

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MARIANA GABRIELA RISOLA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE CANDIDATOS À FÁRMACOS LEISHMANICIDAS:
ESTUDOS COMPUTACIONAIS POR MODELAGEM MOLECULAR E SÍNTESE
QUÍMICA DE NOVOS DERIVADOS DO SAFROL.**

Alfenas/MG

2020

MARIANA GABRIELA RISOLA DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE CANDIDATOS À FÁRMACOS LEISHMANICIDAS:
ESTUDOS COMPUTACIONAIS POR MODELAGEM MOLECULAR E SÍNTESE
QUÍMICA DE NOVOS DERIVADOS DO SAFROL.

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Paranho Veloso

Alfenas/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Silva, Mariana Gabriela Risola da
S586d Desenvolvimento de candidatos à fármacos leishmanicidas: estudos computacionais por modelagem molecular e síntese química de novos derivados do safrol / Mariana Gabriela Risola da Silva – Alfenas, MG, 2020.
150 f.: il. –

Orientadora: Marcia Paranho Veloso.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, 2020.
Bibliografia.

1. Leishmaniose. 2. Modelagem molecular. 3. Éteres oxímicos. 4. Safrol.
I. Veloso, Marcia Paranho. II. Título.

CDD- 615.19

MARIANA GABRIELA RISOLA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE CANDIDATOS À FÁRMACOS LEISHMANICIDAS:
ESTUDOS COMPUTACIONAIS POR MODELAGEM MOLECULAR E SÍNTESE
QUÍMICA DE NOVOS DERIVADOS DO SAFROL.**

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências Farmaceuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Medicinal.

Aprovada em: 30 de Novembro de 2020

Prof.^a Dr.^a Marcia Paranho Veloso
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Documento assinado eletronicamente por **Márcia Paranho Veloso, Professor do Magistério Superior**, em 30/11/2020, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Prof. Dr. Nelson José Freitas da Silveira
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Documento assinado eletronicamente por **Nelson José Freitas da Silveira, Professor do Magistério Superior**, em 30/11/2020, às 12:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Prof.^a Dr.^a Danielle Ferreira Dias
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Documento assinado eletronicamente por **Danielle Ferreira Dias, Professor do Magistério Superior**, em 30/11/2020, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG..

RESUMO

A Leishmaniose, em suas diferentes formas clínicas, consiste em uma doença tropical negligenciada, causada por diversas espécies do protozoário do gênero *Leishmania*. Com alta incidência mundial, atinge principalmente países em desenvolvimento e é considerada um problema de saúde pública em Minas Gerais e em todo o Brasil, por apresentar um alto grau de morbidade e mortalidade além de um escasso arsenal terapêutico. Os parasitos da espécie *Leishmania* possuem enzimas essenciais ao crescimento e à viabilidade celular que podem ser investigados como alvo de novos fármacos. Neste sentido, o seguinte estudo buscou analisar uma série de moléculas que apresentem um perfil de afinidade em alvos moleculares relacionados à Leishmaniose, utilizando ferramentas da Modelagem Molecular, bem como o planejamento e síntese de substâncias inéditas candidatas a fármacos leishmanicidas. Os éteres oxímicos, classe de substâncias estudadas, foram escolhidos com base no fato de derivados oxímicos possuírem diversas atividades biológicas conhecidas (inclusive protozoicida), assim como o material de partida Safrol, que possui ação antifúngica. Por meio dos estudos de Modelagem Molecular, foi possível avaliar os perfis de afinidade entre as substâncias propostas com alvos biológicos selecionados: a CRK3 e rCPB2.8 de *Leishmania* que vem sendo bastante discutidas como essenciais para a viabilidade celular do parasito. As enzimas foram previstas pela técnica de modelagem molecular por homologia utilizando um *template* e múltiplos *templates*, respectivamente, devido à ausência de uma estrutura cristalográfica desta proteína em banco de dados. O estudo permitiu verificar que as moléculas propostas apresentaram um perfil de afinidade pelas enzima de estudo. Três derivados oxímicos (MS-05i, MS-05a e MS-05f) apresentaram alta afinidade pela enzima CRK3, maior que o fármaco Pentamidina utilizado atualmente no tratamento da doença. No caso da enzima rCPB2.8, os ligantes que portavam átomos bastante eletronegativos (MS-05b e MS-05g) apresentaram alta afinidade pelos aminoácidos do sítio catalítico, além das distâncias atômicas entre o ligante e os resíduos do sítio ativo da enzima sugerirem uma possível ligação covalente, que seria essencial para atividade inibitória enzimática. Os resultados dos estudos computacionais corroboraram a síntese química da série de éteres oxímicos derivados do Safrol, contendo como substituintes grupamentos doadores e retiradores de elétrons e de diferentes

eletronegatividade e volume, levando-se em consideração o planejamento de uma rota sintética simples e reprodutível. A série de derivados foi obtida com rendimentos reacionais satisfatórios e suas estruturas foram elucidadas utilizando ferramentas espectroscópicas. A série de moléculas derivadas do Safrol serão avaliadas farmacologicamente em projeto complementar.

Palavras-chave: Leishmaniose. Modelagem molecular. Éteres oxímicos. Safrol.

ABSTRACT

Leishmaniasis, in different clinical forms, consists of a neglected tropical disease, caused by several species of the protozoan of the genus *Leishmania*. With a high worldwide incidence, it affects mainly developing countries and is considered a public health problem in Minas Gerais and throughout Brazil, as it has a high degree of morbidity and mortality in addition to a scarce therapeutic arsenal. There are enzymes essential for cell growth and viability of *Leishmania* that are investigated as targets for new drugs. In this sense, the following study sought to analyze a series of bioactive molecules that have an affinity profile in molecular targets related to Leishmaniasis, using Molecular Modeling and Bioinformatics tools, as well as the planning and synthesis of novel substances that are candidates for leishmanicidal drugs. The oxime ethers, class of substances studied, was chosen based on the fact that oximic derivatives have several known biological activities (including protozoicide), as well as the starting material (safrol), which has antifungal action, to be easily acquired commercially. With the aid of Molecular Modeling studies, it was possible to evaluate the affinity profiles between the proposed substances with selected biological targets, among them CRK3 and rCPB2.8 from *Leishmania*, which have been widely discussed as essential for the parasite's cell viability. The enzymes were predicted by the homology modeling technique using one model and multiple models, respectively, due to the absence of a crystallographic structure of this protein in the database. In order to obtain these new chemical substances, the planning of a simple and reproducible synthetic route was considered. A series of oxime ethers derived from safrol was obtained, bearing different substituents at the para-disubstituted ring moiety were investigated, varying the substituents with electron donating groups as well as electron withdrawing groups of different electronegativity. The new substances were structurally elucidated using spectroscopic tools. The study allowed to verify that the proposed molecules had an affinity profile for the study enzyme. Three oxy-chemical derivatives (MS-05i, MS-05a and MS-05f) showed high affinity for the CRK3 enzyme, higher than the drug Pentamidine used currently to treat the disease. In the case of the rCPB2.8 enzyme, the ligands that carried very electronegative atoms (MS-05b and MS-05g) showed high affinity between the catalytic site amino acids, in addition to the atomic distances between the ligand and residues of the enzyme active site possible covalent bond, which

would be essential for enzyme inhibitory activity.

