influenciou no aumento da atividade contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, mas não para a espécie de *L. braziliensis*. A análise dos parâmetros eletrônicos dos derivados menos ativos de 4-metóxi-chalcona sulfonamida indicou uma maior densidade de HOMO localizada na região da função cetona  $\alpha,\beta$  insaturada da chalcona, diferente do composto mais ativo **3i** que apresentou a densidade de HOMO localizada no anel anilina substituído. Foi também realizado estudos com uma nova e promissora série de derivados Tieno[2,3-*b*]-piridinas com atividade leishmanicida contra formas promastigotas de parasitas da espécie *Leishmania amazonensis* (**4**, **4a-j**). O resultado apontou que os derivados **4f** (*p*-CH<sub>3</sub>) e **4g** (*p*-OCH<sub>3</sub>) são os mais ativos do que o controle positivo. Aparentemente, a posição do substituinte no anel fenila substituído influencia na atividade dos derivados, já que os compostos *para* substituídos revelaram melhor perfil de atividade do que os *meta* substituídos, exceto pelos derivados **4e** e **4j**. Os ensaios de citotoxicidade realizados para **4f** e **4g** mostraram ausência de citotoxicidade na concentração testada. A avaliação do perfil eletrônico dos derivados revelou um aumento do potencial eletrostático molecular no anel fenilamina dos compostos mais ativos. Os estudos dos perfis físico-químico, farmacocinético e toxicológico dos derivados mais ativos das séries (**3**, **3a-3i**; **4**, **4a-j**) revelaram um perfil semelhante ou melhores do que os compostos em uso para o tratamento da leishmaniose..

Palavras-chave: Modelagem Molecular. SAR. Leishmaniose.

## ABSTRACT

MAGALHÃES, Uiaran de Oliveira. Molecular modeling and structure-activity relationship coupled to studies *in silico* of physico-chemical, pharmacokinetic and toxicological profile of the heterocyclic derivatives with leishmanicidal activity. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

In this work, a series of derivatives of 4-methoxy-chalcone (**3**) and 4-methoxy-chalcone sulfonamide (**3a-i**) was evaluated biologically and showed that these derivatives have an inhibitory activity against promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania braziliensis* and *L. amazonensis*. The study of structure-activity relationship revealed that the better inhibitory profile of the series 4-methoxy-chalcone against *Leishmania braziliensis* occurs with the addition of a carbon atom spacer in the structure of **3i**, compared with the compound **3e** which does not present this atom spacer. The analysis of the frontier orbital, through molecular modeling studies revealed that the intensity of the HOMO density of the most active compounds are concentrated in the center of the molecule, suggesting an importance of this region for activity. The less active compound **3e** redirecting the HOMO density for the substituted phenyl ring, reinforcing the importance of this descriptor for SAR. Herein, we also tested these compounds against *L. amazonensis* promastigote and amastigote forms to identify its antileishmanial profile against this species compared to *L. braziliensis*. Interestingly, all tested compounds were able to affect *L. amazonensis* promastigote form in a concentration-dependent manner and with low cytotoxicity, except for derivative **3g**. However, our results showed that compound **3f** presents the best profile against both *L. amazonensis* forms (promastigote and amastigote), differently from that observed for *L. braziliensis*, when compound **3i** was the most active. Structure-activity relationship (SAR) analysis of these derivatives pointed molecular volume, HOMO density, and conformational

aspects as important characteristics for parasitic profile. The analysis of the electronic parameters of the sulphonamide 4-methoxy-chalcone less active derivatives, indicated a higher HOMO density located in the function  $\alpha$ - $\beta$  keto unsaturated of chalcone, otherwise than the most active compound **3i** which showed the HOMO density located in the aniline ring replaced. The ability to study with accuracy and speed using techniques of molecular modeling, allowed us to achieve yet a second study with a promising new series of derivatives Thieno[2,3-*b*]-pyridines with leishmanicidal activity. This study was conducted against promastigotes forms of *Leishmania amazonensis* parasites of the species resulting in a significant activity of the compounds including the compound without substituent. The result of this study indicated derivatives **4f** (*p*-CH<sub>3</sub>) and **4g** (*p*-OCH<sub>3</sub>) the most active of the series being more active than the positive control (Glucantime ®). Apparently, the position of substituent in the substituted phenyl ring influences the activity of the derivatives, since the compounds showed better replaced to profile activity of the target replaced, except for derivatives **4e** and **4j**. Tests of cytotoxicity towards the most active derivatives (**4f** and **4g**) showed no cytotoxicity at the concentration tested. The evaluation of electronic products showed an increase in the molecular electrostatic potential in the ring phenylamine compounds more active. Studies of physico-chemical profile, pharmacokinetic and toxicological derivatives most active of the series (**3**, **3a-3i**; **4**, **4a-j**), showed a profile similar or better than drugs currently in use to treat leishmaniasis.

Keywords: Molecular Modeling. SAR. Leishmaniasis.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial das duas formas de Leishmaniose.	22
Figura 2 - Ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i>	23
Figura 3 - Estrutura molecular proposta dos antimoniais pentavalentes. Antimoniato de meglumina (Glucantime®) e Estibogluconato de sódio (Pentostam®)	25
Figura 4 - Estrutura molecular da Anfotericina B	27
Figura 5 - Estrutura molecular da Sitamaquina e Miltefosina, respectivamente	28
Figura 6 - Estrutura molecular da Paromomicina	28
Figura 7 - Estrutura molecular da Pentamidina	29
Figura 8 - Estrutura molecular do Cetoconazol	30
Figura 9 - Figura 9. Representação de compostos com atividade leishmanicida chalcona (1) e o derivado do herbicida Oryzalin, GB-II-5 (2)	31
Figura 10 - Estrutura dos derivados Tieno-piridinas (I), pirazolo-piridina (II) e amodiaquina (III)	31
Figura 11- Representação de uma molécula por Mecânica Molecular	37
Figura 12 - Etapas no processo de construção do Mapa de Potencial Eletrostático da molécula de Benzeno	43
Figura 13 - Principais razões do fracasso no desenvolvimento de fármacos	45
Figura 14 - Distribuição do perfil Drug-Likeness dos fármacos comerciais (verde) e das substâncias do catálogo Fluka® (vermelho)	47
Figura 15 - Imagem do programa Osiris® com os respectivos perfis toxicológicos, propriedades físico-químicas, Drug-Likeness e Drug-Score	47
Figura 16 - Escala do perfil Drug-Score de um potencial candidato a fármaco	48
Figura 17 - Fluxograma da metodologia utilizada nas etapas de modelagem molecular, perfis físico-químicos e toxicológicos teóricos	52
Figura 18 - Avaliação Biológica dos derivados 4-metóxi-chalcona (3) e 4-metóxi-chalcona sulfonamida (3a-3i). Efeito inibitório na proliferação <i>in vitro</i> de parasitas da espécie <i>Leishmania braziliensis</i> (A), perfil citotóxico em macrófagos de ratos (B), índice de	

- seletividade (IS) calculado (C) e inibição da infecção por formas amastigotas de *Leishmania braziliensis* em macrófagos utilizando o composto mais ativo (3i) (D) 55
- Figura 19 - Conformações de mínimo de energia (A) e o Mapa de Potencial Eletrostático (B) dos derivados 4-metóxi-chalcona (3) e 4-metóxi-chalcona sulfonamida (3a-i) 57
- Figura 20 - Densidade de HOMO dos derivados 4-metóxi-chalcona sulfonamida (3a-i). A Densidade absoluta de HOMO é codificada em uma superfície de van der Waals (isodensity 0.002 e/au<sup>3</sup>) mapeada da região mais vermelha (0,00) a região mais azul (0,02) 58
- Figura 21 - Sobreposição dos derivados mais ativo (3i) (verde) e menos ativo (3e) (roxo) da série 4-metóxi-chalcona sulfonamida 59
- Figura 22 - Resultados dos parâmetros Drug-Likeness e Drug-Score (A) e riscos toxicológicos teóricos (B) dos derivados 4-metóxi-chalcona (3), 4-metóxi-chalcona sulfonamida (3c, 3d, 3f e 3i) e Glucantime® 60
- Figura 23 - Comparação do efeito leishmanicida (A) e o Índice de Seletividade (IS), entre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* 65
- Figura 24 - Comparação do efeito leishmanicida (A) e o Índice de Seletividade (B) dos derivados 4-metóxi-chalcona (3) e 4-metóxi-chalcona sulfonamida (3a-i) contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* 66
- Figura 25 - Efeito dos derivados tieno-piridina [50µM] na proliferação de parasitas na forma promastigota da espécie *Leishmania amazonensis* após 24 horas de incubação. A = Controle; B = DMSO; C = Glucantime ; 4 = H; 4a = *m*-CH<sub>3</sub>; 4b = *m*-OCH<sub>3</sub>; 4c = *m*-NO<sub>2</sub> ; 4d = *m*-F ; 4e = *m*-Br; 4f = *p*-CH<sub>3</sub>; 4g = *p*-OCH<sub>3</sub>; 4h = *p*-NO<sub>2</sub>; 4i = *p*-F, e 4j = *p*-Br 67
- Figura 26 - Efeito das diluições seriadas (6,25 - 50 µM) do derivado 4f (*p*-CH<sub>3</sub>) e 4g (*p*-OCH<sub>3</sub>) sobre a proliferação *in vitro* de parasitas da espécie *Leishmania amazonensis* depois de 24 horas. Glucantime® = EC<sub>50</sub>=163,7µM 68
- Figura 27 - Efeito citotóxico dos derivados Tieno-piridinas (50 µM) sobre células mononucleadas após 24 horas de incubação. A = Controle; B = DMSO ; C = Glucantime ; 4 = *p*-CH<sub>3</sub>, 5 = *p*-OCH<sub>3</sub>, 6 = *p*-NO<sub>2</sub>, 7 = *m*-Br e 8 = *p*-Br 69
- Figura 28 - (A) Mapa de Potencial Eletrostático (MEP) dos derivados Tieno-piridina (4, 4a-j) sobre uma superfície de 0,002 e/ua<sup>3</sup> com uma faixa de energia de -25,0 (regiões vermelhas) a +30,0 (regiões azuis) kcal/mol. (B) Densidade de HOMO sobre uma superfície de densidade eletrônica constante de (0.002 e/au<sup>3</sup>) 71
- Figura 29 - Drug-Likeness dos derivados mais ativos (4, 4e, 4f, 4g, 4h e 4j) comparados com o Glucantime® um fármaco comercial 72
- Figura 30 - Drug-Score dos derivados mais ativos (4, 4e, 4f, 4g, 4h e 4j) comparado com o Glucantime®, um fármaco disponível comercialmente 73
- Figura 31 - Comparação da toxicologia *in silico* para os derivados 4, 4e, 4f, 4g, 4h e 4j com o Glucantime® obtida através do Osiris® Property Explorer 74

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade leishmanicida ( $IC_{50}$ ) dos derivados 4-metóxi-chalcona (3) e 4-metóxi-chalcona sulfonamida (3a-i) com suas respectivas propriedades eletrônicas teóricas (Dipolo, $E_{HOMO}$ , $E_{LUMO}$ ) e a “Regra-dos-Cinco” de Lipinski (número de doadores e aceptores de ligação hidrogênio (HBD e HBA respectivamente), cLogP e Peso molecular (PM)	56
Tabela 2 - Resultados da avaliação da Regra-dos-Cinco de Lipinski	62
Tabela 3 - Comparação da atividade leishmanicida (%) dos derivados Tieno-Piridina (4, 4a-j) com suas respectivas propriedades eletrônicas teóricas (Dipolo, $E_{HOMO}$ , $E_{LUMO}$ ) e a “Regra-dos-Cinco” de Lipinski incluindo número de aceptores e doadores de ligação hidrogênio (HBA e HBD respectivamente), cLogP e Peso molecular (PM)	70
Tabela 4 - Resultados da avaliação da Regra-dos-Cinco de Lipinski para os derivados tieno-piridina	75



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADMET</b>	Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade
<b>AM1</b>	Modelo Austin 1 ( <i>Austin Model 1</i> )
<b>AMBER</b>	Modelo de Construção Assistida e Refinamento Energético ( <i>Assisted Model Building and Energy Refinement</i> )
<b>cLogP</b>	Log do Coeficiente de Partição Calculado
<b>CNDO</b>	Negligência Completa da Diferencial de Sobreposição ( <i>Complete Neglect of Differential Overlap</i> )
<b>DFT</b>	Teoria do Funcional de Densidade ( <i>Density Functional Theory</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>eV</b>	elétron Volt
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana ( <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
<b>HOMO</b>	Orbital Molecular de Mais Alta Energia Ocupado ( <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> )
<b>INDO</b>	Negligência Intermediária da Diferencial de Sobreposição ( <i>Intermediate Neglect of Differential Overlap</i> )
<b>LUMO</b>	Orbital Molecular de Mais Baixa Energia Desocupado ( <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> )
<b>MEP</b>	Potencial Eletrostático Molecular ( <i>Molecular Electrostatic Potential Map</i> )
<b>MM1</b>	Campo de Força Mecânica Molecular 1

<b>MM2</b>	Campo de Força Mecânica Molecular 2
<b>NDDO</b>	Negligência da Sobreposição Diferencial Diatômica ( <i>Neglect of Diatomic Differential Overlap</i> )
<b>PM</b>	Peso Molecular
<b>PM3</b>	Método Paramétrico 3 ( <i>Parametric Method 3</i> )
<b>RM1</b>	Modelo Recife 1 ( <i>Recife Model 1</i> )
<b>RTECS</b>	Registro de Efeitos Tóxicos de Substâncias Químicas ( <i>Registry of Toxic Effects of Chemical Substances</i> )
<b>SAR</b>	Relação Estrutura-Atividade ( <i>Structure Activity Relationship</i> )
<b>STO</b>	Orbitais Tipo Slater ( <i>Slater-Type-Orbitals</i> )

## MARCAS E PROPRIEDADES

Foram realizados esforços para mencionar todas as marcas comerciais que porventura apareçam neste trabalho. Entretanto, a não menção caracteriza apenas uma falha não intencional. As seguintes marcas comerciais são propriedade de seus respectivos detentores:

<b>Fluka®</b>	Fluka Chemie AG.
<b>Glucantime ®</b>	Sanofi – Aventis, Inc.
<b>Osiris®</b>	Actelion Pharmaceuticals, Ltd.
<b>Pentostam ®</b>	GlaxoSmithkline, Inc.
<b>Spartan®</b>	Wavefunction, Inc.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	21
1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE	21
1.2 CICLO DE INFECÇÃO NO HOMEM	22
1.3 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE	23
1.4 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE	24
1.5 NOVOS DERIVADOS COM POTENCIAL ATIVIDADE LEISHMANICIDA	30
1.5.1 Derivados da Chalcona	30
1.5.2 Derivados da Tieno-piridina	31
1.6 MODELAGEM MOLECULAR	32
1.6.1 Panorama geral	32
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	34
<b>3 OBJETIVOS</b>	36
3.1 GERAL	36
3.2 ESPECÍFICOS	36
<b>4 METODOLOGIA</b>	37
4.1 METODOLOGIA – FUNDAMENTOS TEÓRICOS	37
4.1.1 Métodos de Cálculos da Estrutura molecular	37
4.1.1.1 Mecânica Molecular	37
4.1.1.2 Mecânica Quântica	38

4.1.1.3 Teoria do Funcional de Densidade – DFT	39
4.1.1.4 Cálculos <i>ab initio</i>	40
4.1.1.5 Cálculos Semi-Empíricos	41
<b>4.1.2 Descritores moleculares</b>	<b>42</b>
4.1.2.1 Mapa de Potencial Eletrostático	42
4.1.2.2 Energia dos Orbitais Moleculares	43
4.1.2.3 Densidade dos Orbitais de Fronteira	44
4.1.2.4 Momento Dipolo	44
<b>4.1.3 Parâmetros farmacocinéticos <i>in silico</i></b>	<b>44</b>
4.1.3.1 Perfil Drug-Likeness	46
4.1.3.2 Perfil Drug-Score	48
4.1.3.3 Regra-dos-Cinco (Lipinski)	48
<b>4.1.4 Ensaios antiparasitários e de citotoxicidade das 4-metóxi-chalconas (3, 3a-i) e tieno-piridinas (4, 4a-j)</b>	<b>49</b>
<b>4.2 METODOLOGIA COMPUTACIONAL</b>	<b>50</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>53</b>
<b>5.1 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS DERIVADOS 4-METÓXI-CHALCONA (3) E 4-METÓXI-CHALCONA SULFONAMIDAS (3a-i) CONTRA <i>Leishmania braziliensis</i></b>	<b>53</b>
<b>5.2 ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR DOS DERIVADOS 4-METÓXI-CHALCONA (3) E 4-METÓXI-CHALCONA SULFONAMIDA (3a-i)</b>	<b>56</b>
<b>5.3 ESTUDO DO PERFIL FÍSICO-QUÍMICO, FARMACOCINÉTICO E TOXICOLÓGICO TEÓRICO (<i>IN SILICO</i>)</b>	<b>59</b>

5.3.1 Drug-Likeness e Drug-Score	59
5.3.2 Regra-dos-Cinco (Lipinski)	61
5.4 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO PERFIL LEISHMANICIDA DAS 4-METÓXI-CHALCONA SULFONAMIDAS CONTRA <i>Leishmania amazonensis</i>	62
5.4.1 Avaliação dos derivados 4-metóxi-chalcona sulfonamida (3a-i) contra as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	63
5.4.2 Avaliação das 4-metóxi-chalcona sulfonamida (3a-i) contra as formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	64
5.5 ESTUDOS DE RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DOS DERIVADOS 4-METÓXI-CHALCONA CONTRA <i>Leishmania amazonensis</i>	66
5.6 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DERIVADOS TIENO-PIRIDINA COM ATIVIDADE LEISHMANICIDA	67
5.7 ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR DOS DERIVADOS TIENO-PIRIDINAS (4, 4a-j)	69
5.8 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E TOXICOLÓGICAS <i>IN SILICO</i>	72
5.8.1 Perfil Drug-Likeness	72
5.8.2 Perfil Drug-Score	73
5.8.3 Perfil Toxicológico Teórico	74
5.8.4 Regra-dos-Cinco (Lipinski)	75
6 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXOS	87

# 1 INTRODUÇÃO

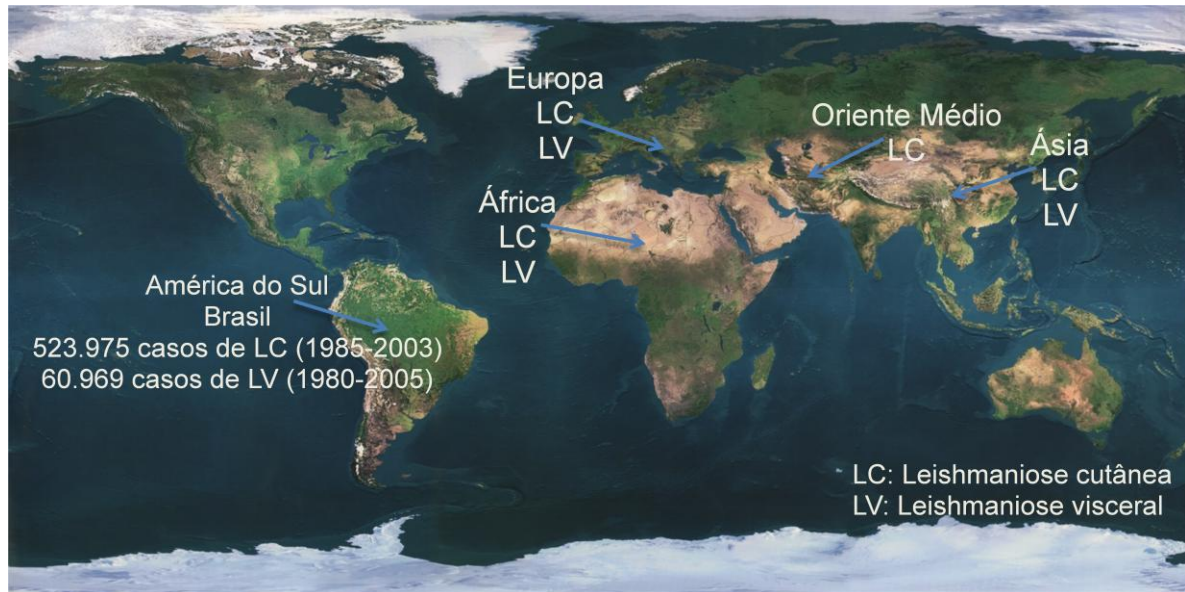
## 1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE

A Leishmaniose é uma doença infecciosa causada por diferentes espécies do parasita *Leishmania* e um dos maiores problemas de saúde pública de países em desenvolvimento. De fato, 2 milhões de casos acontecem anualmente e estima-se que 12 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo (<http://www.who.int/leishmaniasis>). Atualmente, essa doença causa significativa morbidade e mortalidade, principalmente em países em desenvolvimento (Figura 1) (SANTOS *et al.*, 2008).

Apesar dos progressos importantes e dos conhecimentos fundamentais sobre *Leishmania*, a terapia atual para o combate à Leishmaniose ainda é insatisfatória, devido à limitada eficácia, ao longo período de tratamento, alto custo e efeitos secundários indesejáveis (CHEN *et al.*, 2001; CROFT & COOMBS, 2003; SINGH & SIVAKUMAR, 2004).

Existem cerca de 20 espécies e subespécies do parasita que são responsáveis pelas diferentes manifestações clínicas da doença, que vão desde uma úlcera de pele, denominada Leishmaniose cutânea, até uma doença com risco de morte, como a Leishmaniose visceral (NEUBER, 2008).

O parasita existe em duas formas: promastigota, forma flagelada que se encontra na fêmea do inseto flebotomíneo (vetor), e amastigota, presente nos hospedeiros mamíferos (de SOUZA *et al.*, 2007). As formas amastigotas são parasitas intracelulares obrigatórios de macrófagos e, raramente, são encontradas em outros tipos de células. Nos macrófagos, as formas amastigotas localizam-se no fagolisossomo, onde se multiplicam (de SOUZA *et al.*, 2007). O desenvolvimento de resistência aos medicamentos pelos agentes patogênicos, especialmente em pacientes HIV-*Leishmania* co-infectados, também tem agravado este problema de saúde (ALI, 2002). Assim, há uma necessidade urgente para o desenvolvimento de novos fármacos que sejam eficientes e seguros para o tratamento da Leishmaniose.



**Figura 1. Distribuição mundial das duas formas de Leishmaniose (Adaptado de WHO, 2003).**

## 1.2 CICLO DE INFECÇÃO NO HOMEM

A transmissão do parasita ocorre pela picada da fêmea do inseto do gênero *Phlebotomus* na Eurásia e do gênero *Lutzomyia* nas Américas. O ciclo de infecção do parasita no hospedeiro humano começa quando o vetor, infectado por uma das espécies de *Leishmania* proveniente de hospedeiros mamíferos (e.g. roedores, cachorros, marsupiais e em alguns casos, o homem) (HERWALDT, 1999; MANUAL DA LEISHMANIOSE, 2007; NEUBER, 2008), se alimenta de sangue humano através de seu probóscide, permitindo que a forma promastigota do protozário entre na circulação sanguínea do homem. Na circulação sanguínea, as formas promastigotas do parasita são fagocitadas pelos macrófagos e, dentro desta célula, mais especificamente no fagolisossomo, as formas promastigotas do parasita se diferenciam em forma amastigota, as quais se reproduzem por fissão binária. Esses parasitas multiplicam-se até lisarem a célula e ficarem livres para infectar outras células fagocitárias, continuando, assim, o ciclo de infecção (Figura 2).



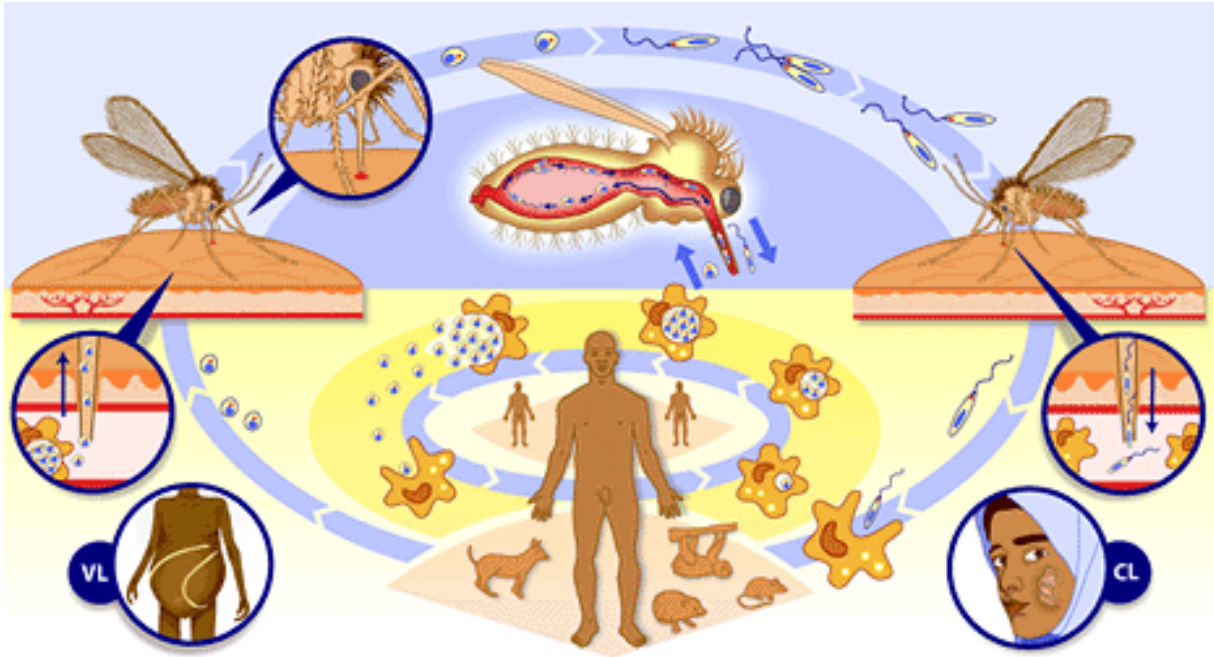


Figura 2. Ciclo de vida do parasita *Leishmania* (Reproduzido de <http://www.who.int/leishmaniasis>).

### 1.3 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE

O diagnóstico da Leishmaniose ocorre de acordo com o padrão de manifestação clínica da doença, podendo ocorrer dois tipos de Leishmaniose: cutânea, mucocutânea (variação da Leishmaniose cutânea) e visceral. Esses padrões dependem da espécie de *Leishmania* e das isoenzimas expressas nessas espécies identificadas por eletroforese (zimodema). Dessa maneira, um padrão de isoenzima de uma espécie pode causar Leishmaniose visceral, enquanto que um outro padrão de isoenzima da mesma espécie pode causar Leishmaniose cutânea (PISCOPO & AZZOPARDI, 2007).

A Leishmaniose visceral é geralmente diagnosticada baseada na detecção microscópica das formas amastigotas em esfregaços de tecido aspirado ou em amostras de linfonodo. Nestes casos, uma amostra de medula óssea é, em geral, o tecido de escolha. (PISCOPO & AZZOPARDI, 2007; CHAPPUIS *et al.*, 2007). O diagnóstico também pode ocorrer por pesquisa de anticorpos, mas é um método que apresenta algumas limitações como o alto custo e resultados falso positivos para indivíduos sem histórico de Leishmaniose visceral que vivem em áreas endêmicas (CHAPPUIS *et al.*, 2007)

O diagnóstico também pode ser feito por outros métodos, como cultura do parasita, a partir do sangue, ou métodos moleculares como o Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

(*Polymerase Chain Reaction*), que são mais sensíveis do que o método de microscopia óptica, porém requerem maior infra-estrutura para a realização do exame (CHAPPUIS *et al.*, 2007). O teste de aglutinação direta para detecção do anticorpo da *Leishmania* também é bastante empregado, mas apresenta algumas reações cruzadas para Hanseníase, Malária, Doença de Chagas e Esquistossomose. Em pacientes HIV positivos, os anticorpos podem se tornar indetectáveis (PISCOPO & AZZOPARDI, 2007). As técnicas mais atuais de diagnóstico para Leishmaniose, com maior acurácia e especificidade, são a pesquisa de anticorpos e antígenos de *Leishmania* em urina (ISLAM *et al.* 2004; SUNDAR *et al.* 2005).

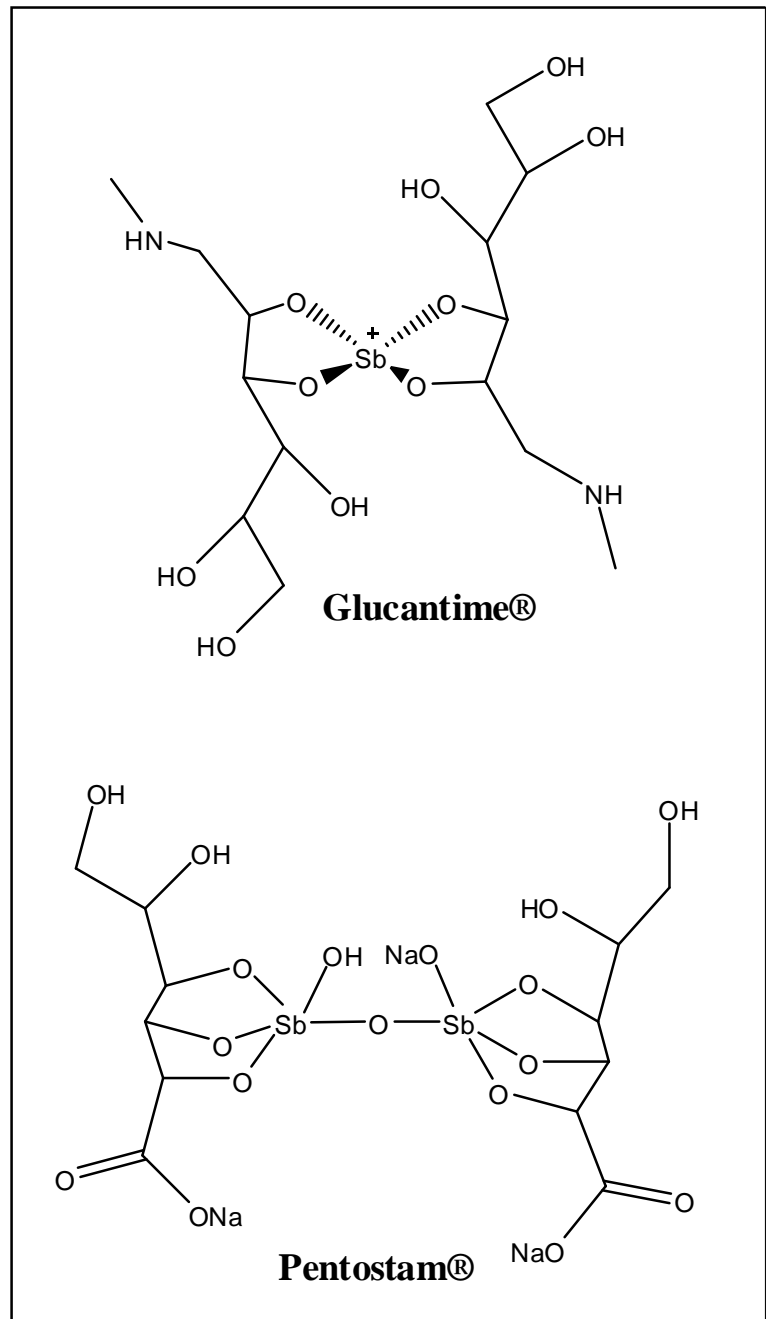
Os métodos de diagnóstico para Leishmaniose cutânea são praticamente os mesmos citados para a Leishmaniose visceral. O diagnóstico é feito por exames de microscopia óptica a partir de amostras de lesões da pele ou biópsia retirada, especificamente, das bordas das lesões. Este método é rápido e de baixo custo, porém, com sensibilidade limitada, principalmente em lesões crônicas. O método de detecção de anticorpos, neste caso, não é muito eficaz, devido à falta de produção de anticorpos na leishmaniose cutânea (PISCOPO & AZZOPARDI, 2007).

Outros métodos de diagnóstico para Leishmaniose cutânea estão disponíveis, como por exemplo, o Teste de Montenegro, que consiste em um teste de hipersensibilidade cutânea. O procedimento consiste na injeção intradérmica de antígenos de *L. mexicana* na região do antebraço e posterior monitoramento da área para verificar alguma reação local (LUGO, 1997). Este método, no entanto, apresenta algumas limitações como a incapacidade de distinguir se a infecção é antiga ou recente, além de apresentar resultados falsos positivos para outras infecções de pele (DE LIMA BARROS *et al.*, 2005).

#### 1.4 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

O tratamento da Leishmaniose visceral é baseado na terapia com antimoniais pentavalentes (Figura 3). Os antimoniais pentavalentes estão disponíveis nas formas de Estibogluconato de sódio (Pentostam®) e Antimoniato de meglumina (Glucantime®) (Figura 3), que podem ser administrados por via intravenosa ou intramuscular com igual eficácia. Estes medicamentos são administrados na concentração de 20mg/kg durante 28 dias, dependendo da espécie do parasita e das manifestações clínicas do paciente (PISCOPO & AZZOPARDI, 2007). O mecanismo de ação desses fármacos passou muitos anos sem ser

conhecido e, atualmente, aceita-se que os antimoniais pentavalentes são pró-fármacos, que são reduzidos à forma trivalente ativa. Não se sabe muito sobre como acontecem os danos, mas sabe-se que eles inibem a biossíntese de macromoléculas nas formas amastigotas do parasita, interferindo na glicólise e na  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, além de apresentarem diversos efeitos sobre o metabolismo da *Trypanosoma* (BERMAN *et al.*, 1987).



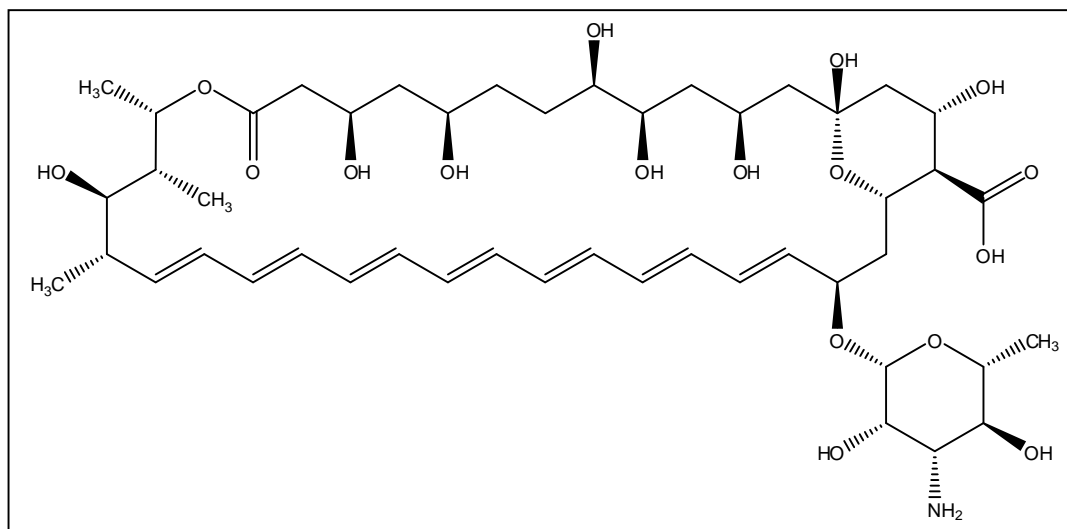
**Figura 3. Estrutura molecular proposta dos antimoniais pentavalentes. Antimoniato de meglumina (Glucantime®) e Estibogluconato de sódio (Pentostam®) (Frézard *et al.*, 2008).**

O grande problema dessa terapia é a resistência adquirida a esses fármacos que, em algumas áreas, chega a ser maior do que 50%. Acredita-se que alguns mecanismos moleculares de resistência ocorram por interferência na etapa de redução do fármaco da forma pentavalente para a forma trivalente, por alteração da expressão da aquaglicoporina (GOURBAL *et al.*, 2004), responsável pela entrada do fármaco na forma trivalente no parasita, e por um aumento dos níveis de Tripanotona. Outro problema é a toxicidade dos fármacos que têm efeitos colaterais severos e, em alguns casos, causam pancreatite aguda, problemas cardíacos como arritmias, além de oferecerem risco de vida para pacientes com idade abaixo de dois anos e acima de 45 anos e que apresentam sinais avançados da doença, desnutrição e complicações da Leishmaniose visceral (SEAMAN *et al.*, 1996; MURRAY *et al.*, 2005).

Outro medicamento utilizado no tratamento da Leishmaniose visceral, principalmente em pacientes que apresentam resistência aos antimoniais, é a Anfotericina B (Figura 4), um antibiótico macrolídeo, muito utilizado como antifúngico, que, no entanto, vem sendo utilizado há mais de quatro décadas contra a Leishmaniose (PÉREZ-VICTORIA *et al.* 2006).

O mecanismo de ação da Anfotericina B baseia-se na sua afinidade aos esteróis, principalmente ergosterol (esterol encontrado nos microrganismos em geral), formando poros aquosos na membrana celular, através dos quais a célula perde íons, levando a sua morte (BRAJTBURG *et al.*, 1996).

Apesar de ter uma boa atividade leishmanicida, apresenta um alto grau de toxicidade e efeitos colaterais como hipocalcemia, febre, nefrotoxicidade e reações anafiláticas. Além disso, essa droga é cara e requer um regime de infusão lento em dias alternados (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Uma forma farmacêutica alternativa da Anfotericina B é a forma lipossomal, que é mais eficaz e menos tóxica, mas por outro lado torna o tratamento bem mais caro.



**Figura 4. Estrutura molecular da Anfotericina B.**

Um medicamento que revolucionou o tratamento da Leishmaniose foi a Miltefosina (Figura 5), uma vez que foi o primeiro medicamento a ser administrado oralmente, com estudos comprovando uma alta taxa de cura. Neste aspecto, podemos compará-la à Anfotericina B, que também tem uma alta taxa de cura (SUNDAR *et al.*, 2002). O seu mecanismo de ação ainda não é bem conhecido, mas alguns autores citam que deve ocorrer alguma interferência no metabolismo de alquil-lipídios, mas apenas em concentrações muito maiores do que aquelas necessárias para produzir a morte do parasita. Também se tem descrito danos na membrana flagelar e defeitos na síntese de fosfolipídios (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2006).

Apesar de apresentar essas duas formas de ação, sabe-se que a Miltefosina induz a morte celular por apoptose, com a condensação e fracionamento do DNA, exposição da fosfatidil-serina e compactação celular (PARIS *et al.*, 2004). Para que estas ações aconteçam, é necessário que a Miltefosina seja internalizada no parasita. Infelizmente, essa é a principal etapa para o desenvolvimento de resistência à droga. A Sitamaquina (Figura 5), um análogo da Primaquina, é um novo fármaco administrado por via oral que está em estudo de fase clínica II e que apresenta atividade para Leishmaniose visceral. A Sitamaquina é uma base lipofílica fraca que rapidamente se acumula em compartimentos ácidos das espécies de *Leishmania*, principalmente nos acidocalcisomas, acarretando em uma alcalinização dessa organela e consequente morte do parasita. Apesar dessa teoria, o mecanismo de ação ainda é desconhecido (LÓPEZ-MARTÍN *et al.*, 2008).

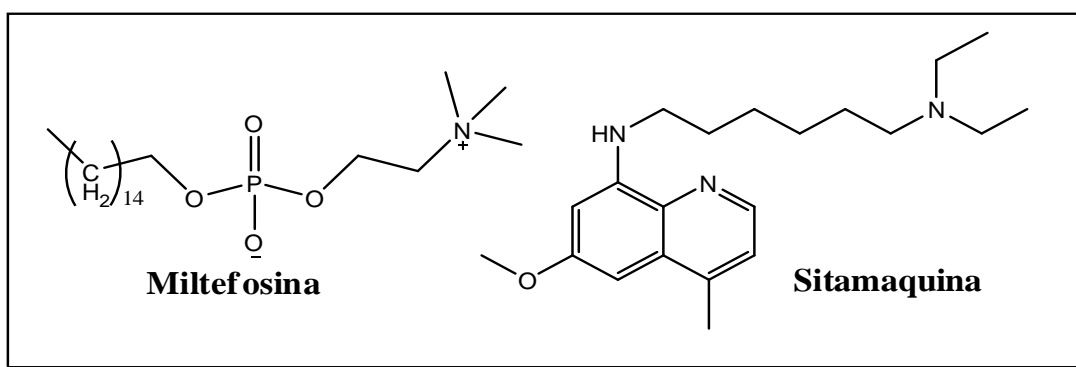


Figura 5. Estrutura molecular da Miltefosina e Sitamaquina.

A paromomicina (Aminosidina) (Figura 6) um antibiótico aminoglicosídeo produzido por *Streptomyces spp.*, é utilizada para o tratamento da Leishmaniose visceral em formulações parenterais e da Leishmaniose cutânea em formulações parenterais e tópicas. Na década de 1960 foi desenvolvido como um agente antibacteriano, mas já se conhecia sua ação leishmanicida.

O mecanismo de ação da Paromomicina baseia-se na alteração da síntese de proteínas, além de interferir na atividade mitocondrial e dificultar a captação de precursores de macromoléculas, dificultando, assim, o crescimento do parasita. O aumento da proporção de lipídios polares na membrana provoca uma diminuição da fluidez que altera a permeabilidade da membrana (MAAROUF *et al.*, 1997).

Os casos de resistência aos aminoglicosídeos em bactérias são bem conhecidos e isso se aplica ao tratamento da Leishmaniose, acarretando em muitos casos de resistência, justificando porque não é usado como fármaco de primeira escolha no tratamento dessa doença.

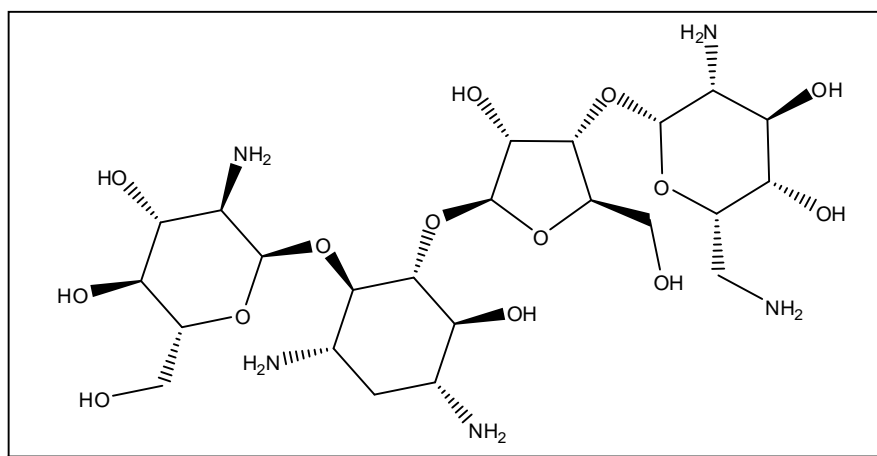


Figura 6. Estrutura molecular da Paromomicina.

Fármacos como a Pentamidina (Figura 7), uma diarilamina, têm sido utilizados como fármacos de segunda linha para o tratamento da Leishmaniose há mais de quatro décadas. Seu uso não é muito difundido devido aos efeitos adversos severos como hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidade, taquicardia e dor no local da injeção (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação da Pentamidina é devido ao maior acúmulo deste fármaco na célula parasitária do que nas células humanas e, possivelmente, à inibição do transporte de arginina,( putrescina e espermidina) (alquilaminas que inibem a formação de óxido nítrico), e à ligação ao DNA do cinetoplasto, provocando sua desintegração e o colapso do potencial de membrana mitocondrial (BRAY *et al.*, 2003).

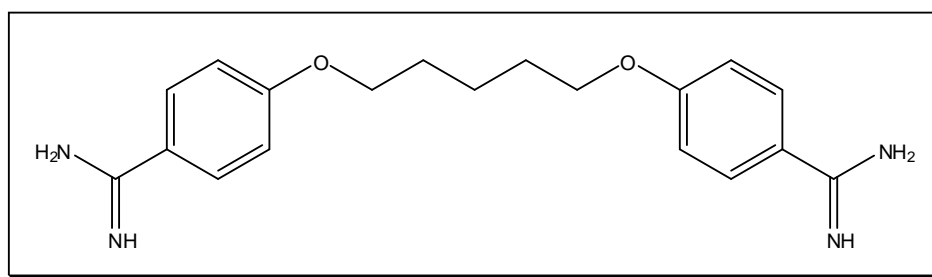


Figura 7. Estrutura molecular da Pentamidina (SANTOS *et al.*, 2008).

Outra classe de fármacos utilizada no tratamento de infecções fúngicas como os azóis, *e.g.* cetoconazol (Figura 8), itraconazol, fluconazol, também é utilizada no tratamento da Leishmaniose, porém apresenta uma eficácia diminuída em relação a outras drogas leishmanicidas, já que seu metabolismo e excreção são rápidos, não sendo possível alcançar níveis plasmáticos suficientes para produzir um efeito leishmanicida desejado (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2006).

Os azóis causam danos na rota biossintética do ergosterol (o esterol presente na membrana plasmática de *Leishmania spp.*) e, com isso, impedem a formação da membrana celular, além de outras funções metabólicas que acarretam na morte do parasita (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2006).

A resistência a essa classe de fármacos ainda não foi muito estudada *in vitro* em *Leishmania*, porém, em *Trypanosoma cruzi* essa resistência já foi verificada. Em fungos, existem casos de resistência na clínica, provavelmente devido a um aumento no efluxo da droga mediada por transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) (CROFT *et al.*, 2006).

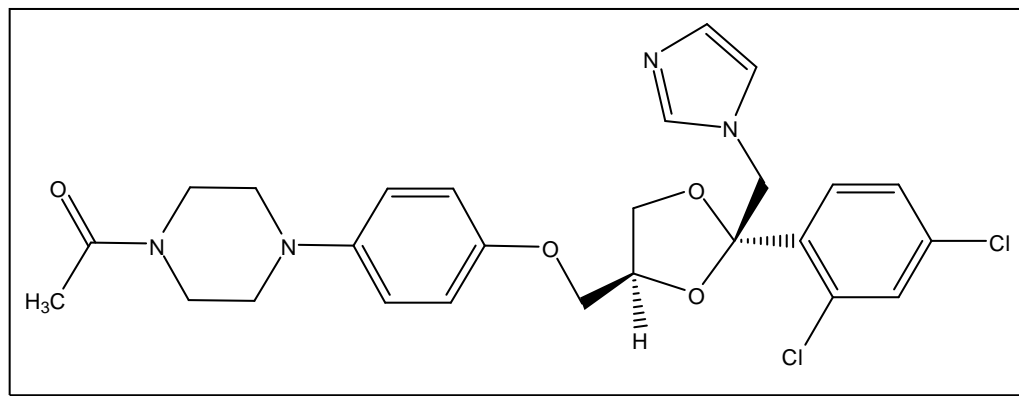


Figura 8. Estrutura molecular do Ketoconazol.