Key-words: Leishmaniasis. Molecular Modeling. Safrol. Oxymic ethers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico do número de casos novos de Leishmaniose Visceral por estado no Brasil no ano de 2016.....	16
Figura 2 - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	21
Figura 3 - Estrutura dos fármacos utilizados atualmente no tratamento da Leishmaniose.....	22
Figura 4 - Relação estrutura x atividade da Pentamidina.....	24
Figura 5 - Fórmula estrutural do Safrol.....	26
Figura 6 - Estrutura química das oximas e seus nomes correspondentes.....	27
Figura 7 - Reação de cetonas ou aldeídos com hidroxilamina para formação de oximas.....	28
Figura 8 - Estruturas químicas de fármacos contendo o grupo oxima (pralidoxima) e éter de oxima (fluvoxamina).....	28
Figura 9 - Estrutura da série de derivados oxímicos com atividade leishmanicida...29	
Figura 10 - Representação resumida das fases da modelagem molecular por homologia para gerar no fim uma proteína homóloga em formato 3D...33	
Figura 11 - Série de éteres oxímicos planejados a partir do Safrol.....	37
Figura 12 - Estrutura molecular do inibidor da enzima cisteíno protease de <i>T. cruzi</i> (PDB 3I06).....	38
Figura 13 - Inibidores conhecidos de proteínas cinase dependente de ciclina.....	39
Figura 14 - Estruturas químicas de inibidores conhecidos da enzima CRK3 e suas porções que se ligam a aminoácidos nas regiões do hinge e bolsão hidrofóbico.....	40
Figura 15 - Rota sintética para obtenção da série de novos derivados oxímicos (MS-05a-h) a partir do Safrol (MS-01).....	47
Figura 16 - Esquema sintético da obtenção do produto MS-01 por meio da reação de isomerização do Safrol.....	48

Figura 17 - Esquema sintético da obtenção do produto MS-02 por meio da reação de Vilsmeier-Haack a partir do isosafrol (MS-01).....	49
Figura 18 - Esquema sintético da obtenção do produto MS-03 por meio de C- alquilação de MS-02.....	51
Figura 19 - Esquema sintético da obtenção do derivado oxímico (MS-04) a partir do intermediário indanônico (MS-03).....	52
Figura 20 - Esquema sintético da obtenção dos éteres de oxima (MS-05a-h) a par- tir da oxima (MS-04).....	54
Figura 21 – Gráfico de Ramachandran obtido por Modelagem por Homologia conforme descrito por PEREIRA et al. 2013.....	62
Figura 22 - Gráfico de Ramachandran gerado por PEREIRA et al. em 2013.....	63
Figura 23 - Sobreposição das estruturas 2R3I (verde) e sua proteína homóloga gerada (azul).....	64
Figura 24 - Alinhamento global de múltiplas sequências entre a sequência alvo e os modelos de código PDB 3IUT e 3I06 realizados pelo programa Clus- tal Omega.....	66
Figura 25 - Gráfico de Ramachandran da enzima rCPB2.8 gerado pelo programa PROCHECK.....	67
Figura 26 - Perfil 3D da sequência de aminoácidos do modelo da enzima rCPB2.8 obtida pelo Verify3D.....	68
Figura 27 - Gráfico de Z-score e de energia gerados pelo software ProSA-web do modelo da enzima rCPB2.8 obtido por modelagem homologia.....	69
Figura 28 – Sobreposição da proteína gerada por homologia (verde) e a proteína 3I06 (azul).....	70
Figura 29 - Ligante da proteína 3IUT (QL2) em cinza sobreposta ao da proteína modelada do redocking (rCPB2.8) com o ligante em verde.....	73
Figura 30 - Ligante da proteína 2R3I (SCF) em cinza sobreposta ao da proteína modelada do redocking (CRK3) com o ligante em verde.....	74
Figura 31 - Estrutura tridimensional representando as distâncias de interações possíveis de se tornar covalente entre o enxofre da CYS28 e os possíveis átomos mais próximos do ligante MS-05d de melhor valor de <i>GlideScore</i> e suas interações em 2D.....	78

Figura 32 - Estrutura tridimensional representando as distâncias de interações possíveis de se tornar covalente entre o enxofre da CYS28 e possíveis átomos mais próximos do ligante Pentamidina de melhor valor de <i>GlideScore</i> e suas interações em 2D.....	79
Figura 33 – Estrutura tridimensional representando as distâncias de interações possíveis de se tornar covalente entre o enxofre da CYS28 e possíveis átomos mais próximos do ligante MS-05f de melhor valor de <i>GlideScore</i> e suas interações em 2D.....	80
Figura 34 – Estrutura tridimensional representando as distâncias de interações possíveis de se tornar covalente entre o enxofre da CYS28 e possíveis átomos mais próximos do ligante MS-05c de melhor valor de <i>GlideScore</i> e suas interações em 2D.....	81
Figura 35 – Estrutura tridimensional representando as distâncias das menores interações possíveis de se tornar covalente entre o enxofre da CYS28 e possíveis átomos mais próximos do inibidor QL2 de melhor valor de <i>GlideScore</i> (<i>redocking</i>) e suas interações em 2D.....	82
Figura 36 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes do fármaco Pentamidina com os alvos CDC2 humana.....	86
Figura 37 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes do fármaco Pentamidina com os alvos CRK3.....	87
Figura 38 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes do inibidor SCF com o alvo CDC2 humana.....	88
Figura 39 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes do inibidor SCF com o alvo CRK3.....	89
Figura 40 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes da molécula MS-05i com o alvo CRK3.....	90
Figura 41 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes da molécula MS-05f com o alvo CRK3.....	91
Figura 42 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes da molécula MS-05a com o alvo CRK3.....	92
Figura 43 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes da molécula MS-05i com o alvo CDC2 humana.....	94

Figura 44 - Proposta do mecanismo de reação da isomerização do safrol.....	97
Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H da substância MS-01 (CDCl_3 , 300 MHz).....	98
Figura 46 - Mecanismo da reação de Vilsmeier Haack seguida de ciclização do Isosafrol (MS-01).....	100
Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H da substância MS-02 (CDCl_3 , 300 MHz).....	102
Figura 48 - Mecanismo reação da formação do intermediário (MS-03) por meio de um C-alkilação do intermediário indanônico (MS-02).....	103
Figura 49 - Espectro de RMN de ^1H da substância MS-03 (CDCl_3 , 300 MHz).....	105
Figura 50 - Proposta mecanicistica para a obtenção de um derivado oxímico (MS-04) a partir de uma cetona (MS-03).....	107
Figura 51 - Espectro de RMN de ^1H da substância MS-04 (CDCl_3 , 300 MHz).....	108
Figura 52 - Espectro de IV da substância MS-04.....	109
Figura 53 - Proposta mecanicística para a obtenção da série de éteres (MS-05a-h) a partir da oxima (MS-04).....	110
Figura 54 - Espectro de RMN ^1H da substância MS-05a (CDCl_3 , 300 MHz).....	111
Figura 55 - Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da substância MS-05a (CDCl_3 , 75 MHz).....	112
Figura 56 - Espectro de RMN ^1H da substância MS-05c (CDCl_3 , 300 MHz).....	113
Figura 57 - Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da substância MS-05c (CDCl_3 , 75 MHz).....	114
Figura 58 - Reação de formação do álcool proposto como impureza a partir da hidroxila da água com o reagente correspondente haleto de benzila...	115
Figura 59 - Proposta de fragmentação da molécula de álcool sugerida.....	115
Figura 60 - Espectro de Massas da substância MS-05c.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas das moléculas estudadas.....	71
Tabela 2 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (<i>GlideScore</i>), entre as moléculas da série proposta e a enzima CPB2.8, o número de interações de hidrogênio e π stacking com os resíduos que participam destas interações e boas interações de van der Waals.....	75
Tabela 3 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (<i>GlideScore</i>), entre as moléculas da série proposta e a enzima CRK3, o número de interações de hidrogênio e π stacking com os resíduos que participam destas interações e boas interações de van der Waals.....	84
Tabela 4 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (<i>GlideScore</i>), entre as moléculas da série proposta e a enzima CDC2 humana, o número de interações de hidrogênio e π stacking com os resíduos que participam destas interações e boas interações de van der Waals.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
ASN	Asparagina
ASP	Ácido aspártico
ATP	Trifosfato de adenosina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CC	Cromatografia em coluna de sílica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDC	Cinase dependente de ciclina
CDC2	Cinase dependente de ciclina tipo 2
Cl ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular
CYS	Cisteína
CP	Cisteíno protease
CPA	Cisteino protease tipo A
CPB	Cisteino protease tipo B
CPC	Cisteino protease tipo C
CRK	Cinase dependente de ciclina 3
d	Dupleto
Da	Daltons
dd	Duplo dupleto
DEPT135	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
F.M.	Fórmula molecular
Fase M	Fase mitótica
G2	Gap 2 (intervalo celular 2)
GLI	Glicina
GLN	Glutamina
GLU	Ácido glutâmico
HIE	Histidina
Hz	Hertz
ILE	Isoleucina

IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
LDA	Diisopropilamida de Lítio
LEU	Leucina
LC	Leishmaniose cutânea
LQFar	Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
LYS	Lisina
M	Molar
m	Multiplete
m/z	Razão massa/carga
m/m	Razão massa/massa
MHz	MegaHertz
M.M.	Massa molar
nm	Nanômetro
MolMod-CS	Laboratório de Modelagem Molecular e Simulação Computacional
OMS	Organização Mundial da Saúde
ppm	Partes por milhão
PDB	Protein Data Bank
P.A	Padrão Analítico
PHE	Fenilalanina
QL2	Inibidor cristalografado da enzima cpb
rCPB2.8	Cisteína protease 2.8 recombinante
Rf	Fator de retenção em placa cromatográfica
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Raiz do desvio quadrático médio das posições atômicas
s	Simpleto
SCF	Inibidor cristalografado da enzima crk3
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TFA	Ácido Trifluoracético

THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina
THR	Treonina
TS	Tripanotona sintetase
UFSC	Universidade da Califórnia – São Francisco
UNIFAL – MG	Universidade Federal de Alfenas
UV	Ultravioleta
vdW	Van der Waals
v/v	Volume por volume
δ	Deslocamento químico (ppm)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	LEISHMANIOSE.....	19
2.2	ALVOS MOLECULARES.....	24
2.2.1	CRK3.....	24
2.2.2	CPB2.8.....	25
2.3	SAFROL.....	26
2.4	OXIMAS.....	27
2.5	PLANEJAMENTO RACIONAL.....	29
2.6	MODELAGEM COMPUTACIONAL.....	30
2.6.1	Modelagem molecular por homologia e validação.....	32
2.6.2	Docking Molecular.....	35
3	OBJETIVOS.....	36
4	PLANEJAMENTO ESTRUTURAL.....	37
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
5.1	ESTUDOS COMPUTACIONAIS POR MODELAGEM MOLECULAR.....	42
5.1.1	Preparo dos Ligantes e Perfil de Biodisponibilidade.....	42
5.1.2	Modelagem Molecular por Homologia e Validação.....	43
5.1.2.1	CRK3.....	43
5.1.2.2	rCPB2.8.....	43
5.1.3	Preparo das Proteínas.....	44
5.1.4	Docking Molecular e Validação.....	44
5.2	SÍNTESE.....	45
5.2.1	Metodologia sintética.....	46
5.2.1.1	Síntese do intermediário 5-(1 propenil)-2H-1,3-benzodioxol (MS-01).....	47
5.2.1.1.1	<i>Dados de caracterização do intermediário 5-(1-propenil)-2H-1,3-benzodioxol (MS-01).....</i>	<i>48</i>
5.2.1.2	Síntese do intermediário 6-metil-6,7-dihidro-2H,5H-indeno[5,6d][1,3]dioxol-5-ona (MS-02) (BARREIRO E LIMA, 1992).....	49
5.2.1.2.1	<i>Dados de caracterização do intermediário 6-metil-6,7-dihidro-2H,5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona (MS-02).....</i>	<i>50</i>

5.2.1.3	Síntese do intermediário 6,6-dimetil-6,7-dihidro-2H,5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona (MS-03) (RANU & JANA, 1999).....	50
5.2.1.3.1	<i>Dados de caracterização do intermediário 6,6-dimetil-6,7-dihidro-2H,5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona (MS-03).....</i>	<i>51</i>
5.2.1.4	Síntese do intermediário N-[(5)-6,6-dimetil-6,7-dihidro-2H,5H-indeno- [5,6-d][1,3]dioxol-5-ilideno]hidroxilamina (MS-04) (GOPALSAMY, 2006).....	52
5.2.1.4.1	<i>Dados de caracterização do intermediário N-[(5)-6,6-dimetil-6,7dihidro-2H,5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ilideno]hidroxilamina (MS-04).....</i>	<i>53</i>
5.2.1.5	Procedimento geral da síntese dos derivados éteres oxímicos (MS-05) (LI, et al. 2002).....	53
5.2.1.5.1	<i>Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-metoxibenzil) oxima (MS-05a).....</i>	<i>55</i>
5.2.1.5.2	<i>Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-(terc-butil)benzil) oxima (MS-05b).....</i>	<i>55</i>
5.2.1.5.3	<i>Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-bromobenzil) oxima (MS-05c).....</i>	<i>56</i>
5.2.1.5.4	<i>Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-fluorbenzil) oxima (MS-05d).....</i>	<i>57</i>
5.2.1.5.5	<i>Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-metilbenzil) oxima (MS-05e).....</i>	<i>57</i>
5.2.1.5.6	<i>Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-(trifluormetil)benzil) oxima (MS-05f).....</i>	<i>58</i>
5.2.1.5.7	<i>Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-clorobenzil) oxima (MS-05g).....</i>	<i>59</i>
5.2.1.5.8	<i>Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-nitrobenzil) oxima (MS-05h).....</i>	<i>59</i>
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
6.1	ESTUDOS COMPUTACIONAIS POR MODELAGEM MOLECULAR.....	61
6.1.1	CRK3.....	61
6.1.2	CPB2.8.....	64
6.1.3	Análise dos ligantes.....	70
6.1.4	Docking Molecular.....	72

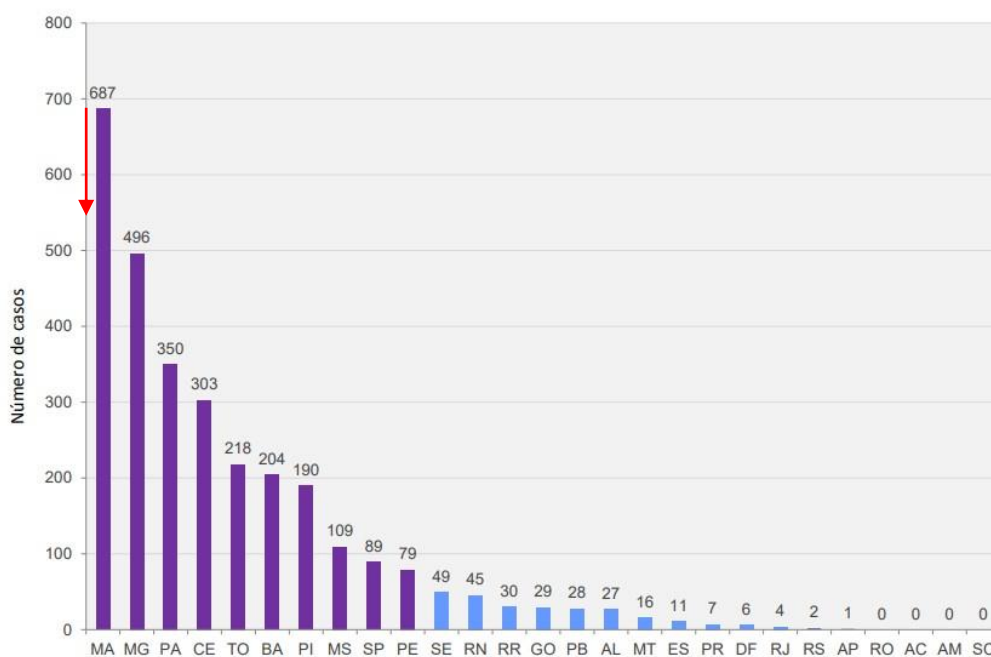
6.1.4.1	Validação do docking molecular.....	72
6.1.4.2	rCPB2.8.....	74
6.1.4.3	CRK3 e CDC2 humana.....	83
6.2	ETAPA SINTÉTICA.....	95
6.2.1	Reação de Isomerização do Safrol (MS-01).....	95
6.2.2	Reação de Vilsmeier-Haack (MS-02).....	99
6.2.3	Reação de C-alkilação do centro assimétrico (MS-03).....	103
6.2.4	Reação de obtenção do derivado oxímico (MS-04).....	105
6.2.5	Reação de obtenção dos éteres oxímicos (MS-05).....	109
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	117
	REFERÊNCIAS.....	119
	ANEXOS.....	130

1 INTRODUÇÃO

Leishmaniose é uma doença que afeta mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, com outros 350 milhões em risco de infecção pelo parasita do gênero e quase 2 milhões de novos casos relatados anualmente (WHO, 2016). Trata-se de uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por meio de picada pela fêmea do inseto do gênero *Lutzomyia* e *Plebotomus*, podendo se apresentar de três formas principais, visceral, cutânea e mucocutânea (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Considerada uma doença negligenciada, ela afeta populações mais pobres e associadas diretamente à desnutrição, moradia precária, sistema imunológico debilitado e falta de recursos financeiros (WHO, 2018).