## 1.5 NOVOS COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE LEISHMANICIDA

### 1.5.1 Derivados da Chalcona

Chalconas naturais e sintéticas são descritas na literatura com uma vasta gama de perfis farmacológicos, tais como atividades antiinflamatória (HSIEH *et al.*, 1998), tripanomicida (LUNARDI *et al.*, 2003), antibacteriana (NIELSEN *et al.*, 2004), antiviral (UCHIUMI *et al.*, 2003; WU *et al.* 2003), antitumoral (CABRERA *et al.*, 2007), antimalarial (GO *et al.*, 2004) e leishmanicida (NI *et al.*, 2004; BOECK *et al.*, 2006; PIÑERO *et al.*, 2006; SALEM & WERBOVETZ, 2006). Esse perfil leishmanicida da chalcona (**1**) foi importante para o desenvolvimento de novos derivados com potencial atividade leishmanicida como os compostos descritos por Lunardi e colaboradores (LUNARDI *et al.*, 2003) e derivados como a DMC (dimetil-hidróxi chalcona) (TORRES-SANTOS *et al.*, 2009). Outros compostos como derivados do herbicida Oryzalin (**2**) mostraram-se ativos contra parasitas da espécie de *Leishmania donovani* interferindo na montagem da tubulina do parasita (BHATTACHARYA *et al.*, 2002) (Figura 9).



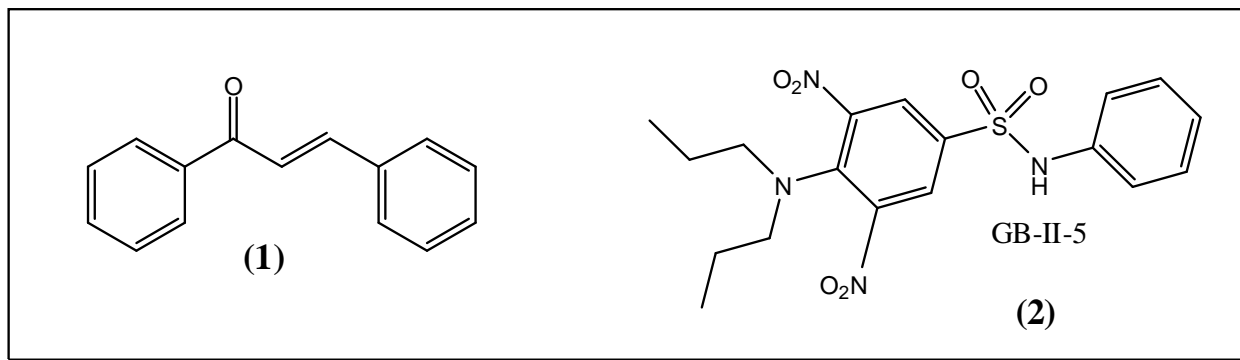


Figura 9. Representação de compostos com atividade leishmanicida chalcona (1) e o derivado do herbicida Oryzalin, GB-II-5 (2).

### 1.5.2 Derivados da Tieno-piridinas

Derivados com o sistema Tieno-piridina internalizados foram descritos com atividade antiviral (PINHEIRO *et al.*, 2004), anti-inflamatória (MOLONEY, 2001), antimicrobiana (SHRAIDEH, Z. & SALLAL, A-K., 1996; LOHRAY *et al.*, 2004; LEAL *et al.*, 2008) e antiparasitária (BERNARDINO *et al.*, 2006). Os derivados de Tieno-piridina (I) são análogos às aminoquinolinas, como os derivados pirazolo-piridina (II), e amodiaquine (III) (Figura 10) (MELLO *et al.*, 2004). Aminoquinolinas exibem um bom perfil contra malária, e o seu uso como agente antiprotozoário é bem estabelecido. Essa classe de substâncias têm sido relatada por possuir atividade tripanossomicida e leishmanicida (da SILVA *et al.*, 2007).

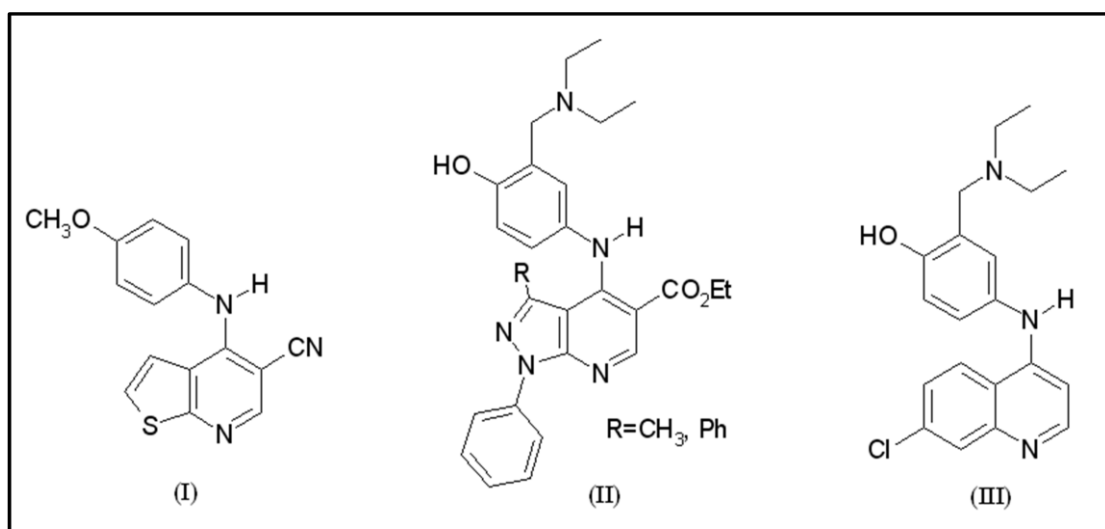


Figura 10. Estrutura dos derivados Tieno-piridinas (I), pirazolo-piridinas (II) e amodiaquina (III).

## 1.6 MODELAGEM MOLECULAR

### 1.6.1 Panorama geral

Os altos custos de tempo e dinheiro são fatores preocupantes para o crescimento da Indústria Farmacêutica, que necessita de investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) para a descoberta de novos fármacos com maior eficácia e seletividade. Estima-se um gasto entre 800 milhões a 1,4 bilhões de dólares e cerca de 15-25 anos para o desenvolvimento de um novo fármaco (GELDENHUYS *et al.*, 2006). Assim, para otimizar tempo e custo, a utilização de inovações científicas e tecnológicas, como ferramenta de pesquisa, combinando conhecimentos multidisciplinares de informática, biotecnologia, química e biologia, refletem no planejamento de novos fármacos (DREWS, 2000; DREWS, 2003).

Planejamento de fármacos auxiliado por computador (*Computer-Aided Drug Design*, CADD) é uma dessas evoluções tecnológicas promissoras no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (TANG *et al.*, 2006), podendo reduzir em até 50% os gastos na pesquisa de um novo agente terapêutico (GELDENHUYS *et al.*, 2006). Há muitas técnicas de CADD que auxiliam na descoberta de novas moléculas candidatas a fármacos e suas estratégias de utilização dependem das informações estruturais disponíveis do alvo (enzima/receptor) e do ligante (MEEK *et al.*, 2006).

A concepção de novos fármacos por CADD baseia-se em duas estratégias principais: planejamento “direto” e “indireto”. A primeira estratégia considera as características tridimensionais de um alvo conhecido, *e.g.* enzima ou receptor, analisando-se o complexo formado entre o ligante e a macromolécula-alvo, identificando-se possíveis sítios preferenciais de ligação e principais modos de interação. Estes dados permitem propor modificações específicas na estrutura do ligante, com o objetivo de aumentar a afinidade e especificidade ao alvo (VAN GUNSTEREN *et al.*, 1994; AJAY & MURCKO, 1995).

A segunda estratégia é usada quando a estrutura da macromolécula-alvo não é conhecida. Assim, informações sobre a atividade e características estruturais e estéreo-eletrônicas dos compostos ativos e inativos podem ser utilizadas para determinar propriedades específicas de uma molécula que podem influenciar na interação com o alvo, tais como calor de formação, potencial eletrostático molecular (*Molecular Electrostatic Potential - MEP*), densidade eletrônica, energia e coeficiente dos orbitais de fronteira HOMO (*Highest*

*Occupied Molecular Orbital*) e do LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), energia de ionização, ordem de ligação e momento de dipolo (BARREIRO *et al.*, 1997), grupos hidrofóbicos, grupos aceptores e doadores de ligação hidrogênio. A partir dessas informações, gera-se um modelo que pode ser utilizado para a seleção de compostos de bancos de dados ou orientar o processo de planejamento (COHEN, 1990).

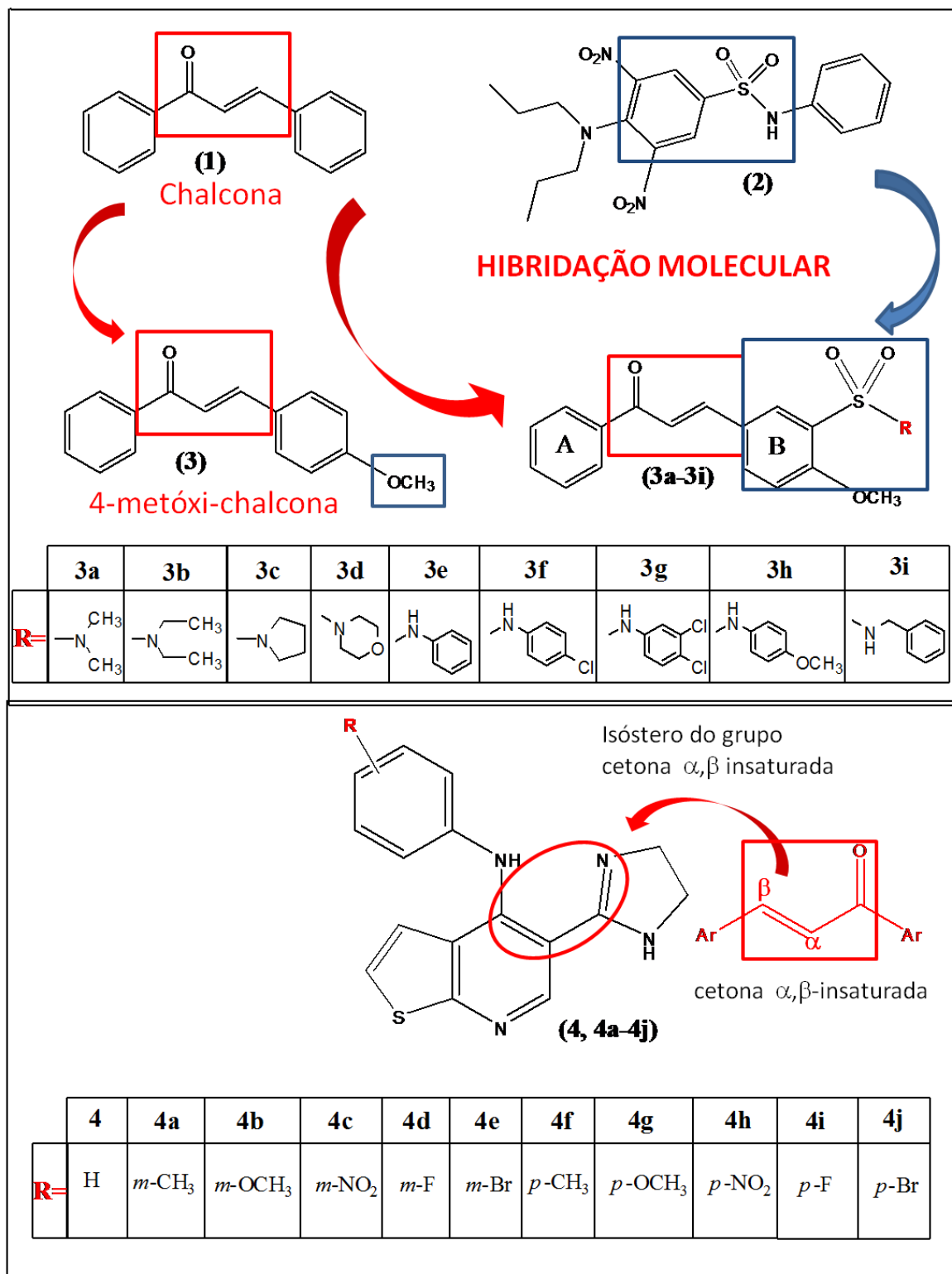
A modelagem molecular reúne um conjunto de técnicas computacionais que possibilitam a construção, a visualização, a manipulação e a estocagem de modelos moleculares tridimensionais. A modelagem molecular permite a análise conformacional, o cálculo de propriedades estéreo-eletrônicas e a análise de variações estruturais que auxiliam na interpretação das correlações entre as estruturas químicas de uma série de compostos com a variação da atividade farmacológica, sendo de grande importância no planejamento de fármacos.

Diante disso, os estudos envolvendo a relação estrutura-atividade (*Structure-Activity Relationship - SAR*) de uma série de compostos são essenciais na avaliação da atividade e na seletividade, além de guiar a síntese de novas moléculas, minimizando o universo de compostos a serem testados. No entanto, para as etapas seguintes da P&D de um novo fármaco, parâmetros farmacocinéticos como ADME (absorção, distribuição, metabolismo, excreção) e Toxicológicos devem ser considerados para eliminar candidatos inadequados, reduzindo os custos da P&D.

## 2 JUSTIFICATIVA

Observando alguns problemas que a atual terapia para o tratamento da Leishmaniose vem sofrendo, tais como severos efeitos adversos, alto grau de toxicidade, falta de adesão do paciente ao tratamento, resistência adquirida às atuais terapias empregadas, além de um alto custo e longo tempo de tratamento, este estudo poderá gerar informações estruturais e eletrônicas importantes para o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas, os quais poderão apresentar melhor eficácia, um menor tempo de tratamento, baixo custo e efeitos adversos diminuídos em relação às terapias existentes.

Neste sentido, o grupo do Prof. Dr. Ricardo José Nunes (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC) propôs a síntese de uma série de derivados por hibridação molecular da chalcona (**1**) com o herbicida Oryzalin (**2**), ambos descritos como leishmanicidas (LUNARDI *et al.*, 2003; BHATTACHARYA *et al.*, 2002). A nova série de derivados mantém o grupamento cetona  $\alpha$ - $\beta$ -insaturado presente na estrutura das chalconas, e incorpora os grupos 4-metoxila e 3-sulfonamida no anel B da chalcona, resultando nos derivados 4-metóxi-chalcona sulfonamida (**3a-i**) (Esquema 1). O grupo da Profa. Dra. Alice Bernardino (Universidade Federal Fluminense - UFF) desenvolveu uma série de derivados tieno-piridina e avaliou o perfil inibitório contra parasitas da espécie de *Leishmania amazonensis* visto que esse núcleo heterocíclico apresentava um grupamento isostérico da função  $\alpha$ - $\beta$  ceto insaturada internalizada (Esquema 1).



Esquema 1. Planejamento de novos derivados 3, 3a-i e 4, 4a-j candidatos a novos compostos com atividade leishmanicida.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo principal a avaliação da relação estrutura-atividade (SAR) e estudos dos perfis físico-químico e toxicológico *in silico* de uma série de derivados da chalcona (**3**, **3a-i**) com atividade contra as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis*, e de uma série de derivados tieno-piridina (**4**, **4a-4j**) com atividade contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* baseadas em metodologias de simulação computacional. O objetivo desses estudos teóricos é buscar determinar as propriedades estéreo-eletrônicas correlacionadas com a atividade biológica, bem como traçar o potencial desses derivados como candidatos a fármacos leishmanicidas.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A primeira parte deste estudo consiste no emprego de técnicas de modelagem molecular, visando identificar propriedades estruturais e eletrônicas, tais como mapas de potencial eletrostático molecular, coeficientes e energias de HOMO e LUMO, cLogP, momento de dipolo molecular, dos derivados 4-metóxi-chalcona (**3**, **3a-i**) e tieno-piridina (**4**, **4a-4j**) (Esquema 2) que possam estar relacionados com a atividade leishmanicida. Estes estudos serão realizados utilizando o programa Spartan'08 (Wavefunction Inc, Irvine, CA, 2008).

A segunda parte deste estudo consiste em calcular parâmetros físico-químicos e toxicológicos teóricos, visando avaliar a tumorigenicidade, efeitos na reprodução e efeitos irritantes. Também serão calculados parâmetros como *Drug-Score* e *Drug-Likeness* que são importantes na seleção de novas substâncias candidatos a fármacos. Estes estudos foram realizados com o programa Osiris® da Acetilion Pharmaceuticals Ltd., disponível no sítio <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>. Os derivados também foram avaliados quanto aos requisitos da “Regra-dos-Cinco” de Lipinski, que avalia a probabilidade de uma substância ser um bom candidato a fármaco por via oral.

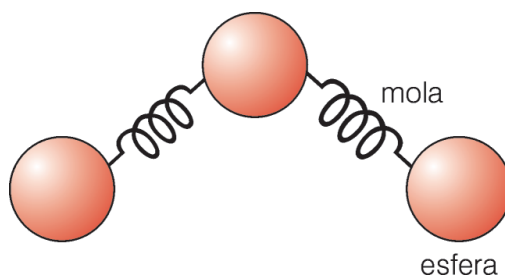
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 METODOLOGIA – FUNDAMENTOS TEÓRICOS

#### 4.1.1 Métodos de Cálculos da Estrutura Molecular

##### 4.1.1.1 Mecânica Molecular

A mecânica molecular, também conhecida como método de campo de força, trata as moléculas como uma coleção de massas interagindo entre si através de forças harmônicas, utilizando as leis clássicas da física para prever as estruturas e as propriedades das moléculas. A mecânica molecular utiliza uma expressão de energia potencial em função apenas das posições dos núcleos, negligenciando a movimentação dos elétrons, simplificação que a torna um método computacional relativamente rápido, aplicável a moléculas pequenas e grandes e até mesmo sistemas oligomoleculares (LEACH, 2001; RODRIGUES, 2001) (Figura 11).



**Figura 11. Representação de uma molécula por Mecânica Molecular (Reproduzido de RODRIGUES, 2001).**

Um campo de força de mecânica molecular contém parâmetros referentes às interações ligantes (comprimento de ligação, ângulo de ligação e ângulo diedro) e não-ligantes (eletrostáticas e de van de Waals) que são usados para calcular a energia e a geometria de uma molécula (FORESMAN, 1993).

Os parâmetros associados ao conjunto de átomos de um sistema molecular podem ser usados em estruturas diferentes, desde que o tipo e a hibridação dos átomos envolvidos sejam

iguais. No entanto, qualquer desvio dos valores “ideais” resulta em penalidades de energia em função de constantes características do parâmetro em questão.

Assim, a energia total ( $E_T$ ) de um sistema molecular (Equação 1), pode ser dividida em vários termos denominados forças potenciais ou equações de energia potencial, que são calculados separadamente e somados para obter a energia total da molécula, como as energias associadas a deformação do comprimento de ligação ( $E_s$ ), a deformação do ângulo de ligação ( $E_a$ ), ângulo de torção ( $E_t$ ), interações de van der Waals ( $E_{vdW}$ ) e eletrostáticas ( $E_{elect}$ )(COHEN, 1996).

$$E_T = \Sigma E_s + \Sigma E_a + \Sigma E_t + \Sigma E_{vdW} + \Sigma E_{elect} \quad (\text{Eq.1})$$

A escolha do campo de força é de grande importância, visto que a confiabilidade dos dados obtidos é dependente das funções de energia gerado por esses campos. Alguns campos de força são utilizados em programas computacionais profissionais, como exemplo, temos o campo de força “MM1” (*Molecular Mechanics 1*) desenvolvido por Norman Allinger em 1976. Esse campo de força mostrava problemas quando se deparava com hidrocarbonetos cíclicos, como por exemplo, o ciclobutano (HINCHLIFFE, 2006).

Em 1977, Allinger, realiza algumas mudanças e introduz o “MM2” (*Molecular Mechanics 2*) que possibilitou a realização de maior acurácia nos cálculos. Outro campo de força utilizado é o “AMBER” (*Assisted Model Building and Energy Refinement*) é utilizado para simulação de aminoácidos e proteínas.

#### 4.1.1.2 Mecânica Quântica

Diferente dos métodos de mecânica molecular, os métodos de mecânica quântica consideram os núcleos e os elétrons que compõe o sistema molecular. Os modelos quânticos são fundamentados em soluções aproximadas para a equação de Schrödinger (Eq. 2), onde é considerado o comportamento ondulatório dos elétrons no cálculo de energia do sistema.

$$\mathbf{H}\Psi = \mathbf{E}\Psi \quad (\text{Eq. 2})$$



Na Eq. 2,  $H$  é o operador Hamiltoniano que representa a energia da molécula, incorporando a energia cinética dos elétrons e a energia potencial das interações elétron-elétron e elétron-núcleo e  $\Psi$  é a função de onda descrita em termos de coordenadas espaciais dos elétrons que constituem o sistema em um determinado estado. Dois tipos principais de tratamento quanto-mecânico tem aplicação em química computacional: métodos *ab initio* e semi-empíricos. A mecânica quântica é útil para o cálculo de valores de afinidade eletrônica, calor de formação, potencial de ionização e momentos de dipolo de átomos e moléculas. Também pode ser utilizado para o cálculo da probabilidade relativa de se encontrar elétrons (densidade eletrônica) numa estrutura, tornando possível a determinação dos locais mais prováveis para reações com eletrófilos e nucleófilos.

Cálculos de mecânica quântica podem evidenciar detalhadamente a natureza eletrônica das estruturas moleculares e os estudos teóricos fornecem resultados de grande valia, devido às propriedades físico-químicas de moléculas farmacologicamente ativas ou inativas, como potencial de ionização, afinidade eletrônica, calor de formação, momento de dipolo molecular. Estes cálculos podem ser utilizados também para determinar a probabilidade relativa de encontrar elétrons (densidade eletrônica) numa estrutura, tornando possível a determinação dos locais mais prováveis para reações com eletrófilos e nucleófilos. O conhecimento da forma e da densidade eletrônica de uma molécula também pode ser utilizado para caracterizar a natureza de um possível fármaco para um alvo específico (THOMAS, 2003).

#### 4.1.1.3 Teoria do Funcional de Densidade – DFT

A Teoria do Funcional de Densidade (*Density Functional Theory* – DFT) é um formalismo muito bem sucedido, onde o principal objetivo é substituir a função de onda, usada para escrever os elétrons em métodos como o Hartree-Fock, pela densidade eletrônica. Os cálculos HF consideram uma densidade eletrônica média, já os cálculos DFT consideram as interações instantâneas de pares de elétrons com spins opostos (LEACH, 1996). Trata-se de uma aproximação baseada na teoria de Hohenberg e Kohn que afirma que todas as propriedades de um sistema são funções da densidade de cargas.

Assim, o teorema de Hohenberg-Kohn permite escrever a energia eletrônica total como uma função da densidade eletrônica  $\rho$ :

$$E(\rho) = E_{KE}(\rho) + E_C(\rho) + E_H(\rho) + E_{xc}(\rho) \quad (\text{Eq. 3})$$

onde  $E_{KE}(\rho)$  é a energia cinética,  $E_C(\rho)$  é o termo de interação núcleo-elétron,  $E_H(\rho)$  é a energia de Coulomb e  $E_{xc}(\rho)$  contém as contribuições de troca e correlação.

Os orbitais moleculares nos cálculos de funcional de densidade são geralmente escritos como uma expansão linear dos orbitais atômicos (i.e. funções de base) que pode ser representado usando funções do tipo Gaussiana, orbitais de Slater ou orbitais numéricos (LEACH, 1996). Os modelos de Funcional de densidade, assim como os modelos Hartree-Fock, são aplicáveis em moléculas de 50-100 átomos (HEHRE, 2003). O funcional exato não é conhecido, logo, existe um variado conjunto de funcionais diferentes que podem fornecer resultados diferentes para o mesmo problema. O método B3LYP (Becke, Lee, Yang e Parr) é um método híbrido amplamente aplicado, onde parte do funcional é obtido por mecânica-quântica (combina energia de troca HF com o termo de troca DFT) e parte é parametrizado (adiciona funcionais de correlação) (FORESMAN, 1993).

#### 4.1.1.4 Métodos *ab initio*

O termo em Latim *ab initio* significa “a partir do início” ou “a partir dos princípios fundamentais”, ou seja, são cálculos realizados a partir de constantes físicas fundamentais, usando equações exatas, que envolvem uma população eletrônica total da molécula sem o uso de parâmetros experimentais e sem aproximações adicionais. O primeiro método de cálculo da estrutura eletrônica foi o método de Hartree-Fock (HF) que emprega a equação de Schrödinger completa para tratar todos os elétrons de um sistema químico (SANT’ANNA, 2002).

Esse modelo emprega conjuntos de funções de base (*basis set*) nos cálculos tais como as funções do tipo Slater (STO) e as funções Gaussianas (GTO *e.g.* 3-21G, 6-31G). Essas bases mínimas apresentam diversas deficiências e para aprimorá-las faz-se a inclusão de função de polarização (i.e., orbitais p representado por \*) (LEACH, 2001).

Assim, 6-31G\* refere-se ao conjunto de base 6-31G com função de polarização para átomos pesados (i. e., átomos diferentes de hidrogênio), 6-31G\*\* refere-se a inclusão de função de polarização para os átomos de hidrogênio e hélio. A base 6-31G\*\* é particularmente útil onde ocorrem ligações hidrogênio. Funções de base com polarização parcial também foram desenvolvidas, por exemplo, 3-21G\* que é a mesma base mínima 3-21G com funções de polarização parcial (LEACH, 2001).

Apesar dos métodos *ab initio* darem uma predição quantitativa de alta qualidade para uma grande variedade de sistemas, eles são demorados e de alto custo computacional. Um recurso comumente empregado é otimizar a geometria com um conjunto de base mais simples e em seguida executar cálculos de “ponto único” (*Single Point*) com um conjunto de base mais completo permitindo determinar a energia e outras propriedades de um sistema molecular, usando uma base de cálculo mais sofisticada (LEACH, 2001).

#### 4.1.1.5 Métodos Semi-Empíricos

Os métodos semi-empíricos utilizam o mesmo formalismo quanto-mecânico como que empregam conjuntos de base incluindo apenas os elétrons da camada de valência do sistema. A razão por trás desta aproximação é que os elétrons envolvidos numa reação química e em outros fenômenos intermoleculares são os elétrons da camada de valência (LEACH, 2001).

Assim, a grande vantagem dos métodos semi-empíricos em relação aos métodos *ab initio* é a maior velocidade de processamento, uma vez que os cálculos são simplificados, reduzindo os custos de memória e tempo computacional. Diferente dos métodos *ab initio*, nos métodos semi-empíricos emprega-se parâmetros empíricos, i.e., derivados de dados experimentais tais como geometrias de equilíbrio, calor de formação, momento de dipolo molecular e potenciais de ionização, ou previamente calculados pela equação de Schrödinger, que permitem algumas integrais presentes no método *ab initio* não sejam calculadas simplificando os cálculos computacionais (SANT’ANNA, 2002; HENRE, 2003).

O primeiro método a utilizar essa aproximação é o CNDO (*Complete Neglect of Differential Overlap*) Negligência Completa da Diferencial de Sobreposição, no qual os orbitais atômicos são considerados esfericamente simétricos na avaliação das integrais de repulsão eletrônica. Outros métodos também utilizam essas aproximações tais como, INDO (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*), Negligência Intermediária da Diferencial de

Sobreposição e NDDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*), Negligência da Diferencial de Sobreposição Diatômica (LEACH, 2001).

Os métodos semi-empíricos mais comumente utilizados são AM1 (*Austin Model 1*) (DEWAR, 1985) e PM3 (*Parametric Method 3*) (STEWART, 1989), ambos os métodos incorporam aproximações muito semelhantes, mas diferem na parametrização.

Recentemente, o método AM1 foi objeto de uma re-parametrização para os átomos de H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br e I, resultando no método RM1 (*Recife Model 1*), com menores erros de cálculos do que os gerados pelos métodos AM1 e PM3 (ROCHA *et al.*, 2006).

#### 4.1.2 Descritores Moleculares

Para se obter relações entre as estruturas químicas e a atividade biológica, utilizando-se abordagens computacionais, é necessário encontrar representações apropriadas da estrutura molecular dos compostos. A modelagem molecular permite a identificação e uma maior compreensão de propriedades físico-químicas, estruturais e estereo-eletrônicas das moléculas, verdadeiras “impressões digitais”, que nos informa o grau de diversidade estrutural num conjunto de compostos.

Sabendo que moléculas bioativas formam complexos com os receptores/enzimas através de um mecanismo de reconhecimento molecular diretamente ligada à estrutura química das moléculas envolvidas (COHEN *et al.*, 1990; BARREIRO *et al.*, 1997), obter esses parâmetros, também chamados de descritores moleculares é de suma importância no estudo da relação estrutura química e atividade biológica.

Um descritor molecular pode ser considerado como sendo o resultado obtido de procedimento lógico e matemático, aplicado às informações químicas codificadas através de uma representação de uma molécula (CONSONNI *et al.*, 2002).

##### 4.1.2.1 Mapa de Potencial Eletrostático Molecular

Os parâmetros eletrônicos são um dos principais fatores que governam a interação fármaco-receptor, neste sentido, o mapa de potencial eletrostático molecular (MEP) pode ser

uma abordagem alternativa com o intuito de compreender a contribuição eletrostática destes derivados para a atividade.

O MEP é um dos descritores mais utilizados nos estudos e pretende revelar o tamanho molecular total e a localização dos potenciais eletrostáticos na molécula. As superfícies tridimensionais dos mapas de potenciais eletrostáticos moleculares (MEPs) são geradas após a sobreposição na molécula de uma partícula carregada positivamente que sob a superfície de contato de van der Waals da molécula revela uma região de repulsão, representando o potencial positivo, de coloração azulada e a região na molécula de potencial negativo, representado pela coloração vermelha.

Para a construção do MEP são necessárias três etapas: a construção da superfície de densidade eletrônica da molécula, a construção da superfície de potencial eletrostático e a aplicação de cores a superfície obtida para designar valores de potencial (Figura 12).

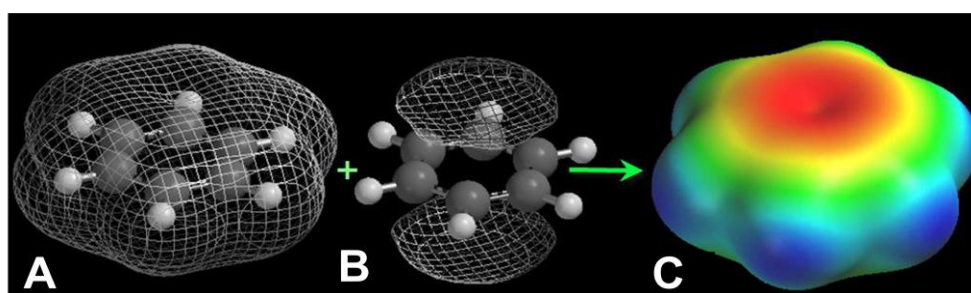


Figura 12. Etapas no processo de construção do Mapa de Potencial Eletrostático da molécula de Benzeno.

#### 4.1.2.2 Energias dos Orbitais Moleculares

As energias do Orbital Molecular de Maior Energia Ocupado (HOMO) e do Orbital Molecular de Menor Energia Desocupado (LUMO) são descritores químico-quânticos bastante utilizados que desempenham um papel importante nas reações químicas e na formação de diversos complexos de transferência de cargas.

A energia de HOMO está diretamente relacionada ao potencial de ionização do composto e caracteriza a capacidade da molécula em realizar ataques nucleofílicos. A energia de LUMO está diretamente relacionada à afinidade eletrônica, caracterizada pela susceptibilidade do composto em relação a ataques por nucleófilos (GRANT, 1996).

A diferença entre as energias dos orbitais HOMO-LUMO identificada como *gap*, é um importante indicador de estabilidade molecular. Moléculas com baixo valor de *gap* são geralmente reativas, enquanto moléculas com alto valor de *gap* indicam alta estabilidade da molécula, no sentido de baixa reatividade nas reações químicas (ZHANG, 2007).

#### 4.1.2.3 Densidade dos Orbitais de Fronteira

A densidade eletrônica dos orbitais de fronteira nos átomos fornece uma forma útil para a caracterização detalhada das interações doador-aceptor. A maioria das reações químicas ocorre no local de maior densidade eletrônica nos orbitais de fronteira, que são definidos de acordo com o tipo de reação: numa reação eletrofílica, a densidade de HOMO é essencial para a transferência de elétrons, enquanto a densidade de LUMO representa as áreas mais suscetíveis a ataques nucleofílicos (GRANT, 1996).

#### 4.1.2.4 Momento de Dipolo

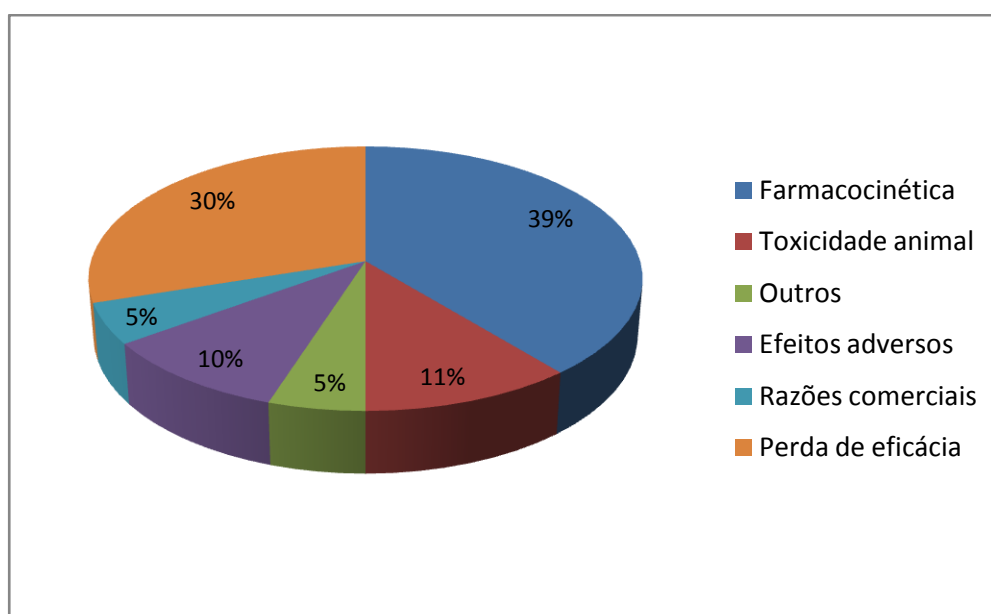
A polaridade de uma molécula é importante para várias propriedades físico-químicas, sendo assim, considerando que a interação de fármaco e receptor ocorre em função das diferenças de cargas com valores opostos, diversos descritores têm sido propostos para quantificar os efeitos de polaridade, dentre os quais, o momento dipolo da molécula (que reflete apenas a polaridade global da mesma) é o mais utilizado.

### 4.1.3 Parâmetros farmacocinéticos *in silico*

A farmacocinética teórica *in silico* é uma abordagem atualmente muito utilizada no estudo inicial das propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade – também chamada de ADME/Tox) que tem como objetivo diminuir o gasto

desnecessário em ensaios biológicos de compostos com alta probabilidade de problemas farmacocinéticos e tóxicos futuros, economizando tempo e investimento (KADAN, 2007).

Durante o processo de P&D de um fármaco, um estudo de ADMET eficiente é essencial para que se tenham compostos promissores, com maiores probabilidades de não serem descartados na fase clínica. Na avaliação das principais razões para o fracasso no desenvolvimento de novos fármacos, metade foi atribuída principalmente às propriedades farmacocinéticas e à toxicidade (Figura 13). Assim, atualmente, estudos ADMET vêm sendo aplicados em etapas anteriores no desenvolvimento de fármacos, a fim de se economizar tempo e delinear melhor o estudo de novos compostos (DAVIS & RILEY, 2004).



**Figura 13. Principais razões do fracasso no desenvolvimento de fármacos (Adaptado de WATERBEEMD & GIFFORD, 2003)**

Para uma análise precisa do perfil farmacocinético de um protótipo métodos de *screening in vitro* são realizados, como ensaios de solubilidade, absorção, permeabilidade e metabólitos formados (YAMASHITA & HASHIDA, 2004). Sabendo-se que os efeitos adversos e a toxicidade dos compostos estão diretamente relacionados à sua estrutura química, esses dados são lançados em modelos computacionais, no qual se racionalizam um grande número de observações experimentais correlacionando as características estruturais e as propriedades físico-químicas com o efeito observado, realizando um *screening* virtual.

A confiabilidade nestes modelos teóricos é dependente de informações de banco de dados e que estão sendo gradualmente liberados pelas indústrias farmacêuticas. Estes modelos também são submetidos à testes de desafio, onde o objetivo é determinar o grau de confiança

no mesmo. Um dos principais desafios do desenvolvimento de fármacos é a avaliação precisa da toxicidade dos fármacos em seres humanos.

Os efeitos tóxicos podem ser classificados como farmacológicos, patológicos ou genotóxicos (que causam alterações no DNA). Os efeitos farmacológicos geralmente desaparecem com a diminuição da concentração do fármaco no organismo, através do metabolismo e eliminação do mesmo. Os efeitos patológicos e genotóxico podem ser revertidos, porém se um dano maior no DNA não for reparado, pode surgir câncer em animais de laboratório em poucos meses, ou anos, em seres humanos (GOODMAN E GILMAN, 2007).

#### 4.1.3.1 Perfil Drug-Likeness

O conceito de Drug-Likeness pode ser entendido como compostos que possuem grupos funcionais e/ou têm propriedades físicas parecidas com a maioria dos fármacos conhecidos. Essas propriedades, principalmente lipofilicidade, distribuição eletrônica, características de ligação hidrogênio, tamanho e flexibilidade molecular e a presença de características farmacofóricas influenciam o comportamento da molécula em um organismo vivo, incluindo fatores envolvidos nas regras de ADME/Tox (BISWAS *et al.*, 2006).

No presente trabalho foi empregado o programa Osiris® da Acetilion Pharmaceutical Ltd. que se utiliza da frequência de ocorrência de cada fragmento e determina essa frequência através de uma lista de fragmentos criada a partir de um banco de dados de 3300 fármacos comerciais (fragmentos Drug-Like) assim como 15000 substâncias químicas comercialmente disponíveis no catálogo Fluka® (fragmentos não Drug-Like) formando uma lista completa com todos os fragmentos disponíveis (Figura 14).



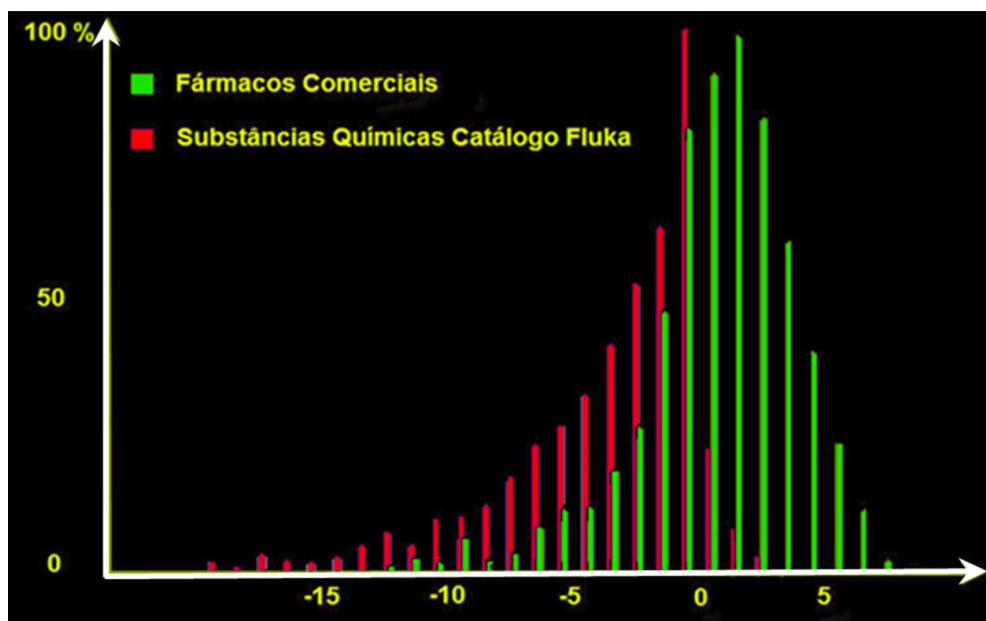


Figura 14. Distribuição do perfil Drug-Likeness dos fármacos comerciais (verde) e das substâncias do catálogo Fluka® (vermelho).

O processo de cálculo de Drug-Likeness se inicia a partir do desenho da estrutura química no programa Osiris® (Figura 15). Em seguida o programa calcula os valores do perfil toxicológico, as propriedades físico-químicas, Drug-Likeness e Drug-Score (o somatório das propriedades calculadas).

The image shows the Osiris® software interface. On the left is a vertical toolbar with various icons for drawing chemical structures. On the right is a properties panel with the following sections:

- Toxicity Risks:** A red-bordered box containing four items: mutagenic, tumorigenic, irritant, and reproductive effective, each with a radio button and a question mark icon.
- cLogP:** A text input field with a question mark icon.
- Solubility:** A text input field with a question mark icon.
- Molweight:** A text input field.
- Druglikeness:** A text input field with a question mark icon, highlighted with a blue border.
- Drug-Score:** A text input field with a question mark icon, highlighted with a blue border.

At the bottom of the interface, the ACTELION logo is visible on the right, and the text 'Actelion Property Explorer, © 2001 Thomas Sander (thomas.sander@actelion.com)' is displayed at the bottom center.

Figura 15. Imagem do programa Osiris® com os respectivos perfis toxicológico, propriedades físico-químicas, Drug-Likeness e Drug-Score.

#### 4.1.3.2 Perfil Drug-Score

O Drug-Score combina os valores obtidos de Drug-Likeness, cLogP (lipofilicidade), logS (solubilidade), peso molecular e riscos toxicológicos em um único valor de modo a avaliar se o composto tem potencial para se tornar um fármaco, valores mais próximos de 1 (um) indicam um bom perfil Drug-Score (Figura 16).



Figura 16. Escala do perfil Drug-Score de um potencial candidato a fármaco.

#### 4.1.3.3 Regra-dos-Cinco (Lipinski)

A lipofilicidade e a solubilidade são as principais propriedades moleculares que influenciam a absorção. A abordagem teórica dos parâmetros farmacocinéticos foi iniciada em 1997, quando Lipinski e colaboradores da Pfizer desenvolveram a “Regra-dos-Cinco” (do inglês, *Rule of Five*), a partir do estudo das propriedades de 2245 fármacos do banco de dados do *World Drug Index* (WDI) aprovados para a Fase II dos ensaios clínicos (LIPINSKI, 1997). Com a finalidade de prever a biodisponibilidade oral de fármacos, essa regra é baseada em características físico-químicas dos compostos analisados, entre eles:

- Existência de menos do que 5 doadores de ligação hidrogênio (expresso pela soma de OH e NH na molécula);
- Peso molecular for menor do que 500 Da;
- cLogP for menor do que 5;

- Menos do que 10 aceptores de ligação hidrogênio (expresso pela soma de átomos de N e O).

As classes terapêuticas biodisponíveis oralmente que constituem exceção a “Regra-dos-Cinco” são: antibióticos, antifúngicos, vitaminas e glicosídeos cardiotônicos. Uma possível explicação para estas substâncias que “violam” a “Regra-dos-Cinco” seria que membros destas classes terapêuticas apresentam características estruturais que permitem ao fármaco atuar como substrato para transportadores que ocorrem naturalmente (LIPINSKI, 2004).

#### 4.1.4 Ensaios antiparasitários e de citotoxicidade das 4-metóxi-chalconas (**3**, **3a-i**) e tieno-piridinas (**4**, **4a-j**)

Os ensaios antiparasitários foram realizados para as formas promastigotas e amastigotas das espécies de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*. Para o ensaio de inibição do crescimento parasitário pelos derivados 4-metóxi-chalconas (**3**, **3a-i**), as formas promastigotas de *Leishmania* foram colhidas na fase de crescimento exponencial e a concentração ajustada para  $10 \times 10^6$  parasitas/mL em um meio de Schneider plus a 5% de soro de feto bovino (FBS). Os compostos foram adicionados em diferentes concentrações com os parasitas e incubados por 72 horas a 28°C. Para o controle positivo foi usado Anfotericina B, e como controle negativo foi usado 1% de DMSO. Os experimentos foram realizados em triplicata e o número de parasitas vivos foi determinado através da contagem na câmara de Neubauer. As concentrações que inibem 50% do crescimento celular ( $IC_{50}$ ) foram determinadas através de análise de regressão linear, e representa o valor  $\pm$  erro padrão.

Para os ensaios de inibição do crescimento parasitários pelos derivados tieno-piridina (**4**, **4a-j**) foram utilizados formas promastigotas de *L. amazonensis* mantidas em um meio de cultura de caldo de infusão cérebro-coração (*Brain Heart Infusion* - BHI) suplementado com 10% soro de feto bovino (FBS) a 26 °C. O potencial de infecção dos parasitas foi mantido através de inoculações contínuas em patas de hamster. As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas na presença ou ausência dos derivados tieno-piridinas a 50  $\mu$ M. Foi usado o Glucantime® como controle positivo e DMSO como controle negativo. O perfil

inibitório foi determinado através da contagem de parasitas na câmara de Neubauer utilizando microscopia ótica.

As diluições seriadas dos derivados tieno-piridinas foram realizados com a finalidade de determinar o valor de  $EC_{50}$ , onde as formas promastigotas de *L. amazonensis* foram expostas a diluições (6,25, 12,5, 25 e 50  $\mu$ M) dos derivados por 24 horas.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com macrófagos de peritônio de ratos saudáveis, cultivados por 72 horas a uma temperatura de 37 °C e adicionados diferentes concentrações dos compostos. O efeito citotóxico da chalcona foi realizado de acordo com os ensaios de MTT (Siewerts, *et al.*, 1995) e a concentração citotóxica a 50% ( $CC_{50}$ ) foi determinada por análise de regressão linear e representa o valor  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes.

#### 4.2 METODOLOGIA COMPUTACIONAL

Estudos de relação estrutura-atividade dos derivados 4-metoxichalcona sulfonamida (**3a-3i**) foram realizados empregando descritores obtidos pelo método semi-empírico AM1, disponível no programa Spartan'08. As conformações mais estáveis (conformação de menor energia) foram submetidas a estudos DFT (Density Functional Theory), em nível 6-31G\*, com o intuito de gerar cargas atômicas parciais com maior acurácia. Em seguida, foram gerados os contornos isoenergéticos dos mapas de potencial eletrostático molecular (MEP), numa faixa de energia entre -65 (coloração vermelha) a +23 (coloração azul) kcal/mol.

As superfícies tridimensionais dos mapas de potenciais eletrostáticos representam os potenciais eletrostáticos sobrepostos na superfície de densidade de elétrons constante ( $0,002e/au^3$ ), sob a superfície de contato de van der Waals, e indicam o tamanho molecular total e a localização global dos potenciais eletrostáticos negativos e positivos. Outros parâmetros eletrônicos que também foram avaliados são: momento de dipolo molecular ( $\mu$ ), valores de energia e coeficientes de distribuição dos orbitais de fronteira HOMO (orbital molecular de maior energia ocupado) e LUMO (orbital molecular de menor energia desocupado).

Os compostos também passaram por um estudo seguindo os requisitos da “Regra-dos-Cinco” de Lipinski que avalia a probabilidade de uma substância ser um bom candidato a fármaco por via oral. Neste estudo, são avaliados parâmetros como cLogP, HBA (Hydrogen Bond Acceptors), HBD (Hydrogen Bond Donors) e Peso molecular (PM).