Em 2018 a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) apresentou uma pesquisa a respeito dos cenários da Leishmaniose Visceral no Brasil, no qual relatou o número de novos casos por estado no país. Nele, foi relatado que o estado de Minas Gerais é o segundo estado em que os casos da doença mais aumentaram em 2016, conforme demonstra a Figura 1 (SVS/MS, 2018).

Figura 1 - Gráfico do número de casos novos de Leishmaniose Visceral por estado no Brasil no ano de 2016.



Fonte: SVS/MS (2018).

Além disso, durante os anos de 2000 e 2011, apenas 4% dos fármacos aprovados, dentre eles 1% novos, referiam-se ao tratamento de doenças negligenciadas, muito devido à diminuição do financiamento pela indústria e diversos outros órgãos no desenvolvimento de tais produtos (PEDRIQUE *et al.*, 2013).

A doença ainda conta com um tratamento problemático, com um arsenal terapêutico disponível limitado e pouco acessível, se tratando de medicamentos caros e bastante tóxicos (WHO, 2010). Dados como esse tornam o presente estudo totalmente necessário na busca de novos agentes leishmanicidas.

Alguns novos potenciais alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos antiparasitários estão sendo descritos na literatura (DAS *et al.*, 2013) como a tripanotiona redutase (TR), a enzima oligopeptidase B (OPB) e inibidores de DNA topoisomerases por exemplo. Neste sentido, a identificação de diferenças-chave entre o metabolismo do hospedeiro e do parasita é de grande importância para o desenvolvimento de novos compostos com a atividade farmacológica desejada (MICHELETTI; BEATRIZ, 2012).

Estudos têm demonstrado que a enzima rCPB2.8 é essencial para a virulência e sobrevivência do parasito da espécie *Leishmania* e o entendimento do mecanismo de sua inibição e entidades químicas que interagem com sítio ativo da enzima faz dela um alvo potencial a ser explorado (AZIZI *et al.*, 2009), não diferente, inibidores da atividade da CRK3 se mostram possíveis alvos para o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas, entre os inibidores da proteína quinase se destacam os inibidores ATP-competidores (PEREIRA; MENDES; LIMA, 2013; WYATT *et al.*, 2011). No caso da CRK3 os inibidores ATP-competitivos tem uma importante função na descoberta de novas moléculas uma vez que está relacionado diretamente ao sítio ativo enzimático dessa proteína na *Leishmania*, nela as reações enzimáticas da proteína são catalisadas pela transferência do grupo fosfato do ATP para um grupo hidroxila da cadeia lateral de aminoácidos na proteína (PEREIRA *et al.*, 2003; COELHO *et al.*, 2017).

Foi pensando em um composto inicial para fins de interação molecular que veio a ideia do uso do Safrol (*4-alil-1,2-metilenodioxibenzeno*), alilbenzeno natural considerado como produto de partida para a nova série proposta de éteres oxímicos, o qual possui distribuição ampla no reino vegetal, portando um importante éter fenólico encontrado em óleos essenciais extraídos de plantas

como o Sassafrás (*Ocotea sp.*), da Canela-de-sassafrás (*Ocotea pretiosa Mez*) e da Pimenta longa (*Piper hispidinervum*) (COSTA, 2009). Pouco estudado para este fim, a ideia de produzir novos compostos a partir dele pareceu promissora.

A escolha de produtos naturais como alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos evidencia uma boa proposta de estudo já de início, pelo fato de possuírem numerosos benefícios e atividades biológicas quando isoladas (NEWMAN; CRAGG, 2016). Ligado a essa ideia, sabe-se que as oximas (fórmula geral: $RR'C=NOH$) e seus derivados (tais como éteres e ésteres de oxima) também possuem ações protozoicidas (DIKUSAR *et al.*, 2008).

A síntese desses compostos oriundos do Safrol, atrelada aos estudos de Modelagem Molecular, que consiste em um conjunto de técnicas para investigação das estruturas e das propriedades moleculares por Química Computacional, são propostas fundamentais no planejamento de compostos bioativos (BARREIRO *et al.*, 1997), além de poder traçar um paralelo extremamente importante e direto com o produto de síntese e os alvos selecionados para estudo (CRK3 e rCPB2.8).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

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

2.1 LEISHMANIOSE

A doença causada por diversas espécies de protozoários da ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (ANVERSA *et al.*, 2018) corresponde a uma antroponose ou doença tropical que pode se manifestar de diferentes modos, sendo as formas clínicas cutânea, mucocutânea e visceral as mais comuns, podendo ser a última forma potencialmente fatal (WHO, 2010).

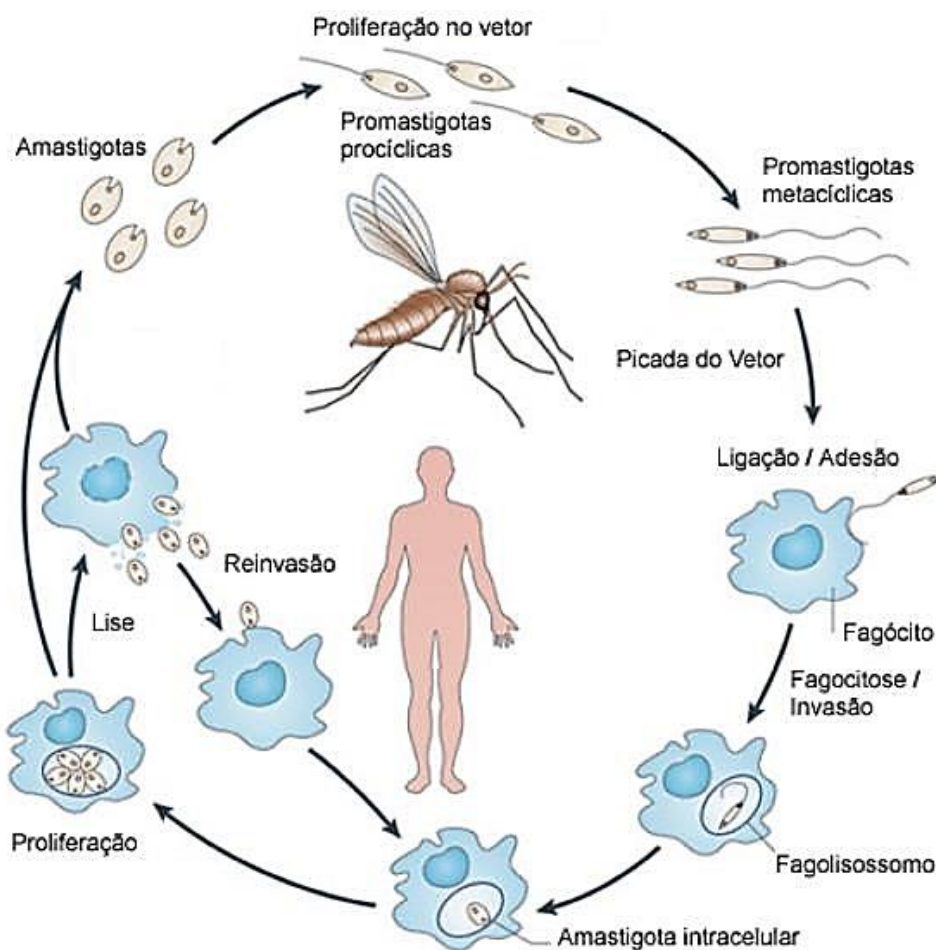
A Leishmaniose Tegumentar Americana (**LTA**) do tipo cutânea é a forma mais comum da doença, caracterizada, principalmente, pela aparição de úlceras crônicas pela pele, que se localizam com maior frequência nas áreas expostas do corpo (WHO, 2017). A forma mucocutânea da LTA caracteriza-se pela aparição de úlceras crônicas nas mucosas de nariz, boca e garganta. Já a Leishmaniose visceral (**LV**) ou Calazar se manifesta por sintomas como anemia, perda de peso, aumento de baço e fígado, além de episódios irregulares de febre; é a forma mais grave da doença e fatal se não for tratada em 95% dos casos (WHO, 2017).