Também foi utilizado o programa Osiris®, que permite desenhar estruturas químicas bidimensionais e calcular várias propriedades relevantes no planejamento de novos fármacos. O processo se baseia na comparação da molécula em estudo com um banco de dados de fragmentos estrutural presentes em fármacos de uso clínico. Os resultados gerados sinalizam a possibilidade de mutagenicidade, tumorigenicidade, toxicidade, solubilidade e lipofilicidade de um candidato a fármaco. As predições são registradas por código de cores que indicam o grau dos efeitos.

As propriedades com alto risco de efeitos colaterais ou indesejáveis, como mutagenicidade, são demonstradas na cor vermelha, enquanto que a cor verde registra uma propriedade desejável para um fármaco.

O valor de Drug-Score, obtido a partir do programa Osiris®, é resultante da combinação dos valores de Drug-Likeness (semelhança a fármaco), lipofilicidade, solubilidade, peso molecular e riscos toxicológicos em um único valor que pode ser usado para avaliar o potencial total de um composto a fim de qualificá-lo como um possível fármaco (MITEVA *et al.*, 2006).

O fluxograma abaixo (Figura 17) descreve resumidamente a metodologia aplicada neste estudo.

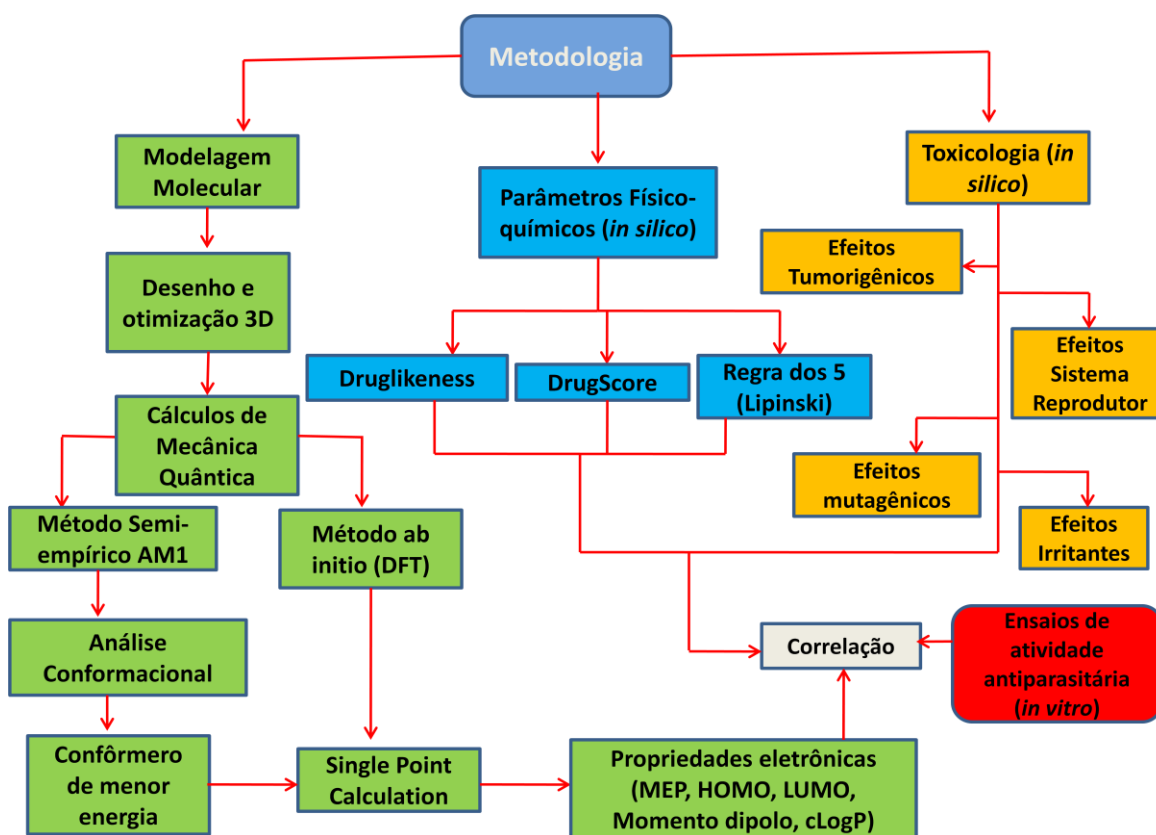


Figura 17. Fluxograma da metodologia utilizada nas etapas de modelagem molecular, perfis físico-químicos e toxicológicos teóricos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS DERIVADOS 4-METÓXI-CHALCONA (**3**) E 4-METÓXI-CHALCONA SULFONAMIDAS (**3a-i**) CONTRA *Leishmania braziliensis*

A avaliação do perfil inibitório dos derivados 4-metóxi-chalcona (**3**) e 4-metóxi-chalcona sulfonamidas (**3a-i**) foi realizada por ensaios *in vitro* contra formas promastigotas de *L. braziliensis* e mostrou que o efeito inibitório desses derivados é dependente da concentração (Figura 18A). A adição do grupo sulfonamida gerou derivados com melhor perfil inibitório do que a 4-metóxi-chalcona (**3**), exceto pelo derivado anilina-substituído (**3e**) (Figura 18A e Tabela 1) que revelou uma piora do perfil inibitório. Isso pode ser observado pelos resultados obtidos em que a maioria dos derivados 4-metóxi-chalcona sulfonamidas possui um potencial inibitório maior ( $IC_{50} = 3,5 \pm 0,6$  a  $8,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ) do que o derivado 4-metóxi-chalcona ( $IC_{50} = 16,6 \pm 1,6 \mu\text{M}$ ) e outros derivados de chalconas tais como aqueles descritos por Lunardi e colaboradores (Lunardi *et al.*, 2003) ( $13,7 - 182,3 \mu\text{M}$ ). Embora os compostos sintetizados pelo nosso grupo tenham sido menos ativos do que anfotericina B ( $IC_{50} = 0,3 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ), eles foram mais ativos do que a pentamidina ( $IC_{50} = 19,6 \mu\text{M}$ ), um medicamento de uso corrente no tratamento da leishmaniose.

A adição da anilina substituída na posição R do grupo sulfonamida, representado pelo composto **3e**, foi o único que afetou negativamente a atividade inibitória do crescimento da forma promastigota de *L. braziliensis* ( $IC_{50} = 69 \pm 3,7 \mu\text{M}$ ) comparado ao composto **3**. Observa-se também que todas as substituições (substituintes doadores ou retiradores de elétrons) na sub-unidade sulfonamida ou na posição *para* do anel aromático da anilina mantiveram o perfil leishmanicida (derivados **3a-3d** e **3f-3h**) sugerindo a possibilidade de novas interações dessas posições com regiões específicas do receptor (Figura 18 e Tabela 1).

O composto **3i** demonstrou o melhor perfil contra a forma promastigota de *L. braziliensis* ( $IC_{50} = 3,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ). O grupo benzilamino parece contribuir significativamente para esta atividade uma vez que este composto foi cerca de 20 vezes mais ativo do que o composto **3e** ( $IC_{50} = 69 \pm 3,7 \mu\text{M}$ ) (Tabela 1). Assim, observa-se que a inserção de um átomo de carbono (**3i**) foi suficiente para evitar os efeitos deletérios da anilina (**3e**), provavelmente permitindo interações hidrofóbicas com o sítio receptor do parasita. Os ensaios *in vitro*,

realizados com a forma amastigota de *Leishmania braziliensis*, demonstraram que o composto mais ativo (**3i**) foi capaz de reduzir significativamente o número de formas intracelulares (Figura 18D), indicando a possibilidade deste composto ser um candidato a agente leishmanicida.

Foi também avaliado experimentalmente a atividade citotóxica dos derivados **3** e **3a-i** contra macrófagos de peritônio de ratos. Os resultados mostram que os valores de  $CC_{50}$  variam de  $57,8 \pm 4,8$  a  $105,7 \pm 6,5$   $\mu\text{M}$  (Figura 18B). De fato, a presença dos substituintes do grupo sulfonamida parece desempenhar um papel mais importante para a atividade leishmanicida do que para o perfil citotóxico (Figura 18B, Tabela 1).

Os valores de  $CC_{50}$  foram utilizados para calcular o índice de seletividade (IS) para estes derivados, os quais foram mais altos do que 4-metóxi-chalcona não substituído, exceto **3c** e **3e**. Este resultado mostra uma melhora no índice de seletividade comparado ao protótipo **3** (Figura 18C). Os derivados 4-metóxi-chalcona sulfonamidas também foram avaliados contra a forma epimastigota de *T. cruzi*. Entretanto, diferentemente da chalcona descrita por Lunardi e colaboradores, que foi ativa contra *L. braziliensis* (13,7-182,3  $\mu\text{M}$ ) e cepas de *T. cruzi* (24,8-126,4  $\mu\text{M}$ ), esta nova série não apresentou atividade em concentrações superiores de 500  $\mu\text{M}$ . Este dado sugere que a série 4-metóxi-chalcona sulfonamidas atua em um alvo terapêutico diferente ao daquele descrito para a série de Lunardi e colaboradores (Lunardi *et al.*, 2003), devido sua especificidade para *Leishmania*. Estudos anteriores demonstraram que derivados de chalconas podem atuar na mitocôndria do parasita em função de inibir a atividade de fumarato redutase, succinato desidrogenase, NADH desidrogenase, ou succinato e NADH-citocromo c redutase (ZHAI *et al.*, 1995; ZHAI *et al.*, 1999). Entretanto, como estas enzimas podem estar presentes em *T. cruzi* e os novos derivados descritos aqui não afetam este parasita, investigações sobre o mecanismo de ação devem ser realizadas.



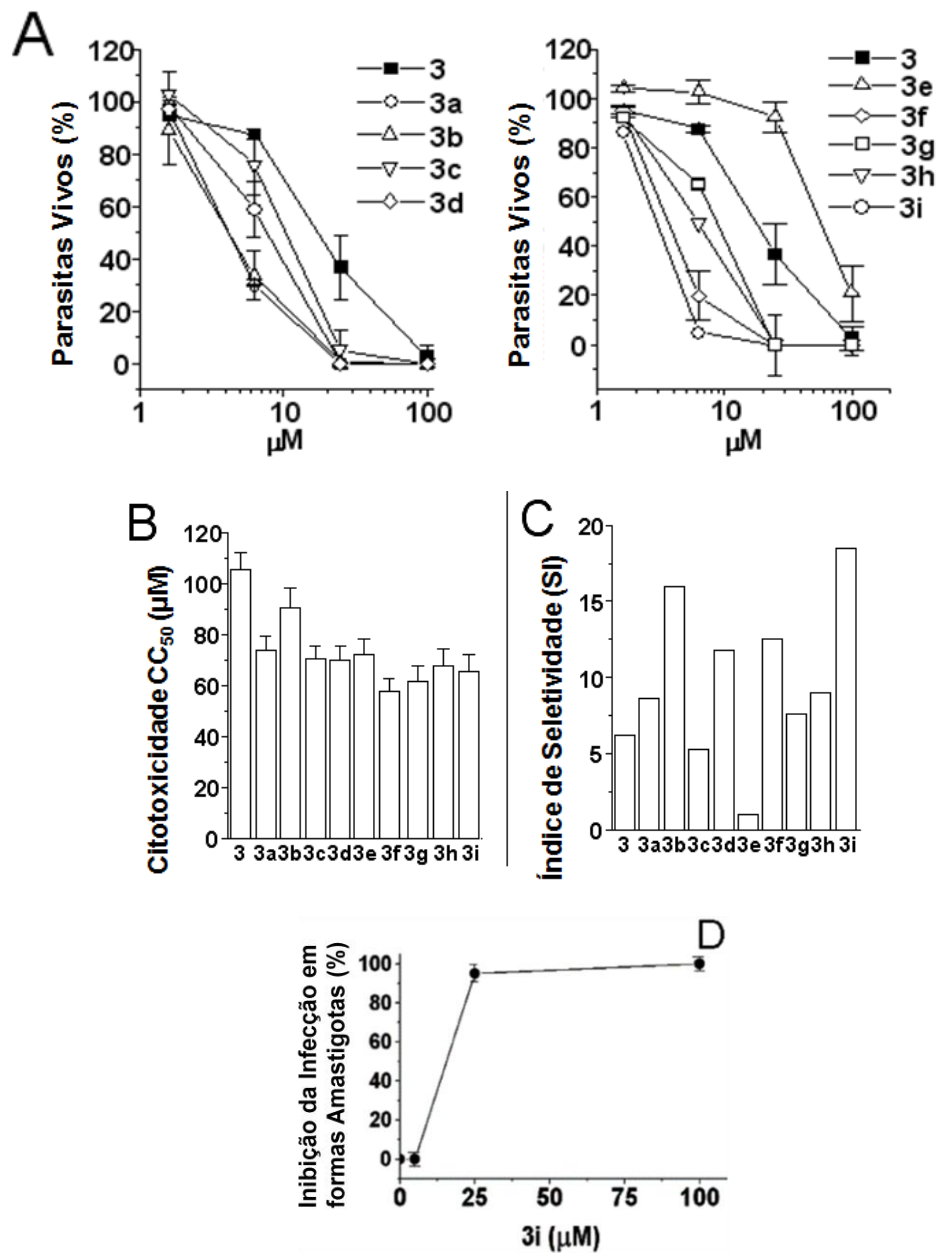
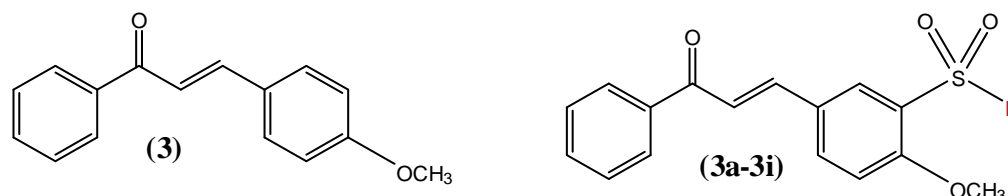


Figura 18. Avaliação Biológica dos derivados 4-metóxi-chalcona (3) e 4-metóxi-chalcona sulfonamida (3a-i). Efeito inibitório na proliferação *in vitro* de parasitas da espécie *Leishmania braziliensis* (A), perfil citotóxico em macrófagos de ratos (B), índice de seletividade (SI) calculado (C) e inibição da infecção por formas amastigotas de *Leishmania braziliensis* em macrófagos utilizando o composto mais ativo (3i) (D).

**Tabela 1.** Atividade leishmanicida ( $IC_{50}$ ) dos derivados 4-metóxi-chalcona (**3**) e 4-metóxi-chalcona sulfonamida (**3a-i**) com suas respectivas propriedades eletrônicas teóricas (Dipolo,  $E_{HOMO}$ ,  $E_{LUMO}$ ) e a “Regra-dos-Cinco” de Lipinski (número de doadores e aceptores de ligação hidrogênio (HBD e HBA respectivamente), cLogP e Peso molecular (PM).



Composto	R	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Dipole (Debye)	Lipinski (Regra-dos-Cinco)			
						HBD	HBA	cLogP	PM (Da)
<b>3</b>	-	$16,6 \pm 1,6$	-8,43	2,01	3,39	0	2	3,63	238,29
<b>3a</b>	$N(CH_3)_2$	$8,6 \pm 0,4$	-8,38	2,04	7,32	0	5	2,61	345,42
<b>3b</b>	$N(CH_2CH_3)_2$	$5,6 \pm 0,4$	-8,40	2,09	8,95	0	5	3,29	373,47
<b>3c</b>	Pirrolidina	$13,0 \pm 1,3$	-8,76	0,95	7,23	0	5	2,93	371,46
<b>3d</b>	Morfolina	$5,9 \pm 1,3$	-8,59	1,87	7,31	0	6	2,21	387,46
<b>3e</b>	Anilina	$69,0 \pm 3,7$	-8,57	1,87	8,67	1	5	4,04	393,46
<b>3f</b>	4-Cloroanilina	$4,6 \pm 1,3$	-8,19	2,09	8,20	1	5	4,60	427,91
<b>3g</b>	3,4 dicloroanilina	$8,1 \pm 1,6$	-8,89	0,95	7,84	1	5	5,16	462,35
<b>3h</b>	4-Metóxi-anilina	$7,5 \pm 0,8$	-8,27	2,06	7,56	1	6	3,91	423,49
<b>3i</b>	Benzilamina	$3,5 \pm 0,6$	-8,59	1,87	7,17	1	5	4,11	407,49

## 5.2 ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR DOS DERIVADOS 4-METÓXI-CHALCONA (**3**) E 4-METÓXI-CHALCONA SULFONAMIDA (**3a-i**)

Os estudos computacionais dos derivados foram realizados e as propriedades estruturais e eletrônicas foram avaliadas com o intuito de obter informações importantes que possam ser correlacionadas com a respectiva atividade leishmanicida.

Uma análise do perfil de atividade mostrou que a presença do grupo sulfonamida aumentou a atividade dos derivados **3a-i** em comparação ao composto **3**. Observou-se que o aumento do volume, peso molecular e momento dipolo desses derivados parecem aumentar a atividade comparado com **3**, exceto para **3e** (Tabela 1). O estudo conformacional dos compostos **3** e **3a-i** sugere que o aumento da atividade biológica é devido provavelmente a novas interações com o sítio receptor em virtude de um novo plano molecular criado em

função da inserção do grupo sulfonamida (Figura 19). Uma análise geral das propriedades eletrônicas calculadas para os derivados 4-metóxi-chalcona (**3**, **3a-i**), tais como os valores de energia de HOMO e LUMO e de momento dipolo não demonstraram uma correlação direta com a atividade leishmanicida.

Através da análise dos mapas de potencial eletrostático também não foi possível estabelecer nenhuma relação com a atividade (Figura 19). Entretanto a densidade de HOMO dos compostos mais ativos está concentrada no centro da sub-unidade chalcona (função cetona  $\alpha$ - $\beta$  insaturada) que une os anéis A e B (Figura 20) sugerindo que essa região pode desempenhar um papel importante para a atividade leishmanicida.

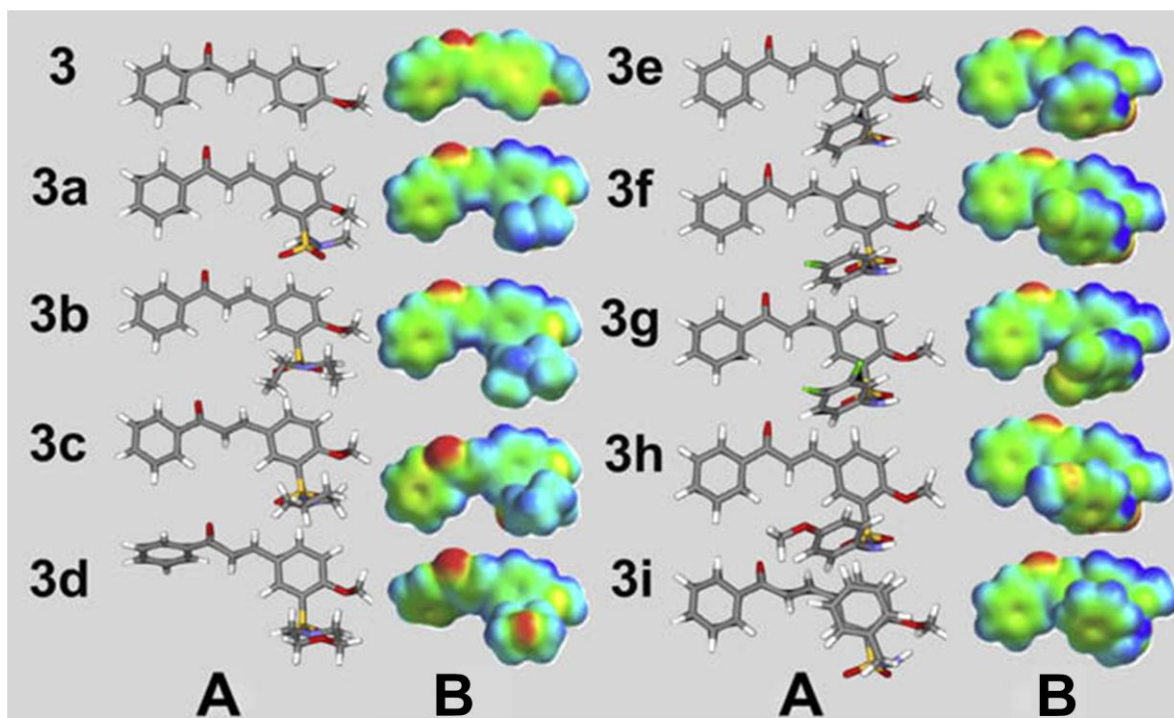


Figura 19. Conformações de mínimo de energia (A) e o Mapa de Potencial Eletrostático (B) dos derivados 4-metóxi-chalcona (**3**) e 4-metóxi-chalcona sulfonamida (**3a-i**).

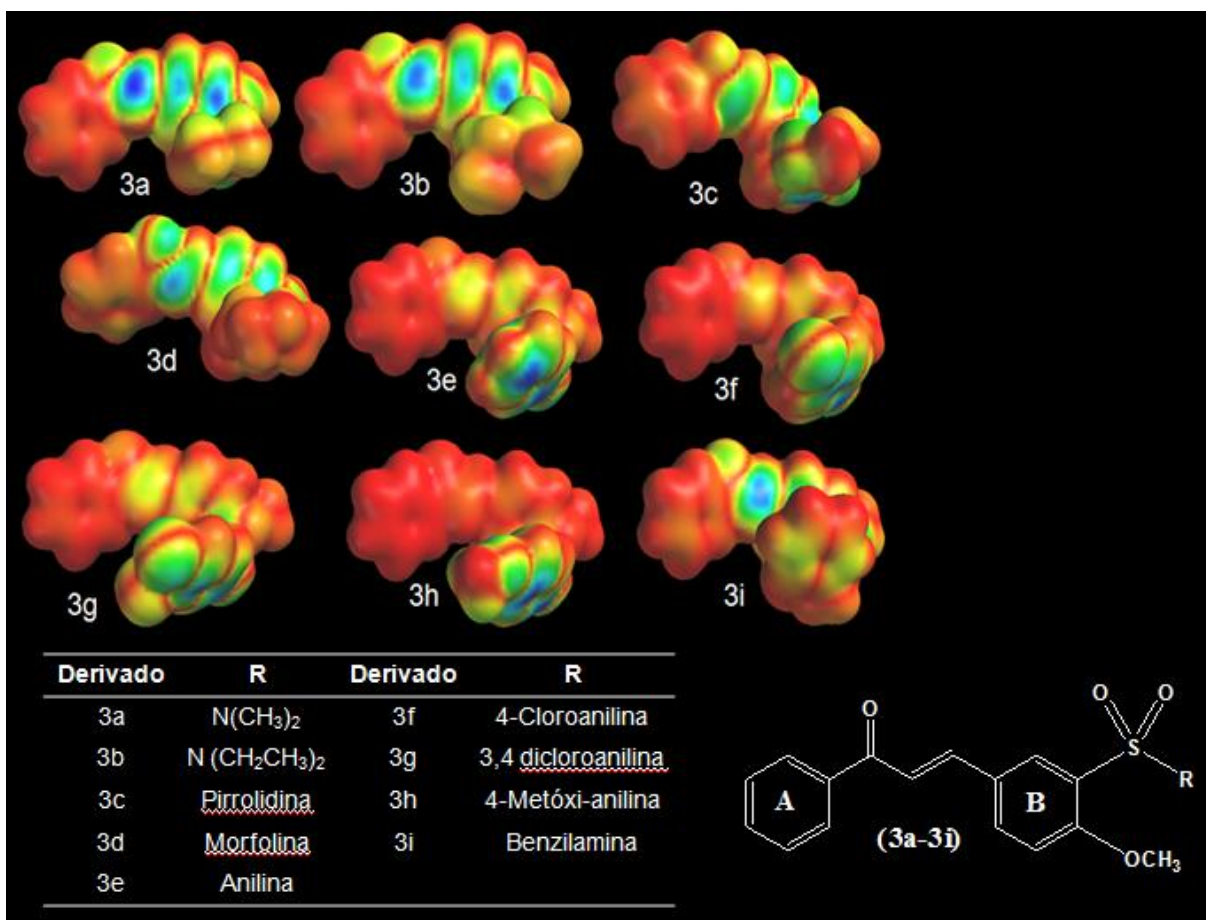


Figura 20. Densidade de HOMO dos derivados 4-metóxi-chalcona sulfonamida (3a-i). A Densidade absoluta de HOMO é codificada em uma superfície de van der Waals (isodensity 0.002 e/au<sup>3</sup>) mapeada da região mais vermelha (0,00) a região mais azul (0,02).

A anilina, presente em **3e**, comprometeu significativamente a atividade biológica. Pode-se observar que o derivado **3e**, que reorientou a densidade de HOMO para o anel anilina, acarretou uma perda de atividade quando comparado ao composto **3**. É importante observar que a adição de um átomo de cloro (**3f**), que possui um perfil elétron-atrator, restaurou a atividade. Contudo, o volume e as características estereoeletrônicas são provavelmente importantes para o perfil leishmanicida dessa série, visto que a adição de dois átomos de cloro (**3g**) ou um grupo metóxi (**3h**), aos quais possuem maiores volumes e características eletrostáticas diferenciadas, diminui em mais de duas vezes a atividade quando comparado ao composto **3f**. Entretanto estes substituintes ainda contribuem para a atividade considerando que estes derivados são mais ativos do que **3e**. Analisando a estrutura do composto mais ativo (**3i**) e do menos ativo (**3e**), observa-se que a adição de um átomo de carbono como espaçador em **3i** foi importante para a formação de uma interação tipo “ $\pi$ - $\pi$  stacking” entre o anel anilina substituído e o anel B do derivado 4-metóxi-chalcona

sulfonamida (Figura 21), ao qual pode ser importante para a interação com o sítio receptor, considerando que esta orientação pode evitar regiões estericamente proibidas no alvo terapêutico.

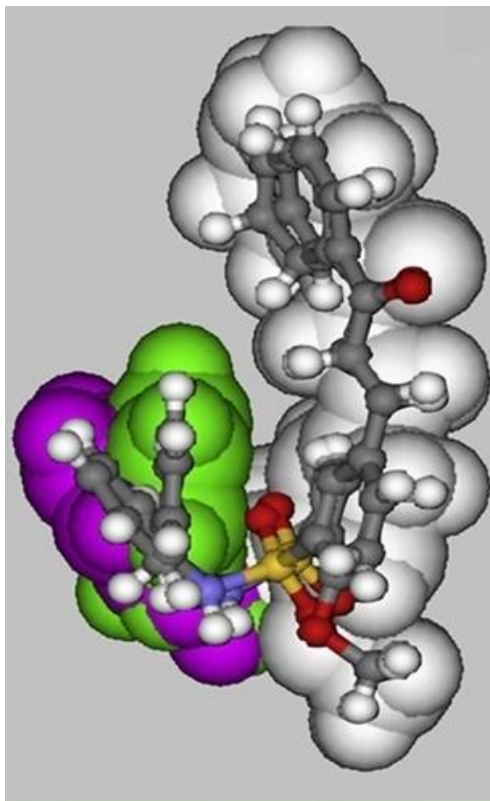


Figura 21. Sobreposição dos derivados mais ativo (3i) (verde) e menos ativo (3e) (roxo) da série 4-metóxi-chalcona sulfonamida.

### 5.3 ESTUDO DO PERFIL FÍSICO-QUÍMICO, FARMACOCINÉTICO E TOXICOLÓGICO TEÓRICO (*IN SILICO*)

#### 5.3.1 Drug-Likeness e Drug-Score

A fim de determinar alguns parâmetros toxicológicos *in silico* importantes para a avaliação de um candidato a fármaco, foi utilizado o programa Osiris® (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo>). Este programa também foi utilizado para realizar os cálculos de Drug-Likeness e Drug-Score dos compostos mais ativos da série de derivados (**3**, **3b**, **3d**, **3f** e **3i**). Os dados obtidos revelaram que os derivados mais ativos da série 4-metóxi-chalcona

sulfonamida apresentaram um índice de Drug-Likeness superior a fármacos utilizados atualmente no tratamento da leishmaniose, como Pentamidina e Glucantime® (Figura 22A).

Neste estudo, foi avaliado também, o Drug-Score, que combina os dados de Drug-Likeness, cLogP, LogS, peso molecular e riscos tóxicos teóricos em uma única escala e que pode ser usado para classificar o composto como um possível fármaco (Figura 22 A). Os resultados mostraram que o composto mais ativo (**3i**) apresentou um valor muito bom de Drug-Score e muito próximo ao da Pentamidina.

Na avaliação do perfil toxicológico *in silico*, observou-se que os derivados da série 4-metóxi-chalcona sulfonamida apresentaram um baixo perfil toxicológico tais como tumorigenicidade, efeitos irritativos e efeitos no sistema reprodutor, sendo semelhantes ao Glucantime®, um fármaco atualmente em uso para a terapia da leishmaniose (Figura 22 B).

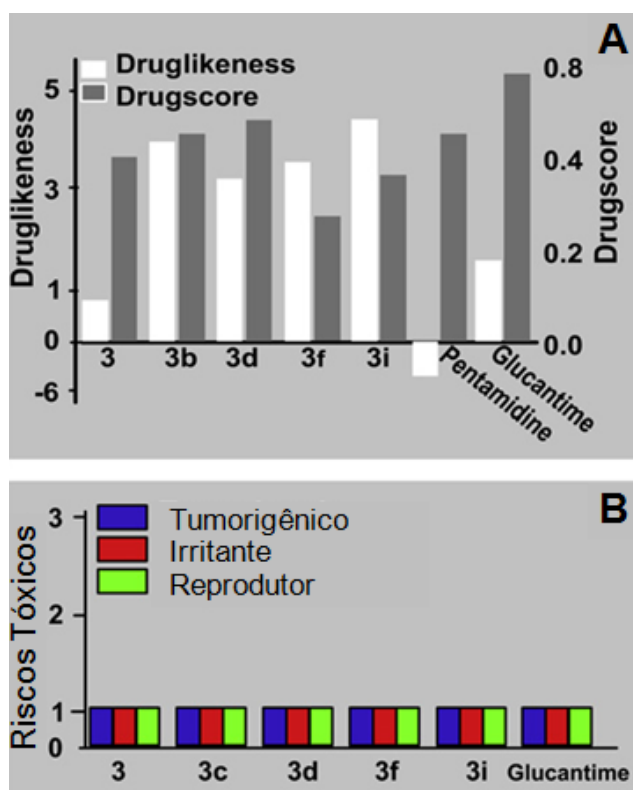


Figura 22. Resultados dos parâmetros Drug-Likeness e Drug-Score (A) e riscos toxicológicos teóricos (B) dos derivados 4-metóxi-chalcona (3), 4-metóxi-chalcona sulfonamida (3c, 3d, 3f e 3i) e Glucantime®

Deve-se ter em mente que o baixo efeito tóxico teórico atribuído aos demais derivados não significa ausência de possíveis efeitos tóxicos graves, mas uma probabilidade de um bom desempenho no aspecto avaliado. A avaliação “*in silico*” da toxicidade, não elimina a necessidade dos testes toxicológicos tradicionais.

### 5.3.2. Regra-dos-Cinco (Lipinski)

Com o objetivo de reforçar o estudo do perfil físico-químico teórico dos derivados, foram realizados alguns cálculos de parâmetros relacionados com a biodisponibilidade oral de acordo com a Regra dos Cinco de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 2001). Os resultados revelaram que a lipofilicidade dos derivados 4-metóxi-chalcona sulfonamida (**3**, **3a-i**) não foram superiores a 5,0 ( $2,21 > cLogP < 4,60$ ) que, de acordo com Lipinski, é uma característica importante para uma boa absorção e permeação de um fármaco (LIPINSKI, 2001; TETKO, 2006) (Tabela 2). Além disso, o peso molecular dos derivados ( $345,42 > PM < 462,35$ ) é semelhante a mais de 80% dos medicamentos disponíveis comercialmente ( $PM < 450$  Da) e determinado pela Regra-dos-Cinco de Lipinski (WATERBEEMD & GIFFORD, 2003). Os resultados obtidos mostraram que não houve nenhuma violação das regras de Lipinski ( $2,21 > cLogP < 4,60$ ;  $345,42 \text{ Da} > PM < 423,49 \text{ Da}$ ;  $HBA = 2-5$  e  $HBD = 0-1$ ) sugerindo a importância destes derivados como candidatos a fármacos e com boa biodisponibilidade por via oral.

Tabela 2. Resultados da avaliação da Regra-dos-Cinco de Lipinski.

Regra dos Cinco de Lipinski				
Composto	HBD	HBA	cLogP	PM (Da)
3	0	2	3,63	238,29
3a	0	5	2,61	345,42
3b	0	5	3,29	373,47
3c	0	5	2,93	371,46
3d	0	6	2,21	387,46
3e	1	5	4,04	393,46
3f	1	5	4,60	427,91
3g	1	5	5,16	462,35
3h	1	6	3,91	423,49
3i	1	5	4,11	407,49

#### 5.4 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO PERFIL LEISHMANICIDA DAS 4-METÓXI-CHALCONA SULFONAMIDAS CONTRA *Leishmania amazonensis*

Resultados anteriores demonstraram que uma série de derivados 4-metóxi-chalcona sulfonamida (**3a-i**) apresentaram um significativo perfil leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. braziliensis*, incluindo o derivado **3** que não contém os substituintes sulfonamidas. Essa informação reforça os dados contidos na literatura quanto ao perfil leishmanicida das chalconas. No presente trabalho, a série das 4-metóxi-chalcona sulfonamida (**3a-i**) também foi testada contra as formas promastigotas e amastigotas de parasitas da espécie *Leishmania amazonensis* com a finalidade de identificar algum perfil leishmanicida para essa espécie. Observou-se que a presença da sulfonamida é essencial para exibir um bom perfil contra essa espécie (Figura 23) em contraste com os resultados dos ensaios para a forma promastigota de *L. braziliensis*. O interessante é que a combinação dos dois grupos farmacofóricos, chalcona e sulfonamida, melhorou significativamente a atividade



leishmanicida para as formas promastigotas do que para as formas amastigotas de *L. amazonensis* (Figura 24).

Aparentemente, o aumento do volume dos substituintes nesses derivados também contribuiu para o aumento da atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, mas não para *L. braziliensis* (Figura 23). Por outro lado, esta adição comprometeu a atividade desses derivados contra as formas amastigotas de *L. amazonensis* (Figura 24).

#### 5.4.1 Avaliação dos derivados 4-metóxi-chalcona sulfonamida (3a-i) contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*

Todos os derivados de chalcona (**3a-3i**) mostraram um efeito inibitório dependente da concentração, exceto o composto **3e**, semelhante ao observado contra as formas promastigotas de *L. braziliensis*. A maioria dos derivados de 4-metóxi-chalcona sulfonamida apresentou uma atividade inibitória contra *L. amazonensis* maior do que o derivado 4-metóxi-chalcona (**3**) (Figura 23), tendo como mais ativos os derivados **3f**, **3g** e **3h** com as anilinas *para*-substituídas ( $IC_{50}$ = 4,3  $\mu$ M; 5,6  $\mu$ M e 5,5  $\mu$ M, respectivamente) em contraste com o resultado com *L. braziliensis* onde os derivados mais ativos foram **3i**, **3b** e **3d** (Figura 23).

A única exceção foi o derivado **3f** que apresentou uma atividade similar para as duas espécies de parasita na mesma faixa de concentração ( $IC_{50}$  = 4,3 e 4,6  $\mu$ M). Apesar desses aspectos, os derivados foram menos ativos que a Anfotericina B ( $IC_{50}$ =0,3  $\pm$  0,02  $\mu$ M), mas foram mais ativos que a Pentamidina ( $IC_{50}$ =19,6  $\mu$ M) e Glucantime® (163,7  $\mu$ M), medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose.

#### 5.4.2 Avaliação das 4-metóxi-chalcona sulfonamida (3a-i) contra as formas amastigotas de *L. amazonensis*

Quando avaliados contra as formas amastigotas de *L. amazonensis*, os derivados **3a-3i** mostraram-se menos ativos se comparados com a atividade contra formas promastigotas, exceto pelo composto **3f** (Figura 24). É interessante ressaltar, que este derivado mostrou ser mais ativo contra as formas amastigotas ( $IC_{50} = 2,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ) do que contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* (Figure 24). Aparentemente, a atividade da maioria desses derivados contra as formas amastigotas de *L. amazonensis* é comprometida por qualquer grupo ou átomo que resulta em um derivado mais polar ou que altere o seu volume, o que pode resultar em problemas estéricos. Desta forma, os resultados indicam que o derivado mais promissor como protótipo para o tratamento da leishmaniose seria o **3f** e não o **3i**, já que ele atuaria em ambas as formas (promastigota e amastigota) e espécies (*L. amazonensis* e *L. braziliensis*). Entretanto, esses compostos, incluindo o **3i**, poderiam ser úteis como ferramentas experimentais para se estudar e tentar compreender os mecanismos que levam a uma especificidade para uma determinada espécie.

A *L. braziliensis* pode causar infecções viscerais ou lesões cutâneas disseminadas em pacientes HIV, enquanto a *L. amazonensis* dependendo da distribuição geográfica pode causar ulcerações na pele simples ou difusa, principalmente na face, levando à mutilação e desfiguração. Total compreensão destes sistemas parasitários, ainda é essencial para a obtenção de um tratamento apropriado para cada tipo de leishmaniose. Com este objetivo novas ferramentas experimentais que diferenciem esses parasitas devem ser pesquisadas.

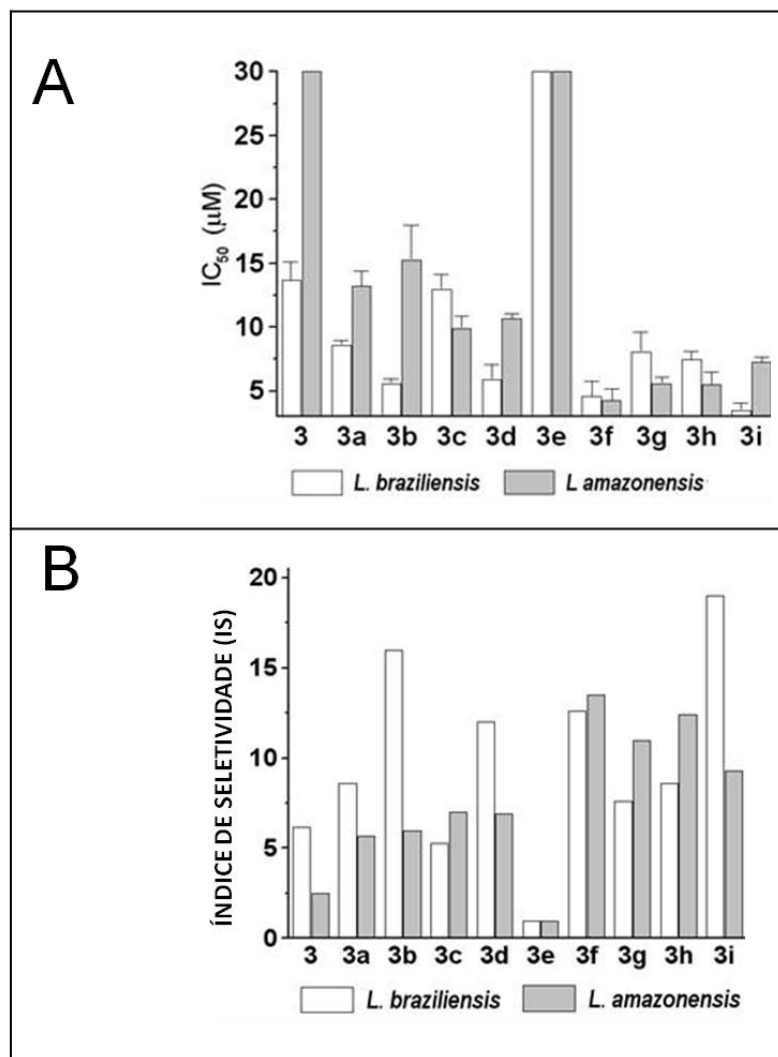


Figura 23. Comparação do efeito leishmanicida (A) e o Índice de Seletividade (IS), entre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

Os cálculos de Índice de Seletividade (IS) e os dados de citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) foram realizados utilizando a mesma metodologia empregada para as espécies de *L. braziliensis*. O índice de seletividade de alguns derivados (**3c**, **3f**, **3g** e **3h**) apresentou melhores resultados quando calculados para as formas promastigotas de *L. amazonensis* do que para *L. braziliensis* (Figura 23). É interessante ressaltar que o derivado mais ativo **3f** apresentou maior seletividade quando testada contra formas amastigotas de *L. amazonensis*, do que o Pentostam (Figura 24B). De acordo com o estudo toxicológico *in silico* (efeitos mutagênicos, irritantes e efeitos no sistema reprodutor) esses derivados mostraram-se livres de riscos tóxicos, reforçando o derivado **3f** como um candidato promissor para posteriores estudos de novos fármacos leishmanicidas.

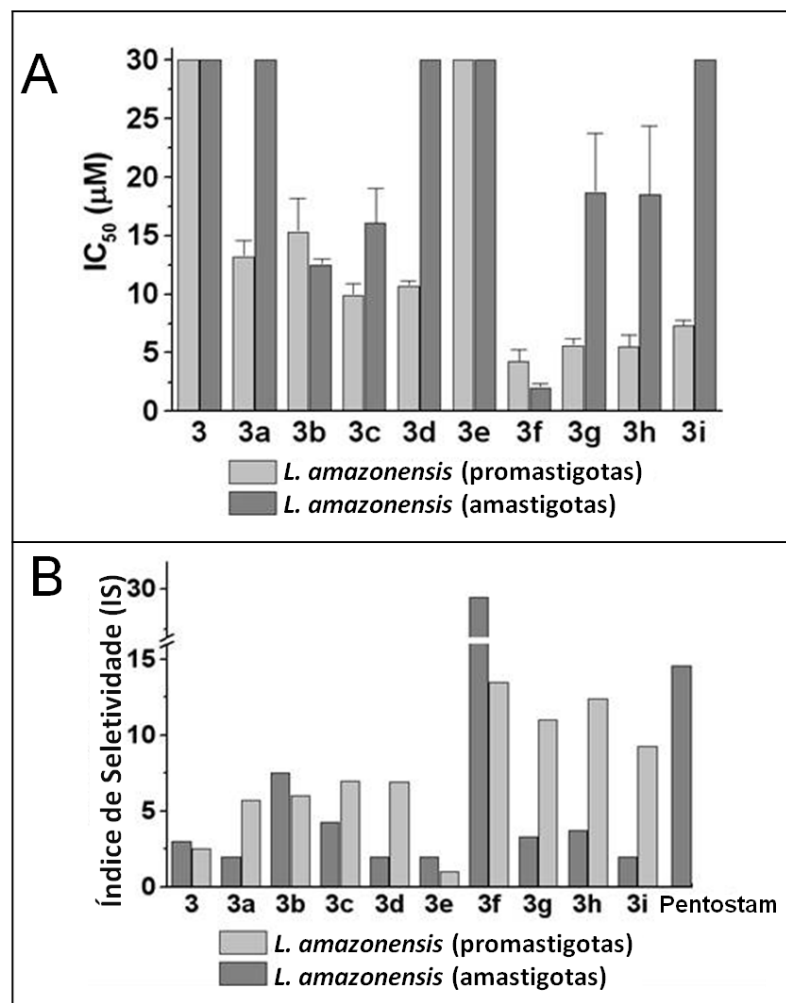


Figura 24. Comparação do efeito leishmanicida (A) e o Índice de Seletividade (B) dos derivados 4-metóxi-chalcona (3) e 4-metóxi-chalcona sulfonamida (3a-i) contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*

### 5.5 ESTUDOS DE RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DOS DERIVADOS 4-METÓXI-CHALCONA CONTRA *Leishmania amazonensis*

Os estudos de relação estrutura-atividade revelaram que a presença das aminas aromáticas foram essenciais para a melhora da atividade dos compostos. Um fator importante que deve ser de se ressaltado é a melhor atividade dos derivados com aminas secundárias (3f, 3g e 3h), podendo estar relacionado, provavelmente, a interações do tipo ligação hidrogênio com o sítio receptor. A análise da densidade de HOMO dessa série de compostos revelou que o composto mais ativo (3f) apresenta certo nível da densidade localizada no anel anilina substituído, enquanto os derivados menos ativos apresentam essa densidade concentrada na

região da função cetona  $\alpha$ - $\beta$  insaturada (Figura 20). Esses resultados indicam uma possível suscetibilidade dessa região para sofrer ataques eletrofílicos que sejam necessários para ocorrer uma interação com o sítio receptor. Esses dados reforçam o perfil promissor dos derivados 4-metóxi-chalcona sulfonamida na busca por novos candidatos a fármacos para o tratamento da leishmaniose.

## 5.6 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DERIVADOS TIENO-PIRIDINA COM ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Neste trabalho essa nova série de derivados tieno-piridinas (**4**, **4a-j**) foi avaliada contra formas promastigotas de parasitas da espécie *Leishmania amazonensis* usando como controle positivo o Glucantime®. Um resultado interessante é que todos os compostos apresentaram uma atividade inibitória significativa (> 50%) após 24 horas, mesmo os derivados sem substituinte no anel fenila (Figura 25).

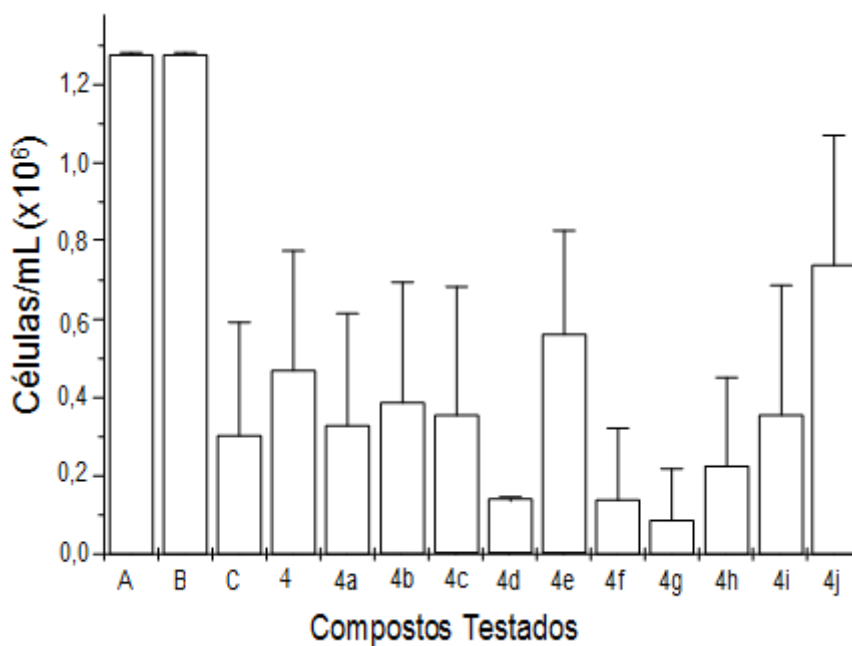


Figura 25. Efeito dos derivados tieno-piridina [50 $\mu$ M] na proliferação de parasitas na forma promastigota da espécie *Leishmania amazonensis* após 24 horas de incubação. A = Controle; B = DMSO; C = Glucantime ; 4 = H; 4a = *m*-CH<sub>3</sub>; 4b = *m*-OCH<sub>3</sub>; 4c = *m*-NO<sub>2</sub> ; 4d = *m*-F ; 4e = *m*-Br; 4f = *p*-CH<sub>3</sub>; 4g = *p*-OCH<sub>3</sub>; 4h = *p*-NO<sub>2</sub>; 4i = *p*-F, e 4j = *p*-Br.