A identificação de parasitas de *Leishmania* como agentes etiológicos e flebotomíneos como vetores de transmissão da leishmaniose teve início no começo do século XX e a descoberta de novas espécies de *Leishmania* e flebotomíneos continuou até o século XXI (STEVEDING, 2017). Aproximadamente 21 das 30 espécies que infectam mamíferos são as causadoras da leishmaniose no homem. Dentre elas podem ser citadas as espécies contidas

nos complexos mexicana (*L. mexicana*, *L. amazonenses* e *L. venezuelensis*), donovani (*L. donovani* e *L. chagasi*), tropica (*L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*) e braziliensis (*L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis*) (CDC, 2013). A diferenciação das espécies só é possível de ser realizada utilizando-se métodos moleculares, análise de isoenzimas ou anticorpos monoclonais, já que são morfologicamente muito parecidas (CDC, 2018).

O gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitas heteroxênicos, que possuem seu ciclo completo por meio de dois ou mais hospedeiros, sendo o ciclo da doença destacado pelas fases do parasita tanto dentro do vetor transmissor quanto dentro do hospedeiro (FIGURA 2), apresentando sua forma de vida evolutiva denominada em promastigota, que é a forma flagelada e extracelular, encontrada vivendo no vetor, e amastigota, responsável por infectar as células mamíferas, sendo ela intracelular e sem movimentos (GONTIJO; CARVALHO, 2003). O parasita em sua forma promastigota transfere-se para a corrente sanguínea do hospedeiro, onde será fagocitado por célula saudável, passando para sua forma amastigota. Após sofrer divisão binária, ocorre a lise celular, liberando na corrente sanguínea sua forma amastigota, infectando outras células, momento em que o paciente começa a exibir os sintomas da doença. A fêmea do fobotomíneo por sua vez, ingere o sangue contaminado com os parasitas e, dentro do mosquito, são transformados de amastigotas para promastigotas, infectando futuramente novos hospedeiros, completando o ciclo (NASCIMENTO-JÚNIOR; BLANCO, 2017).

Figura 2 - Ciclo de vida da Leishmania.

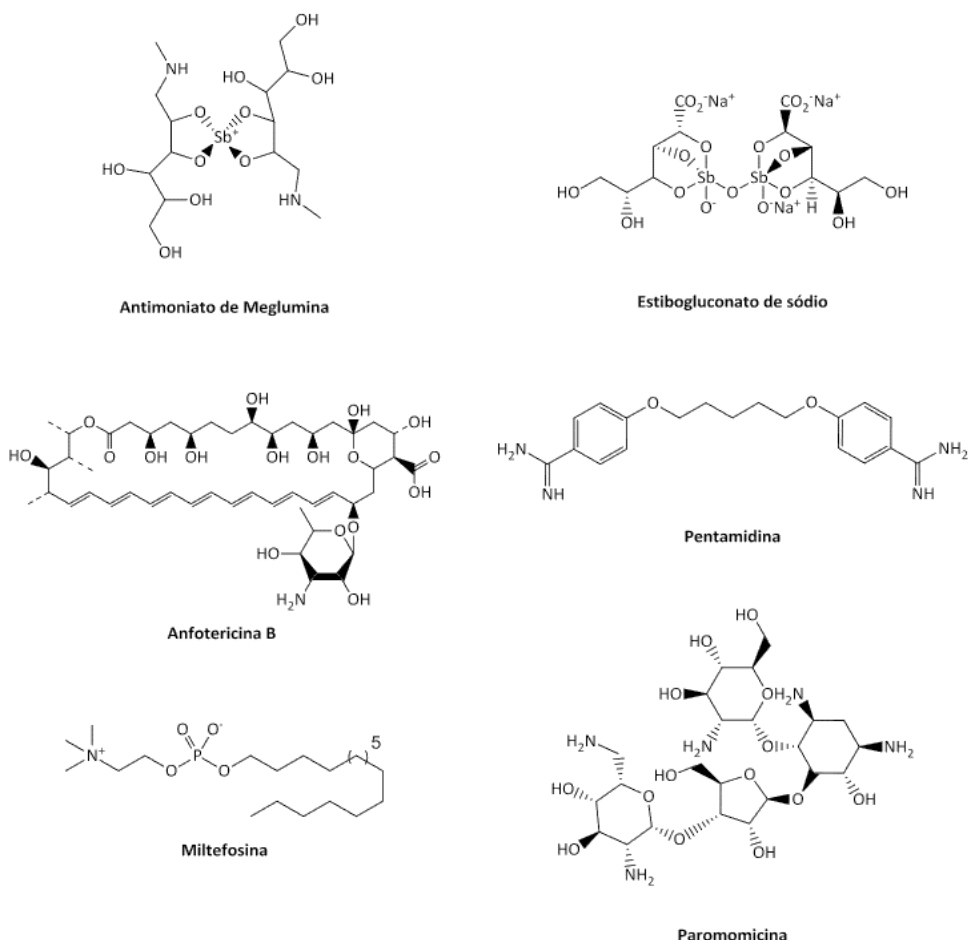


Fonte: Adaptado de KAYE & SCOTT (2011).

O ciclo celular da *Leishmania* tem relação íntima com os alvos moleculares em questão, enquanto as quinases dependentes de ciclina (CRK) possuem uma variação durante o ciclo celular em ambas as formas, tanto promastigotas quanto amastigotas, com atividade pouco maior na primeira; as cisteíno-proteases (CPB) são abundantes principalmente na forma amastigota do parasito (SILVA-LÓPEZ, 2010).

Embora haja formas de prevenção da doença com base no controle do mosquito, estas não são efetivas e a quimioterapia se torna o método mais eficaz para tratamento da doença (BASTOS *et al.*, 2016). Entre os fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose estão os Antimoniais Pentavalentes (Antimoniato de Meglumina e Estiboglucanato de Sódio), Anfotericina B, Pentamidina, Paromomicina e Miltefosina (FIGURA 3).

Figura 3 - Estrutura dos fármacos utilizados atualmente no tratamento da Leishmaniose.



Fonte: NASCIMENTO-JÚNIOR e BLANCO (2017).

Dentre os fármacos de primeira escolha e mais utilizados, estão os Antimoniais Pentavalente (1 e 2) com alta taxa de eficácia (cerca de 90% de cura) e os de segunda escolha a Anfotericina B (3), Pentamidina (4), Miltefosina (5) e Paromicina (6) (BASTOS *et al.*, 2016). No entanto, essa taxa de eficácia vem atrelada diretamente à alta toxicidade e outros danos causados pelo uso desses medicamentos (NASCIMENTO-JÚNIOR; BLANCO, 2017).

Hipóteses vêm sendo descritas quanto a relação estrutura x atividade e mecanismo de ação dos fármacos citados acima; com relação aos antimoniais pentavalentes acredita-se que possa ocorrer por mecanismos de oxirredução do Sb(V) gerando Sb(III), tóxicos ao parasito ou até mesmo a formação de complexos entre o Sb(V) com alguns de seus nucleotídeos inibindo-o, ou com glicoconjugados diminuindo a virulência do parasito (CHAI *et al.*, 2005;

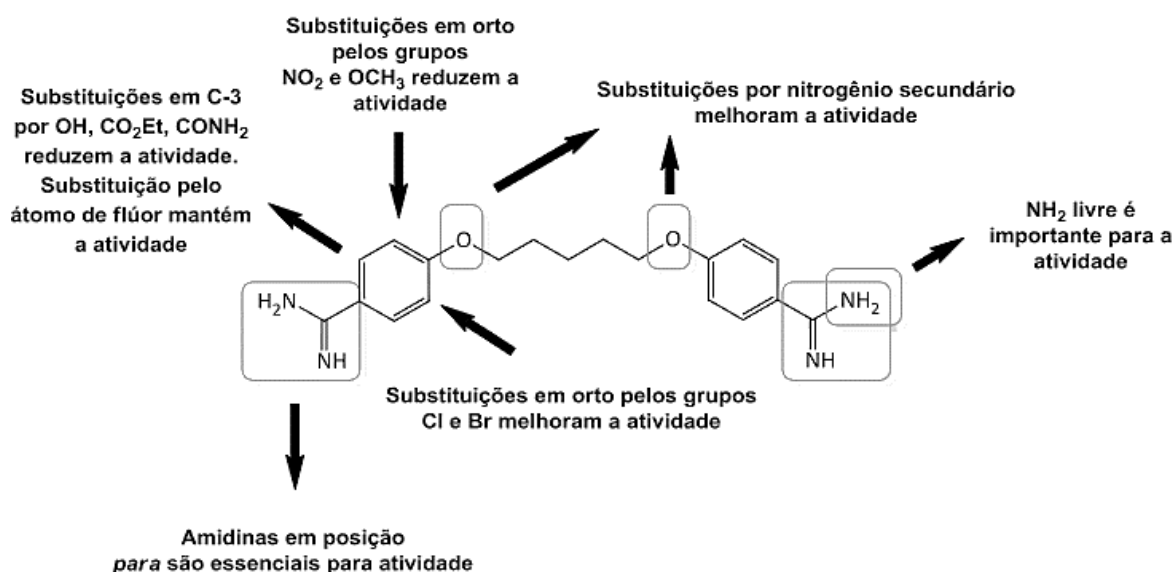
DEMICHELI *et al.*, 2002).