Os resultados apontaram os derivados **4d** (*m*-F), **4f** (*p*-CH<sub>3</sub>), **4g** (*p*-OCH<sub>3</sub>) e **4h** (*p*-NO<sub>2</sub>) com uma atividade considerável sendo os derivados **4f** e **4g** com o maior perfil leishmanicida (IC<sub>50</sub> = 29,49 μM e 32,23 μM, respectivamente) sendo melhores até mesmo que o composto de referência Glucantime® (IC<sub>50</sub> = 163,7 μM) (Figura 26).

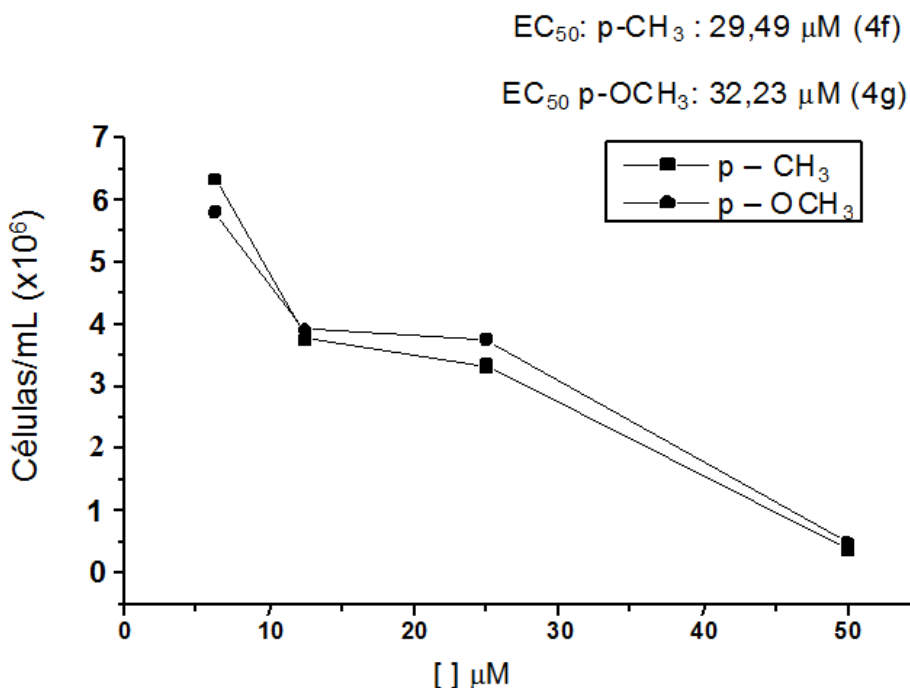


Figura 26. Efeito das diluições seriadas (6,25 - 50 μM) do derivado **4f** (*p*-CH<sub>3</sub>) e **4g** (*p*-OCH<sub>3</sub>) sobre a proliferação *in vitro* de parasitas da espécie *Leishmania amazonensis* depois de 24 horas. Glucantime® = EC<sub>50</sub>=163,7μM.

Aparentemente, a posição do substituinte no anel fenila substituído influencia na atividade, sendo os *para*-substituídos os que apresentaram melhor perfil inibitório (i.e., *p*-CH<sub>3</sub> = 88,30% e *p*-OCH<sub>3</sub> = 95,45%) exceto pelos derivados **4j** (*p*-Br) e **4e** (*m*-Br) que exibiram o menor perfil inibitório (> 63%) comparativamente com o derivado não substituído.

Os derivados mais ativos da série foram submetidos a um estudo do perfil citotóxico em células mononucleadas periféricas que demonstraram não haver citotoxicidade dos compostos mais ativos (**4f** e **4g**) na concentração utilizada (Figura 27). Esses dados serão comparados com os resultados de estudos toxicológicos teóricos.

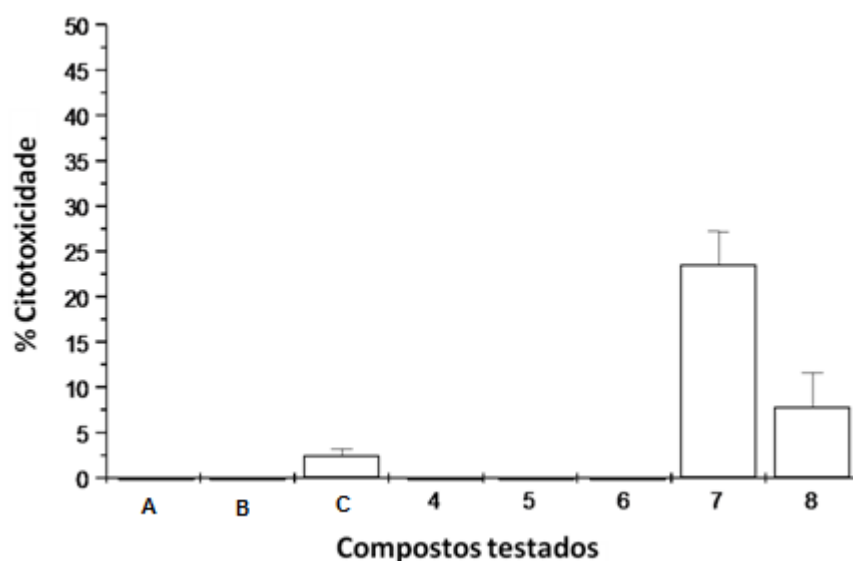
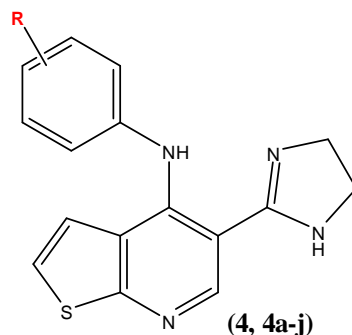


Figura 27. Efeito citotóxico dos derivados Tieno-piridinas (50  $\mu\text{M}$ ) sobre células mononucleadas após 24 horas de incubação. A = Controle; B = DMSO ; C = Glucantime ; 4 = *p*-CH<sub>3</sub>, 5 = *p*-OCH<sub>3</sub>, 6 = *p*-NO<sub>2</sub>, 7 = *m*-Br e 8 = *p*-Br.

### 5.7 ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR DOS DERIVADOS TIENO-PIRIDINAS (4, 4a-j)

Os estudos de modelagem molecular foram realizados no programa Spartan 08 a fim de gerar informações sobre propriedades estruturais e eletrônicas dos derivados Tieno-piridinas que pudessem ser correlacionadas com a atividade leishmanicida. Numa primeira abordagem, utilizou-se a análise conformacional através de métodos semi-empíricos AM1 para avaliar a geometria dos derivados. Os derivados *para*-substituídos mais estáveis foram utilizados nesse estudo. Essa informação se torna importante já que os derivados *para*-substituídos revelaram melhor perfil inibitório do que os derivados *meta*-substituídos, revelando um possível impedimento estérico nessa região, exceto pelo derivado **4e** (Tabela 3).

**Tabela 3. Comparação da atividade leishmanicida (%) dos derivados Tieno-Piridina (4, 4a-j) com suas respectivas propriedades eletrônicas teóricas (Dipolo,  $E_{\text{HOMO}}$ ,  $E_{\text{LUMO}}$ ) e a “Regra-dos-Cinco” de Lipinski incluindo número de aceptores e doadores de ligação hidrogênio (HBA e HBD respectivamente), cLogP e Peso molecular (PM).**



Compostos	R	Perfil Inibitório (%)	Energia (Ev)		Dipolo (debye)	Lipinski “Regra-dos-Cinco”			
			HOMO	LUMO		cLogP	(HBA)	(HBD)	PM
4	H	59,6	-5,40	-1,28	2,98	2,57	4,0	1,0	294,38
4a	m-CH <sub>3</sub>	71,7	-5,35	-1,26	3,12	3,05	4,0	1,0	308,41
4b	m-OCH <sub>3</sub>	66,8	-5,29	-1,28	3,09	2,44	5,0	1,0	324,41
4c	m-NO <sub>2</sub>	69,8	-5,94	-2,37	4,77	2,60	7,0	1,0	339,38
4d	m-F	88,1	-5,57	-1,39	2,63	2,73	4,0	1,0	312,37
4e	m-Br	51,9	-5,66	-1,45	2,74	3,40	4,0	1,0	373,28
4f	p-CH <sub>3</sub>	88,3	-5,26	-1,25	3,14	3,05	4,0	1,0	308,41
4g	p-OCH <sub>3</sub>	95,4	-5,02	-1,20	3,81	2,44	5,0	1,0	324,41
4h	p-NO <sub>2</sub>	80,7	-6,06	-2,18	5,48	2,60	7,0	1,0	339,38
4i	p-F	69,4	-5,40	-1,35	2,63	2,73	4,0	1,0	312,37
4j	p-Br	36,4	-5,54	-1,45	2,79	3,40	4,0	1,0	373,28
Glucantime	-	73,9	-	-	-	-	-	-	-

Outro estudo que se mostra de grande importância para o entendimento da contribuição eletrônica desses derivados para a atividade, são os mapas de potencial eletrostáticos (MEP) que foram gerados através de cálculos pelo método da Teoria do Funcional de Densidade (DFT = *Density Functional Theory*) em uma base de 6-31G\*.

Observa-se através da análise do mapa de potencial eletrostático dos derivados Tieno-piridinas, que os compostos mais ativos (**4f** e **4g**) apresentam uma região com maior densidade eletrônica sobre o anel fenila substituído (Figura 28 A). O derivado **4h** (*p*-NO<sub>2</sub>) apresentou um perfil eletrônico completamente diferente dos outros derivados. O grupo nitro é um forte grupo retirador de elétrons (**4c** e **4h**) e reduziu drasticamente a densidade eletrônica no anel fenila e do sistema tieno-piridina, o que poderia explicar a reduzida atividade



biológica do derivado **4h**. A análise da densidade de HOMO revelou uma maior concentração sobre o anel fenila substituído, sugerindo que essa região pode ser susceptível a uma interação importante com o sítio receptor (Figura 28 B).

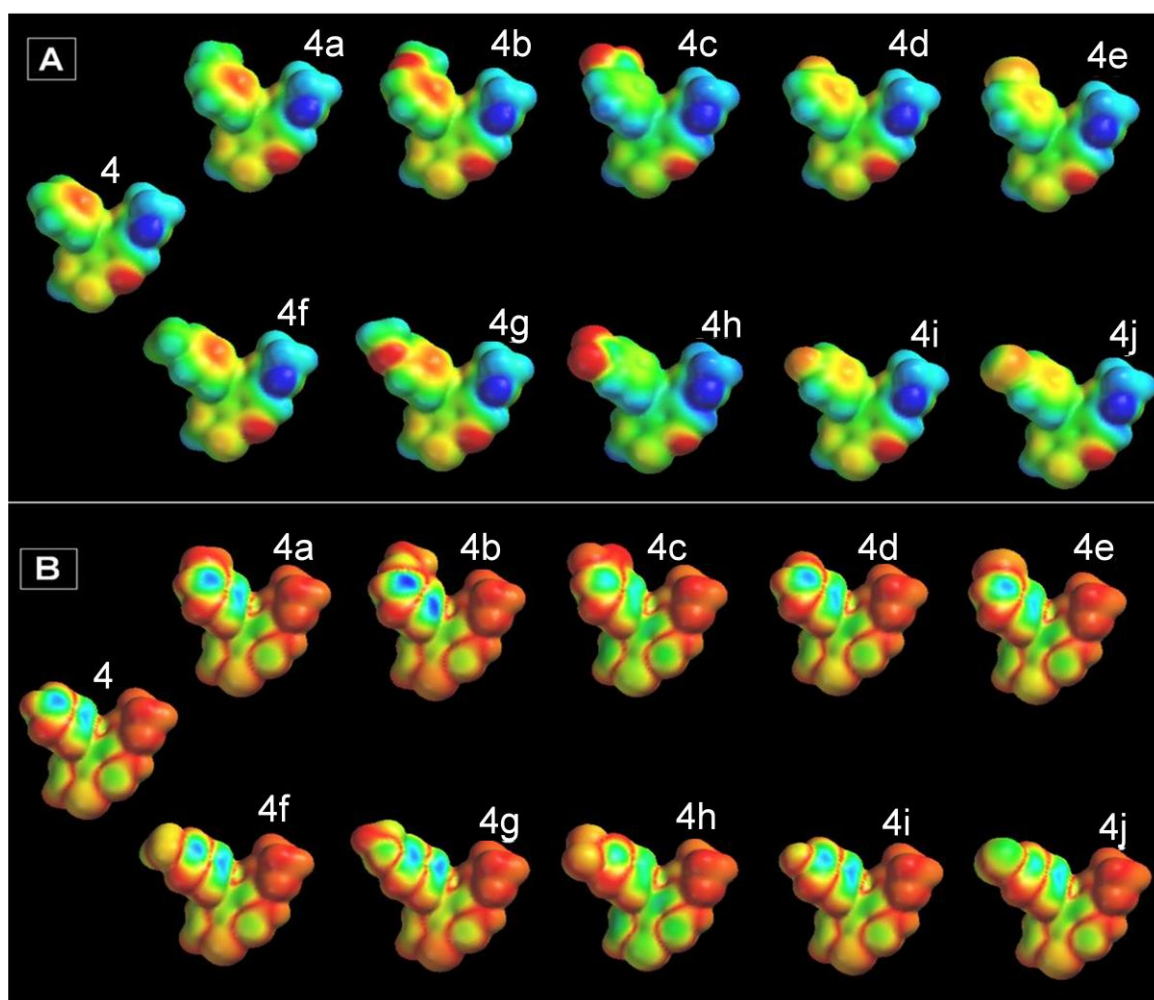


Figura 28. (A) Mapa de Potencial Eletrostático (MEP) dos derivados Tieno-piridina (4, 4a-j) sobre uma superfície de  $0,002 \text{ e/ua}^3$  com uma faixa de energia de  $-25,0$  (regiões vermelhas) a  $+30,0$  (regiões azuis) kcal/mol. (B) Densidade de HOMO sobre uma superfície de densidade eletrônica constante de  $(0.002 \text{ e/au}^3)$ .

## 5.8 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E TOXICOLÓGICAS *IN SILICO*

### 5.8.1 Perfil Drug-Likeness

O índice de Drug-Likeness indica se um composto apresenta determinadas características essenciais observadas na maioria dos fármacos disponíveis no mercado. Assim, este índice mostra a capacidade de um determinado composto em ser um candidato potencial a se tornar um fármaco. O potencial Drug-Likeness dos compostos mais ativos (**4**, **4d**, **4f**, **4g**, **4h**, **4j**) e do Glucantime® foram calculados, sendo esse último utilizado como controle positivo por ser um fármaco amplamente utilizado no tratamento da leishmaniose. Apenas o composto (**4h**) não apresentou um bom potencial Drug-Likeness, enquanto os compostos **4f** e **4g** apresentaram o melhor potencial Drug-Likeness entre todos, inclusive o Glucantime® (Figura 29).

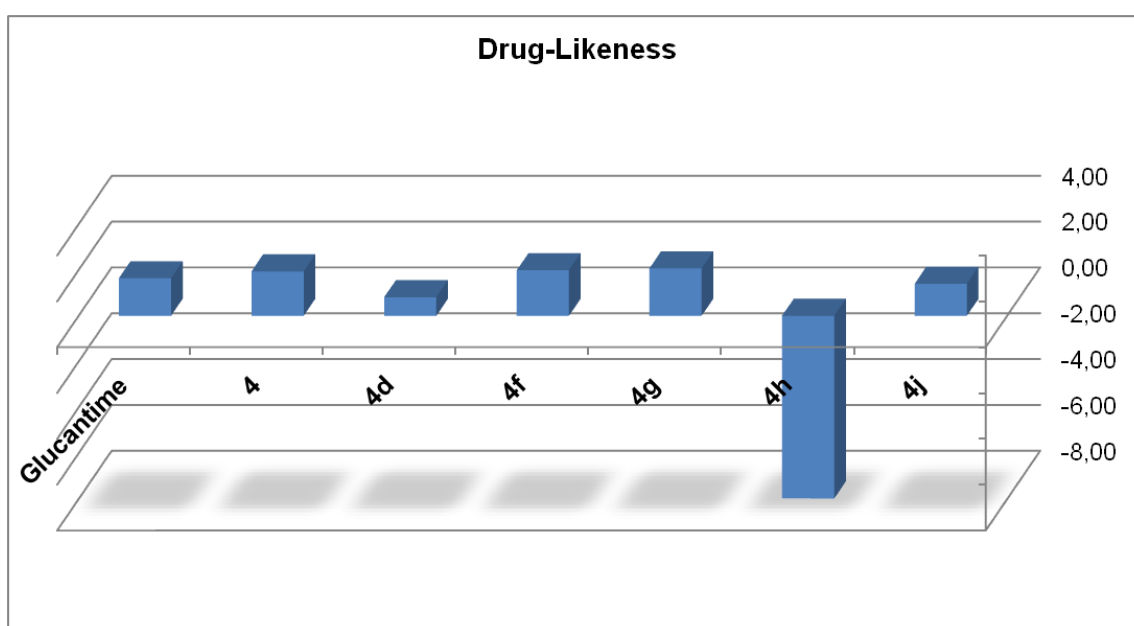


Figura 29. Drug-Likeness dos derivados mais ativos (4, 4d, 4f, 4g, 4h e 4j) comparados com o Glucantime® um fármaco comercial

### 5.8.2 Perfil Drug-Score

O índice Drug-Score é a soma de todas as características do composto (cLogP, solubilidade, toxicidade teórica, Drug-Likeness e peso molecular) calculadas pelo sistema Osiris© que permite avaliar quanto um determinado composto pode vir a ser candidato como um futuro fármaco. Segundo os critérios estabelecidos, quanto mais próximo de 1 (um), maiores são as probabilidades (Figura 30).

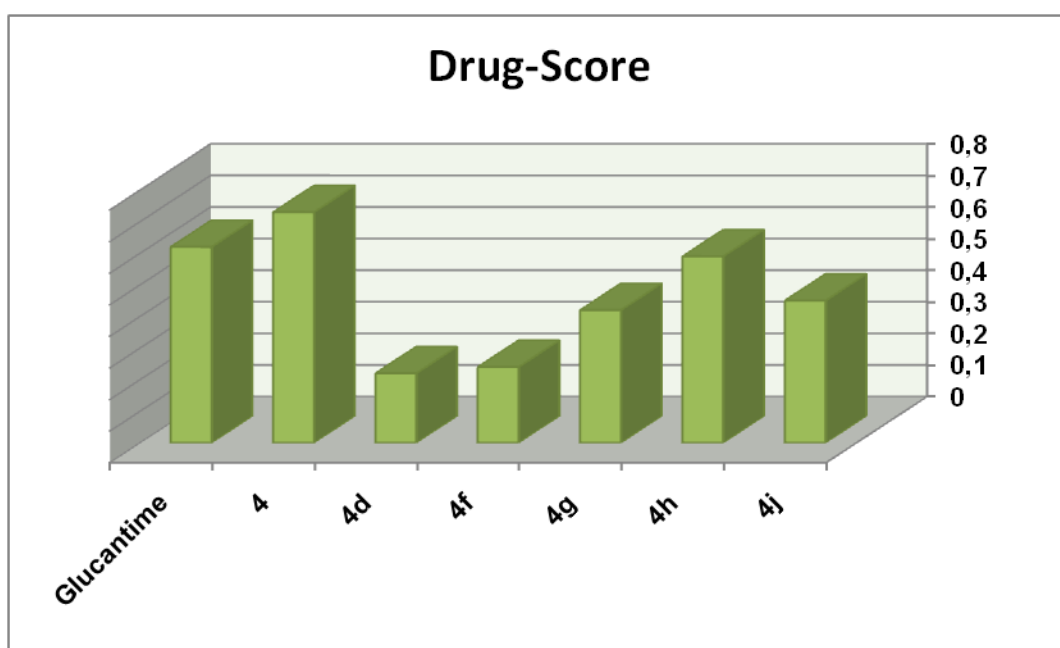


Figura 30. Drug-Score dos derivados mais ativos (4, 4d, 4f, 4g, 4h e 4j) comparado com o Glucantime®, um fármaco disponível comercialmente

Os derivados mais ativos da série tieno-piridinas apresentaram um bom perfil de Drug-Score sendo comparável com o Glucantime® um fármaco disponível comercialmente. Dentre os derivados mais ativos, o composto **4** apresentou melhor perfil de todos, inclusive comparando com o fármaco Glucantime®. Esse resultado pode ser reforçado também pelo bom perfil Drug-Likeness desse derivado.

### 5.8.3 Perfil toxicológico teórico

Também foi realizada a predição dos riscos toxicológicos (tumorigênico, irritativos e risco tóxico na reprodução) desses compostos (Figura 31). Apenas o composto **4g** apresentou algum tipo de risco, sendo esse, tumorigênico, o que pode explicar seu baixo potencial Drug-Score. Os baixos riscos teóricos de tumorigenicidade, efeitos irritativos e efeitos na reprodução dos demais compostos avaliados (**4**, **4d**, **4f**, **4h** e **4j**) indicaram um perfil de baixo risco, similar ao Glucantime®. Comparando com os dados de citotoxicidade *in vivo*, pode-se observar que a avaliação teórica também sugere a segurança desses compostos quanto aos riscos toxicológicos. É importante ressaltar que a toxicidade predita não é totalmente confiável nem garante que esses compostos são completamente isentos de efeitos tóxicos. Contudo, ressalta o perfil promissor desses compostos para estudos experimentais mais aprofundados.

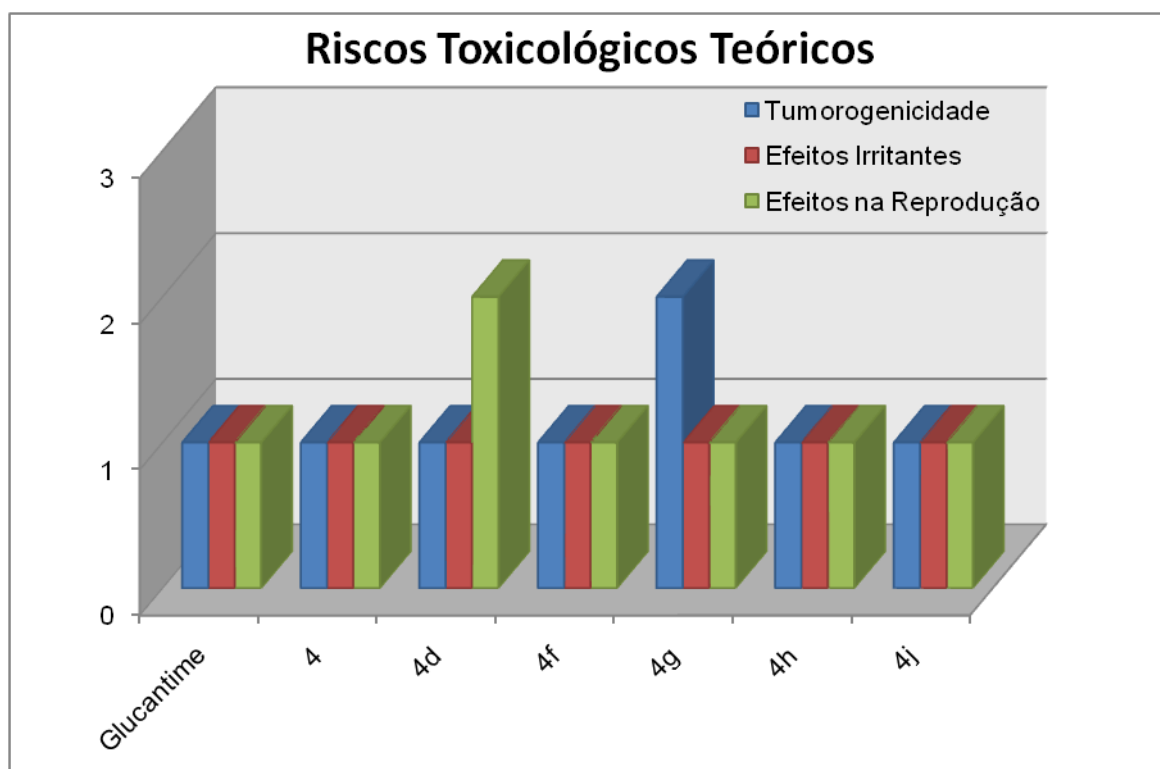


Figura 31. Comparação da toxicologia *in silico* para os derivados **4**, **4d**, **4f**, **4g**, **4h** e **4j** com o Glucantime® obtida através do Osiris® Property Explorer.