Já a Anfotericina B, inicialmente desenvolvida como antifúngico, que possui a peculiaridade de obter duas subunidades distintas sendo uma hidrofílica e outra hidrofóbica, acredita-se que atuam no ergosterol na membrana celular de células patogênicas, comuns aos parasitas do gênero *Leishmania*, o qual promove formação de poros na membrana gerando um extravasamento do conteúdo intracelular até a morte celular da mesma (CARREIRA; CEREGHETI, 2006; BOROWSK *et al.*, 1988). Alterações químicas na cadeia do polieno causam perda de atividade além da ocorrência de um nitrogênio ionizável que também tem papel importante na eficácia da molécula (ROGERS *et al.*, 1997).

A Pentamidina, por sua vez, atua sobre o genoma do parasito e interfere em processos fisiológicos e bioquímicos dificultando a replicação e transcrição mitocondrial (MISHRA *et al.*, 2007). Escolhida para ser o fármaco de comparação com os estudos realizados tem na sua estrutura dois grupos *para*-amidinos que, quando modificados, podem gerar redução na atividade antileishmania (BASTOS *et al.*, 2016). Foi objeto de escolha também por se tratar de um fármaco que age no DNA do parasito, intimamente relacionado com o alvo CRK3, que possui relação íntima com seu ciclo celular (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004) e, quando da comparação em testes de citotoxicidade dos compostos sintetizados poder ser reprodutível, já que os antimoniais se caracterizam como pró-fármacos e os demais, como a Miltefosina, por exemplo, são bastante lipossolúveis dificultando tais experimentos. Por apresentar em sua estrutura um éter com substituições na posição *para* ao anel aromático, a Pentamidina se assemelha às substituições dos éteres oxímicos estudados, além de ter participado de estudo de triagem prévio na modelagem, que demonstrou maior afinidade pelos alvos moleculares estudados quando da comparação entre Anfotericina B, Paromomicina e Simataquina.

Estudos sobre a relação estrutura x atividade da Pentamidina foram descritos a partir de comparações com análogos gerados e estão ilustrados na Figura 4 a seguir (BASTOS *et al.*, 2016):

Figura 4 - Relação estrutura x atividade da Pentamidina.



Fonte: BASTOS *et al.* (2016).

2.2 ALVOS MOLECULARES (CRK3 e CPB)

As enzimas são alvos biológicos extremamente importantes para o planejamento de novos fármacos, em razão do seu papel essencial em vias bioquímicas associadas a doenças e disfunções em humanos. Outros atrativos são a sua fácil obtenção, adequação para ensaios biológicos e versatilidade na aplicação de técnicas de planejamento de fármacos baseado na estrutura dos ligantes e de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (GUIDO, ANDRICOPULO & OLIVA, 2010; SANT'ANNA, 2009).

2.2.1 CRK3

As quinases dependentes de ciclina (CDC) possuem um papel importante no ciclo celular de eucariontes pois estão presentes no mecanismo de divisão celular, transcrição, diferenciação e apoptose. Toda proteína do tipo quinase possui um sítio catalítico com uma fenda onde se dá a ligação da molécula de ATP, importante para a viabilidade celular e manutenção do ciclo de vida do parasito. Quando ocorre uma inibição alostérica (outra molécula se liga nesse sítio) a conformação espacial destas enzimas pode ser alterada bloqueando os sítios de ligação da molécula de ATP (SILVA *et al.*, 2009).

Há além dos inibidores alostéricos, que competem pelos sítios de ligação do ATP os inibidores não-competitivos de quinase, que se ligam à sítios de substratos proteicos, o que diferenciará será o local e tipo de ligação entre a proteína e a molécula ligante (SILVA *et al.*, 2009).

A CRK3, uma proteína serina/treonina quinase dependente de ciclina da família das CDC isolada em *Leishmania*, é essencial para a transição pela fase G2 (fase na qual a célula se prepara para a mitose) a M (mitótica), regulando o ciclo celular do parasito; sua inibição leva a morte celular por apoptose (DUNCAN *et al.*, 2016).

Recentemente, Duncan (2016), demonstrou a importância da CRK3 em promastigotas de *Leishmania*, quando da deleção da proteína resultou em uma parada de crescimento nas fases G2 e M do ciclo celular. Confirmando-se assim a CRK3 como um alvo terapêutico útil e como uma ferramenta valiosa para a análise de genes essenciais em *Leishmania* no estudo de novos fármacos (DUNCAN *et al.*, 2016).

2.2.2 CPB2.8

As cisteíno-proteases foram as primeiras e principais proteases relatadas na atividade de promastigotas dos parasitos da *Leishmania* (PUPKINS; COOMBS, 1984). Sua classificação se dá devido a característica do seu sítio catalítico, que se refere aos três principais tipos de peptidases: as serino-proteases, cisteíno-proteases e aspártico-proteases que possuem, respectivamente, resíduo de aminoácido serina, cisteína e ácido aspártico no sítio ativo, envolvidos diretamente na catálise enzimática. Existem ainda as metaloproteases que utilizam um íon metálico para atividade catalítica (SILVA-LÓPES, 2010).

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

mais relatos de atividades como fatores de virulência em espécies de *Leishmania*, consideradas importantes fatores de alteração na sinalização de macrófagos.

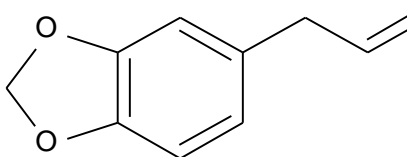
De todas as CPs distintas destes parasitos, três delas foram bem estudadas, sendo duas do tipo catepsina L (CPA e CPB) e uma do tipo catepsina B (CPC). Sabe-se que a atividade mais elevada de CPs de *L. amazonensis* ocorre em amastigotas mais do que em promastigotas, e que existe uma correlação entre os níveis de expressão de CPs e infecciosidade dos parasitos, realçando assim o potencial que estas proteinases têm para influenciar o resultado da infecção (SILVA-LÓPEZ, 2010).

2.3 SAFROL

Estudos em 1999 já relatavam compostos sintetizados a partir do Safrol com atividades analgésica, antiinflamatória e antitrombótica. Outras também já descritas na literatura foram antiofídica, anti-inflamatórias, anticancerígena e antiparasitária (COSTA, 2009; BARREIRO; FRAGA, 1999).

Neste sentido ele tem sido utilizado na preparação de diversos grupos de produtos naturais biologicamente ativos, bem como substâncias sintéticas originárias de programas de desenvolvimento planejado de fármacos (COSTA, 2009).

Figura 5 - Fórmula estrutural do Safrol.



Fonte: da autora.