#### 5.8.4 Regra-dos-Cinco (Lipinski)

Uma análise mais detalhada dos compostos mais ativos da série tieno-piridinas (**4**, **4d**, **4f**, **4g**, **4h** e **4j**) mostrou que todos os satisfazem a “Regra-dos-Cinco” de Lipinski ( $294,38 > PM < 373,28$ ;  $2,44 < cLogP < 3,40$ ; HBA = 4-5; HBD = 1) e são semelhantes a fármacos comerciais e com boa biodisponibilidade oral teórica (Tabela 4).

**Tabela 4. Resultados da avaliação da Regra-dos-Cinco de Lipinski para os derivados tieno-piridina.**

Regra-dos-Cinco de Lipinski				
Composto	HBA	HBD	cLogP	PM (Da)
<b>4</b>	4,0	1,0	2,57	294,38
<b>4a</b>	4,0	1,0	3,05	308,41
<b>4b</b>	5,0	1,0	2,44	324,41
<b>4c</b>	7,0	1,0	2,60	339,38
<b>4d</b>	4,0	1,0	2,73	312,37
<b>4e</b>	4,0	1,0	3,40	373,28
<b>4f</b>	4,0	1,0	3,05	308,41
<b>4g</b>	5,0	1,0	2,44	324,41
<b>4h</b>	7,0	1,0	2,60	339,38
<b>4i</b>	4,0	1,0	2,73	312,37
<b>4j</b>	4,0	1,0	3,40	373,28

## 6 CONCLUSÕES

Um série de derivados da chalcona (**3**, **3a-3i**) e tieno-piridinas (**4**, **4a-j**) foram sintetizadas e avaliadas quanto ao potencial leishmanicida. A série de derivados da chalcona (**3**, **3a-i**) foi ensaiada contra as formas amastigotas e promastigotas de parasitas da espécie *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*, enquanto a série de derivados tieno-piridinas (**4**, **4a-j**) foi ensaiada contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

A avaliação biológica dos derivados de chalcona (**3**, **3a-i**) revelou que a adição do grupo sulfonamida melhorou a atividade leishmanicida para ambas as espécies de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, sendo entretanto, crucial para a atividade contra *L. amazonensis* em contraste com os resultados da atividade contra *L. braziliensis*.

O estudo de SAR revelou que o melhor perfil de atividade, contra *L. braziliensis*, da série das chalconas ocorreu com a adição de um átomo de carbono como pode ser observado no composto **3i**, comparado ao composto **3e** que não apresenta este átomo como espaçador. Entretanto, para a espécie *L. amazonensis*, esse espaçador parece não ser importante pois o composto mais ativo foi o derivado **3f** cujo substituinte R da sulfonamida está diretamente ligado ao átomo de nitrogênio da anilina. Em termos estereoeletrônicos, uma análise dos derivados chalconas com a presença do grupamento sulfonamida (**3a-i**) revelou que os mapas de densidade de HOMO apresentaram uma densidade mais concentrada na região da ligação  $\alpha$ - $\beta$  ceto insaturada da chalcona dos compostos mais ativos contra espécies de *L. braziliensis*, em especial **3i**. Essa região se mostra importante já que o derivado **3e** (menos ativo) reorienta essa densidade de HOMO para o anel anilina substituído. De maneira diferente, a densidade de HOMO para o derivado mais ativo (**3f**) contra espécies de *L. amazonensis* apresentou-se concentrado no anel anilina substituído, sugerindo um alvo diferente para cada espécie do parasita. Os derivados 4-metóxi-sulfonamidas apontam não apenas como novos candidatos para combater leishmaniose (**3f**) (ativo para ambas as espécies), mas também para permitir novos estudos que tentem entender a especificidade de ação para uma determinada espécie (**3i**).

Para os derivados **4**, **4a-4j** foi possível evidenciar que os substituintes na posição *para* favorecem uma melhor geometria de interação com o sítio receptor, diferente dos derivados

*meta* substituídos que possivelmente direcionam tais substituintes para regiões restritivas (proibitivas) impedindo um perfeito encaixe com o sítio de ligação.

A análise dos parâmetros eletrônicos do mapa de potencial eletrostático dos derivados tieno-piridinas (**4**, **4a-j**), revelou que os compostos mais ativos (**4f** e **4g**) apresentam uma região mais densa eletronicamente sobre o anel fenila substituído, sugerindo uma importância dessa região para interações eletrostáticas com o sítio receptor.

Os dados dos parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos *in silico* mostraram que os compostos mais ativos da série 4-metóxi-chalcona (**3**, **3a-j**) e da série tieno-piridinas (**4**, **4a-j**) foram melhores ou semelhantes a fármacos utilizados atualmente, como Pentamidina e Glucantime®.

O perfil toxicológico teórico das duas séries de derivados foi avaliado e observou-se um baixo perfil toxicológico de acordo com a tumorigenicidade, efeitos irritativos e efeitos no sistema reprodutor, reforçando os dados experimentais de citotoxicidade que apontam estes compostos como candidatos a futuros protótipos com baixa citotoxicidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A. **Leishmaniasis and HIV/AIDS co-infections: review of common features and management experiences.** *Ethiop Med. J.* 40, 37-49. 2002.

BARREIRO, E.J.; RODRIGUES, C.R.; ALBUQUERQUE, M.G.; SANT'ANNA, M.R.; ALENCASTRO, R.B. - **Modelagem Molecular: Uma Ferramenta Para O Planejamento Racional De Fármacos Em Química Medicinal.** *Quím Nova*, 20 (3), 300-10, 1997.

BERMAN, J. D.; GALLALEE, J.V.; BEST, J.M. **Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes.** *Biochem Pharmacol.* 36:197-201. 1987.

BERNARDINO, A. M. R.; PINHEIRO, L. C. S.; RODRIGUES, C. R.; LOUREIRO, N. I.; CASTRO, H. C.; LANFREDI-RANGEL, A.; SABATINI-LOPES, J.; BORGES, J. C.; CARVALHO, J. M.; ROMEIRO, G. A.; FERREIRA, V. F.; FRUGULHETTI, I. C. P. P.; VANNIER-SANTOS, M. A. **Design, synthesis, SAR, and biological evaluation of new 4-(phenylamino)thieno[2,3-b]pyridine derivatives.** *Bioorg. Med. Chem.*, 14: 5765-5770. 2006.

BHATTACHARYA, G.; SALEM, M.M.; WERBOVETZ K.A. **Antileishmanial dinitroaniline sulfonamides with activity against parasite tubulin.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 2395-2398. 2002.

BISWAS, D.; ROY, S.; SEN, S.; **A Simple Approach for Indexing the Oral Druglikeness of a Compound: Discriminating Druglike Compounds from Nondruglike Ones,** *J. Chem. Inf. Model*, 46(3), 1394-1401, 2006

BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; TORRES-SANTOS, V. E. C.; ROSSI-BERGMANN, B. **Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity.** *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 1538. 2006.

BRAJTBURG, J. & BOLARD, J. **Carrier effects on biological activity of amphotericin B.** *Clin Microbiol Rev.* 9: 512-31. 1996.

BRAY, P.G.; BARRETT, M.P.; WARD, S.A.; DE KONING, H.P. **Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future.** *Trends in Parasitology.* 19 (5), 232-239. 2003.



CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M. L.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E.; VIDAL, A.; AZQUETA, A.; MONGE, A.; DE CERÁIN, A. L.; SAGRERA, G.; SEOANE, G.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. **Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships.** *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 3356-3367. 2007.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. **Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?** *Nature Reviews Microbiology*. 5, 873-882. 2007.

CHEN, M.; ZHAI, L.; CHRISTENSEN, S. B.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. **Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones** *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45, 2023-2029. 2001.

COHEN, N.C.; BLANEY, J.M.; HUMBLET, C.; GUND, P.; BARRY, D.C. **Molecular Modeling Software And Methods For Medicinal Chemistry.** *J Med Chem* 33 (3): 883-94, 1990.

CONSONNI, V.; TODESCHINI, R.; PAVAN, M.; **Structure/Response Correlations and Similarity/Diversity Analysis by GETAWAY Descriptors. 1. Theory of the Novel 3D Molecular Descriptors,** *J. Chem Inf. Comput. Sci.*, 42(3), 682-692. 2002.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H.; **Drug Resistance in Leishmaniasis.** *Clin Microbiol Rev.* 19: 111-26. 2006.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. **Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs.** *Trends in Parasitol.*, 19, 502-508. 2003.

DA SILVA, L.E.; JOUSSEF, A.C.; PACHECO, L.K.; DA SILVA, D.G.; STEINDEL, M.; REBELO, R.A. **Synthesis and in vitro evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of N-quinolin-8-yl-arylsulfonamides.** *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 7553-7560. 2007.

DAVIS, A.M.; RILEY, R.J. **Predictive ADMET studies, the challenges and the opportunities.** *Curr. Op. in Chem. Biol.*, 8(4), 378-386. 2004.

DE LIMA BARROS, M.B.; SCHUBACH, A.; FRANCESCONI-DO-VALLE, A.C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; SCHUBACH, T.M.; CONCEICAO-SILVA, F. *et al.* **Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro.** *Acta Trop.* 93:41-47. 2005.

DE MELLO H.; ECHEVARIA, A.; BERNARDINO A.M.R.; CANTO CAVALHEIRO, M.; LEON L.L. **Antileishmanial pyrazolopyridine derivatives: synthesis and structure-activity relationship analysis.** *J Med Chem*; 47: 5427-32, 2004.

DE SOUZA, R.O.M.A.; PEREIRA, V.L.P.; MUZITANO, M.F.; FALCÃO, C.A.B.; ROSSI-BERGMANN, B.; FILHO, E.B.A.; VASCONCELLOS, M.L.A.A. **High selective leishmanicidal activity of 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-bromophenyl)propanenitrile and analogous compounds.** *Eur. J. Med. Chem.* 42: 99-102, 2007.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. **AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model.** *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 3902-3909, 1985.

DREWS, J. **Drug Discovery: A Historical Perspective.** *Science.* 287, 1960-1964. 2000.

DREWS, J. **Strategic trends in the drug industry.** *Drug Discovery Today.* 8 (9), 411-420. 2003.

FORESMAN, J.B.; FRISCH, AE. **Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods: A Guide to Using Gaussian.** Gaussian, Inc, USA, 1993.

FRÉZARD, F.; MARTINS, P. S.; BARBOSA, M.C.M.; PIMENTA, A.M.C.; FERREIRA, W.A.; DE MELO, J.E.; MANGRUM, J.B.; DEMICHELI, C. **New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonite and sodium stibogluconate.** *J. Inorg. Biochem.* 102: 656-665. 2008.

GELDENHUYS, W.J.; GAASCH, K.E.; WATSON, M.; ALLEN, D.D.; VAN DER SCHYF, C. J. **Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery.** *Drug Discovery Today.* 11(3/4), 127-132. 2006.

GO, M. L.; LIU, M.; WILAIRAT, P.; ROSENTHAL, P. J.; SALIBA, K. J.; KIRK, K. **Antiplasmodial chalcones inhibit sorbitol-induced hemolysis of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes** *Antim. Agents Chemother.* 48, 3241-3245. 2004.

GOODMAN & GILMAN'S. **The Pharmacological Basis of Therapeutics.**; BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER K.L.; BUXTON, L.L.; BLUMENTHALS, D.; 11st ed. *McGraw-Hill*: New York, 2007.

GOURBAL, B.; SONUC, N.; BHATTACHARJEE, H.; LEGARE, D.; SUNDAR, S.; OUELLETTE, M.; ROSEN, B.P.; MUKHOPADHYAY, R. **Drug uptake and modulation of drug resistance in Leishmania by an aquaglyceroporin.** *J Biol Chem.* 279: 31010-31017. 2004.

GRANT, G.H.; RICHARDS, W.G. **Computational Chemistry.** *Oxford Science Publications.* 1996.

HEHRE, W.J. **A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations.** *Wavefunction, Inc.*, 2003.

HERWALDT, B.L. **Leishmaniasis.** *Lancet.* 354, 1191-1199. 1999.

HINCHLIFFE, A. **Molecular Modelling for Beginners.** *John Wiley & Sons Ltd*, 2006.

HSIEH, H. K.; LEE, T. H.; WANG, J. P.; WANG, J. J.; LIN, C. N. **Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones and related compounds.** *Pharm. Res.* 15, 39-46. 1998.

ISLAM, M. Z., ITOH, M., MIRZA, R., AHMED, I., EKRAM, A. R. M. S., SARDER, A. H., SHAMSUZZAMAN, S. M., HASHIGUCHI, Y., KIMURA, E. **Direct Agglutination Test With Urine Samples For The Diagnosis Of Visceral Leishmaniasis.** *Am J Trop Med Hyg.* 70:78–82. 2004.

KADAN, R.U., ROY, N. **Recent Trends in Drug Likeness Prediction: A Comprehensive Review of *In Silico* Methods.** *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 69, 5, 609-615, 2007.

LEACH, A. **Molecular Modelling – Principles and Applications.** *Pearson Education Limited*, II ed., 2001.

LEAL, B.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; ABREU, P.A.; GARRET, R.; PINHEIRO, L.C.S.; AZEVEDO, A.R.; BORGES, J.C.; VEGI, F.P., SANTOS, C.C.C.; SILVEIRA, F.C.A.; CABRAL, L.M.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; BERNARDINO, A.M.R.; SANTOS, D.O.; CASTRO, H.C. **Antibacterial profile against drug-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical strain and structure-activity relationship studies of 1-*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine and thieno[2,3-*b*]pyridine derivatives.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 16 (17), 8196-8204, 2008.

LIPINSKI, C.A. LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. **Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings,** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 23(1-3), 3-25. 1997.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings** *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46(1-3), 3- 6. 2001.

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

LÓPEZ-MARTÍN, C.; PÉREZ-VICTORIA, J.M.; CARVALHO, L.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. **Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes.** *Antimicrob Agents Chemother.* 52(11):4030-6. 2008.

LOHRAY, B. B.; LOHRAY V. B.; SRIVASTAVA B. K.; KAPADNIS P. B.; PANDYA P. **Novel Tetrahydro-Thieno Pyridyl Oxazolidinone: An Antibacterial Agent.** *Bioorg. Med. Chem.* 12, 4557-4564. 2004.

LUGO DE YARBUH, A. **Studies of the leishmanin skin test positivity in cases with treatment anti-leishmania.** *Parasitol Di'a*; 21:76–80. 1997.

LUNARDI, F.; GUZELA, M.; RODRIGUES, A. T.; CORREA, R.; EGER-MANGRICH, I.; STEINDEL, M.; GRISARD, E. C.; ASSREUY, J.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. **Trypanocidal and Leishmanicidal Properties of Substitution-Containing Chalcones** *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(4), 1449-1451. 2003.

MAAROUF, M., DE KOUCHKOVSKY, Y.; BROWN, S.; PETIT, P.X.; ROBERT-GERO, M. **In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*.** *Exp. Cell. Res.* 232:339–348. 1997.

MEEK, P.J.; LIU, Z.; TIAN, L.; WANG, C.Y.; WELSH, W.J.; ZAUHAR, R.J. **Shape Signatures: speeding up computer-aided drug discovery.** *Drug Disc. Today*, 11 (19/20), 895-904. 2006.

MITEVA MA, VIOLAS S, MONTES M, GOMEZ D, TUFFERY P, VILLOUTREIX BO. **FAF-Drugs: free ADME/tox filtering of compound collections.** *Nucleic Acids Res.* 34, 738-744. 2006.

MOLONEY, G.P. **Methyl 3-Hydroxythieno[2,3-*b*]pyridine-2-carboxylate.** *Molecules.* 6(3), M203. 2001.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAIVIA, N.G. **Advances in leishmaniasis.** *Lancet.* 366:1561–77. 2005.

NEUBER, H. **Leishmaniasis**. *Journal of the German Society of Dermatology*. 9, 754-765. 2008.

NI, L.; MENG, C. Q.; SIKORSKI, J. **Recent advances in therapeutic chalcones**. *Expert Opin. Ther. Patents*. 14, 1669. 2004.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. **Antibacterial chalcones—bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group**. *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 3047-3054. 2004.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BREARD, J. **Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in Leishmania donovani Promastigotes**. *Antimicrob Agents Chemother*. 48: 852-859. 2004.

PÉREZ-VICTORIA, J. M<sup>a</sup>., PÉREZ-VICTORIA, F. J., CASTANYS, S.; GAMARRO F. **Estrategias terapéuticas y bases moleculares de la resistência a fármacos frente a la leishmaniasis**. *Biojournal*. 5: 1-18. 2006.

PIÑERO, J.; TEMPORAL, R. M.; SILVA-GONÇALVES, A. J.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; OLIVA, A.; PERERA, A.; LEON, L. L.; VALLADARES, B. **New administration model of trans-chalcone biodegradable polymers for the treatment of experimental leishmaniasis**. *Acta Trop*. 98, 59-65. 2006.

PINHEIRO, L. C. S.; AZEVEDO, A. R.; FRUGULHETTI, I. C. P. P.; CARNEIRO, J. L. DE M.; SOUZA, T. M. L.; FERREIRA, V. F.; BERNARDINO, A. M. R. **Synthesis and Antiviral Activity of New 4-(Phenylamino)Thieno[2,3-b]Pyridine Derivatives**, *Heterocycl. Commun*. 10(6), 407-410. 2004.

PISCOPO, T.V.; AZZOPARDI, C.M. **Leishmaniasis**. *Postgrad. Med. J*. 83: 649-657. 2007.

ROCHA, G.B.; FREIRE, R.O.; SIMAS, A.M.; STEWART, J.J.P. **RM1: A Reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I**. *Journal of Computational Chemistry*, 27, 1101-1111. 2006.

RODRIGUES, C.R. **Processos Modernos no Desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular**. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*. 3, 43-49. 2001.

SALEM, M.M.; WERBOVETZ, K.A. **Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis**. *Current medicinal chemistry*. 13(21), 2571-2578. 2006.

SANT'ANNA, C.M.R.; **Glossário de Termos Usados No Planejamento de Fármacos (Recomendações da IUPAC para 1997)**. *Quím. Nova*, 25(3), 505-512. 2002.

SANTOS, D.O.; COUTINHO, C.E.R.; MADEIRA, M.F.; BOTTINO, C.G.; VIEIRA, R.T.; NASCIMENTO, S.B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S.C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R.T.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO H.C. **Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review**. *Parasitology Research*. 103, 1-10. 2008.

SEAMAN, J., MERCER, A. J., SONDRUP, H. E.; HERWALDT, B. L. **Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources**. *Ann. Intern. Med.*; 124, 664–672. 1996.

SHRAIDEH, Z. AND SALLAL, A.-K. **Effect of a thienopyridinone on the growth and physiology of *Escherichia coli***. *Biomed. Lett.* 54, 233-237. 1996.

SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G. M.; PETERS, H. A.; FOEKENS, J. A. **The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC<sub>50</sub>-values and cell survival**. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 33:813-82. 1995.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. **Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis**. *J. Infect. Chemother.* 10, 307-315. 2004.

STEWART, J. J. P. **Optimization of parameters for semi-empirical methods**. *J. Comput. Chem.*, 10, 209-220, 1989.

SUNDAR, S., JHA, T. K.; THAKUR, C.P.; ENGEL, J.; SINDERMAN, H.; FISCHER, C.; JUNGE, K.; BRYCESON, A.; BERMAN, J. **Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis**. *N. Engl. J. Med.* 347:1739–1746. 2002.

SUNDAR, S.; AGRAWAL, S.; PAI, K.; CHANCE, M.; HOMMEL, M. **Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test**. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 269–271. 2005.

TANG, Y.; ZHU, W.; CHEN, K.; JIANG, H. **New technologies in computer-aided drug design: Toward target identification and new chemical entity discovery**. *Drug Disc. Today Techn.* 3(3), 307-313. 2006.

TETKO, I.V.; BRUNEAU, P.; MEWES, H.; ROHRER, D.C.; PODA, G.I. – **Can We Estimate the Accuracy of ADMET Predictions?** *Drug Discovery Today*, 11, 700-707, 2006.

THOMAS, G. **Fundamentals of Medicinal Chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons, 2003.

TORRES-SANTOS, E.C.; SAMPAIO-SANTOS, M.I.; BUCKNER, F.S.; YOKOYAMA, K.; GELB, M.; URBINA, J.A.; ROSSI-BERGMANN, B. **Altered sterol profile induced in *Leishmania amazonensis* by a natural dihydroxymethoxylated chalcone**. *J. Antimicrob. Chemother.* 63: 469–472, 2009.

UCHIUMI, F.; HATANO, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T.; TANUMA, S-I. **Transcriptional suppression of the HIV promoter by natural compounds** *Antivir. Res.* 58, 89-98. 2003.

WALTERS, W.P.; MURCKO, M.A.; **Prediction of ‘drug-likeness’**, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54(3), 255–271. 2002.

WASUNNA, M. K.; RASHID, J.R.; MBUI, J.; KIRIGI, G.; KINOTI, D.; LODENYO, H.; FELTON, J.M.; SABIN, A.J.; ALBERT, M.J.; HORTON, J. **A Phase II Dose-Increasing Study Of Sitamaquine For The Treatment Of Visceral Leishmaniasis In Kenya**. *Am J Trop Med Hyg.* 73, 871-876. 2005.

WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. **Admet *in silico* modelling: Towards prediction paradise?** *Nature Reviews Drug Discovery.* 2, 192-204. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/>, acessado no dia 22 de janeiro de 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, <http://www.who.int/leishmaniasis>, acessado no dia 22 de janeiro de 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. [http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps), acessado no dia 22 de janeiro de 2008.

WU, J-H.; WANG, X-H.; YI, Y-H.; LEE, K-H. **Anti-AIDS agents 54, A potent anti-HIV chalcone and flavonoids from genus *Desmos***. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 1813-1815. 2003.

VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E.; **ADMET in silico modeling: towards prediction paradise?**, *Nature Rev. Durg Discov.* 2(3), 192-204. 2003.

ZHANG, G.; MUSGRAVE, C.B.; **Comparison of DFT Methods for Molecular Orbital Eigenvalue Calculations**, *J. Phys. Chem. A.* 111, 1554-1561. 2007.

ZHAI, L.; BLOM, J.; CHEN, M.; CHRISTENSEN, S.B.; KHARAZMI, A., **The Antileishmanial Agent Licochalcone A Interferes with the Function of Parasite Mitochondria.** *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* 39(12), 2742–2748. 1995.

ZHAI, L.; CHEN, M.; BLOM, J.; THEANDER, T.G.; CHRISTENSEN, S.B.; KHARAZMI, A. **The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 43, 793-803. 1999.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)