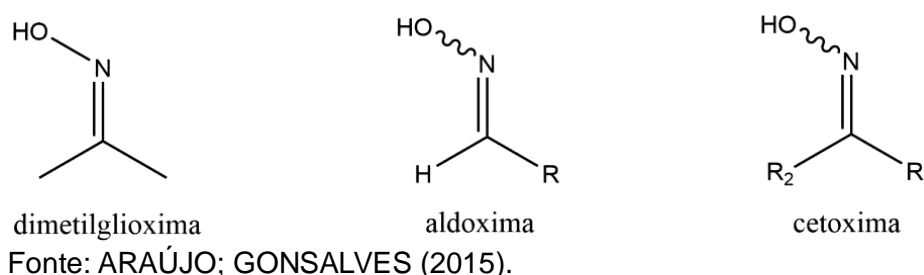
Resultados de estudos recentes a partir de produtos naturais têm mostrado que óleos essenciais ricos em Safrol, possui ação contra as formas promastigotas da espécie *Leishmania amazonenses* (ALCOBA, 2017; MONZOTE, 2010). No entanto não há estudos o suficiente a respeito do Safrol como substância de interesse para desenvolvimento de protótipos leishmanicidas, se fazendo

necessário a atual pesquisa.

2.4 OXIMAS

As oximas correspondem a uma classe de substâncias de fórmula molecular geral $RR'C=NOH$, que pode existir na forma dos isômeros E/Z. São chamadas de aldoximas quando R ou R' é um hidrogênio, e de cetoximas quando ambos substituintes são grupos alquila. Além disso, quando os dois grupos R são metilas, recebe o nome de dimetilglioxima (FIGURA 6) (ARAÚJO; GONSALVES, 2015).

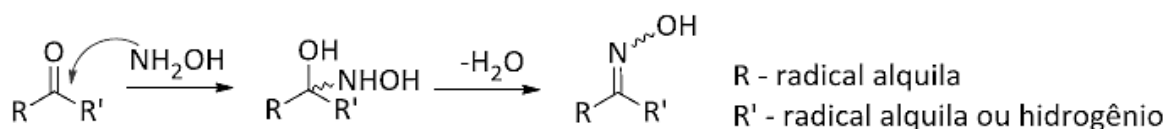
Figura 6 - Estrutura química das oximas e seus nomes correspondentes.



O termo “oxima”, surgiu como uma junção de “oxigênio” e “imina” (ARAÚJO; GONSALVES, 2015). Plantas, mamíferos, organismos marinhos e diversos tipos de microorganismos são alguns exemplos nos quais se encontram substâncias com o grupamento oxima em sua forma (ASHANI; SILMAN, 2010). Um exemplo de sua ação ocorre nas plantas, onde atuam na defesa e/ou comunicação, sendo produtos finais ou intermediários da síntese de alguns metabólitos (SØRENSEN; NEILSON; MØLLER, 2018).

A síntese dessa classe de substâncias se dá a partir de aldeídos, cetonas, olefinas, aminas, nitro compostos, nitritos e substâncias contendo hidrogênios α -carbonila, sendo a reação de adição de hidroxilamina (NH_2OH) aos dois primeiros grupos funcionais aqui citados as mais comuns. Além de poderem ser precursoras para grupos nitrogenados como amidas, nitrilas, aminas, dentre outros (ARAÚJO; GONSALVES, 2015).

Figura 7 – Representação de cetonas ou aldeídos com hidroxilamina para formação de oximas.

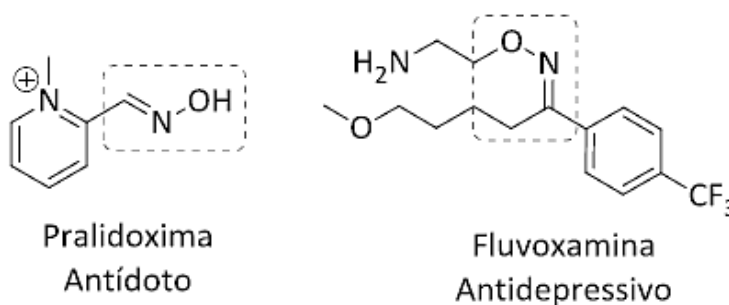


Fonte: SOLOMONS; FRYHLE (2009).

As oximas e seus derivados (por exemplo, éteres e ésteres de oxima) apresentam inúmeras atividades biológicas, tais como inseticida, fungicida, pesticida, herbicida, vasorrelaxante, antiespasmódica, sedativa, antidepressiva, tranquilizante, anticonvulsivante, analgésica, anti-inflamatória, citotóxica, anticancerígena, antiviral, bactericida e protozoicida (MIKHALEVA; ZAITSEV; TROFIMOV, 2006). Ligado a isso, estão intimamente relacionadas no desenvolvimento de novos candidatos à fármacos e na pesquisa de novas compostos ativos frente a doenças.

A pralidoxima (usada no tratamento de intoxicação por organofosforados) e a fluvoxamina (antidepressivo) são exemplos de medicamentos usados atualmente com esse grupo funcional (FIGURA 8). Este último é um bom exemplo de como os isômeros E/Z de oximas possuem atividade biológica diferente, já que somente o isômero E, neste caso, possui ação farmacológica (ARAÚJO; GONSALVES, 2015).

Figura 8 - Estruturas químicas de fármacos contendo o grupo oxima (pralidoxima) e éter de oxima (fluvoxamina).

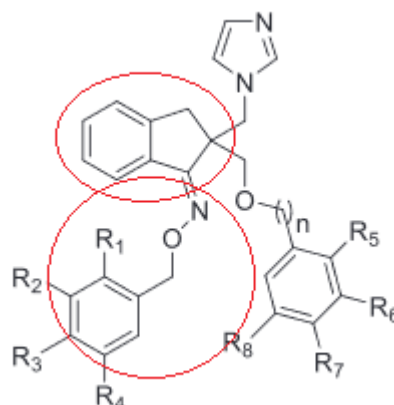


Fonte: ARAÚJO; GONSALVES (2015).

Surwase (2019) recentemente publicou um estudo em que obteve derivados oxímicos como potente agente leishmanicida com padrões estruturais

semelhantes aos éteres oxímicos estudados (FIGURA 9).

Figura 9 - Estrutura da série de derivados oxímicos com atividade leishmanicida.



Fonte: SURWASE (2019).

Levando em conta os diferentes tipos de atividade biológica que as oximas e derivados oxímicos podem apresentar, inclusive protozoicida, essas substâncias se apresentam como uma boa escolha para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, dentre eles os leishmanicidas.

2.5 PLANEJAMENTO RACIONAL

O planejamento racional de fármacos consiste em estratégias modernas de planejamento que se fundamentam no conhecimento da fisiopatologia das doenças, no estudo de vias bioquímicas e na seleção de alvos moleculares. O conhecimento das estruturas de alvos macromoleculares ou de complexos do tipo ligante-receptor permite a aplicação de estratégias de planejamento de fármacos, explorando propriedades e características de séries de ligantes bioativos (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Reconhecendo os avanços alcançados nas diversas áreas do conhecimento, a procura de novos fármacos vem crescendo e sendo estimulada pela Química Medicinal, que se dedica a estudar as razões moleculares da ação dos fármacos, a relação entre estrutura química e atividade farmacológica, incluindo o planejamento racional e o desenho estrutural de novas substâncias

que possuam propriedades farmacologicamente úteis (BARREIRO; FRAGA, 2001).

No âmbito da Modelagem Molecular duas estratégias podem ser utilizadas. A primeira consiste na análise das propriedades tridimensionais do receptor. A segunda é baseada na análise comparativa das propriedades estruturais de moléculas conhecidas (SANT'ANNA, 2009). Já com relação às estratégias de modificação molecular estão o bioisosterismo, hibridização e simplificação molecular, que correspondem às distintas transformações na alteração de grupos funcionais por outros com propriedades físico-químicas semelhantes; associação de dois padrões moleculares com atividades biológicas distintas e redução da estrutura química sem interferir na atividade, respectivamente; todas a fim de facilitar e melhorar os perfis farmacocinético e farmacodinâmicos de novas estruturas a serem elucidadas (BARREIRO, 2002; BARREIRO; FRAGA, 2008)

A interação entre essas duas áreas, a síntese, trazendo a caracterização estrutural dos compostos, o cumprimento de diferentes etapas até a modelagem molecular, compreendendo as interações entre substâncias e receptores, os estudos *in silico*, tornam-se pilares para um planejamento coeso e um estudo das relações entre estrutura química e atividade biológica, gerando resultados mais eficazes e produtivos (BARREIRO; FRAGA, 2001).

2.6 MODELAGEM COMPUTACIONAL

O planejamento racional baseado na estrutura e em seu mecanismo de ação tem se tratado de um campo promissor nos dias de hoje, se tratando de uma estratégia eficiente no desenvolvimento de novos fármacos. Pensando nisso, os estudos de modelagem computacional apresentam ferramentas capazes de simular com bastante eficácia a interação entre um composto de baixo peso molecular e uma macromolécula (MARSHALL, 2005). Baseadas nas interações intermoleculares (dipolo-dipolo, íon-íon, ligações de hidrogênio e forças de dispersão) entre a proteína e os ligantes de interesse, é possível obter um resultado da relação quantitativa da estrutura e sua atividade enzimática (SANT'ANNA, 2009).

O primeiro passo é a obtenção de uma estrutura proteica tridimensional representativa do alvo de interesse, de forma que se ela não estiver resolvida em

um banco de dados, ocorra a possibilidade da geração de um modelo equivalente por meio da Modelagem Molecular por Homologia, respeitando as regiões semelhantes entre seus resíduos de aminoácidos e conservando suas conformações internas. A estrutura tridimensional dos alvos moleculares pode ser obtida por cristalografia de raio X, ressonância magnética nuclear, e são depositadas em bancos de dados, como por exemplo o PDB (*Protein Data Banking*).

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

Uma vez obtido seu modelo do alvo de interesse, ela está hábil a ser utilizada para a realização de estudos *in silico*. As proteínas de interesse utilizadas para a realização dos estudos de modelagem foram selecionadas buscando-se encontrar alvos moleculares que interajam de forma satisfatória com a série de moléculas propostas neste estudo, buscando assim obter uma relação da estrutura x atividade destes para a otimização e desenvolvimento de protótipos a inibidores mais efetivos e que sejam seletivos à enzima de *Leishmania* em relação às enzimas análogas presentes em humano, por meio de estudo de resíduos presentes apenas na enzima do parasito.

Os ligantes desenhados com base nas moléculas de interesse também devem ser avaliados partindo-se dos seguintes critérios: peso molecular inferior a 500; lipofilicidade das substâncias, expressa como log P (coeficiente de partição água/octanol), inferior a 5; número de grupos na molécula que podem doar átomos de hidrogênio para interações de hidrogênio inferior a 5 e número de grupos que podem aceitar átomos de hidrogênio para formar interações de hidrogênio inferior a 10 (LIPINSKI, 2004).

O *docking* molecular realizado posteriormente, envolve métodos que abordam uma função de energia contendo parâmetros eletrostáticos, ligações de hidrogênio e *van der Waals*, além de hidrofóbicos muitas das vezes. O resultado da análise é a geração de modelos matemáticos que predizem as melhores orientações do ligante com o alvo, por meio de uma série de *scores* de energia. Para a eleição dos melhores resultados obtidos na simulação de ancoramento molecular para cada proteína foi utilizado o parâmetro *GlideScore* como forma de quantificar a grandeza da interação ligante/receptor. O *GlideScore* é uma função de pontuação empírica que se aproxima da energia livre de ligação do ligante. O uso do *GlideScore* é recomendado para classificar poses de diferentes ligantes, possibilitando comparar a afinidade de cada ligante com a enzima (FRIESNER *et al.*, 2004; SCHRÖDINGER, 2019).

2.6.1 Modelagem Molecular por Homologia e validação

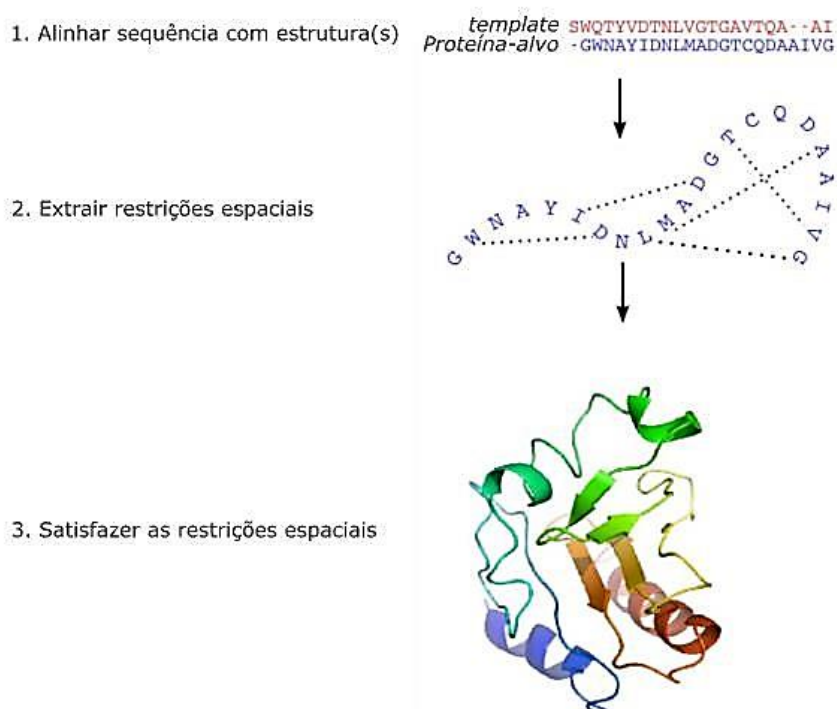
As proteínas correspondem a um dos principais tipos de substâncias analisadas quando do estudo da interação entre moléculas ligantes com um alvo. Composta a partir de uma estrutura primária, que corresponde a sequência de aminoácidos que a constitui, essa proteína pode muitas vezes não ter a sua estrutura secundária resolvida em banco de dados para estudos mais complexos. Daí a necessidade de técnicas como a modelagem por homologia, que determina a partir de uma comparação com outras proteínas provenientes na maioria das vezes de um ancestral comum e, que envolve o alinhamento dessas sequências, fornecendo um modelo 3D útil para uma proteína-alvo que está relacionada a pelo menos uma estrutura de proteína conhecida (OLIVEIRA, 2018).

A modelagem molecular por homologia consiste em etapas sequenciais que correspondem a procura de proteínas com estruturas 3D conhecidas e relacionadas ao alvo, a escolha das mesmas, seu alinhamento com a sequência de interesse e por fim a construção de um novo modelo por meio desse alinhamento (FISER; SALI, 2003).

Existem atualmente quantidade variável de *softwares*, dentre eles programas e servidores online, que executam esse processo como por exemplo o *SWISS-PROT* e *ModWeb*. O *Modeller* escolhido para o estudo, consiste num programa de modelagem estrutural comparativa por satisfação de restrições

especiais que realiza alinhamento global, permitindo o alinhamento de mais de um *template* com a sequência alvo com o objetivo de aumentar a precisão do modelo (SALI; BLUNDELL, 1993). O produto de saída do programa é uma proteína 3D para a sequência-alvo contendo todos os átomos da cadeia principal e cadeia lateral, exceto átomos de hidrogênio. As restrições espaciais de distância e ângulos diedros na sequência-alvo são calculadas por meio do seu alinhamento com os *templates*, por meio de análises estatísticas das relações de funções de densidade de probabilidade condicional entre muitos pares de estruturas homólogas (SALI; OVERINGTON, 1994).

Figura 10 - Representação resumida das fases da modelagem molecular por homologia para gerar no fim uma proteína homóloga em formato 3D.



Fonte: Adaptado de FISER; SALI (2003).

Uma vez construído o modelo da sequência alvo, vem a necessidade de avaliar sua qualidade por meio de verificações de possíveis erros. Ele pode ser avaliado como um todo bem como em regiões individuais, com base na similaridade entre as sequências do *template* e do alvo, observando resíduos importantes em regiões da proteína como o sítio ativo e sua conservação

(OLIVEIRA, 2018).

A qualidade do *template* escolhido por meio da modelagem por homologia depende de diferentes fatores correspondentes à sua organização estrutural, dentre eles estão sua qualidade estereoquímica, empacotamento e confiabilidade do enovelamento (FISER; SALI, 2003).

Sabendo disso a fim de avaliar essas propriedades a estrutura foi analisada quanto a qualidade estereoquímica dos modelos construídos, a análise de parâmetros como comprimento e ângulos entre as ligações, além de avaliação de torções e quiralidade dos aminoácidos. Valores preestabelecidos ideais fazem parte de estruturas 3D das proteínas, sendo necessário observar com relação aos valores obtidos a equivalência entre o *template* e o modelo homólogo obtido, comparando-o em ambos (HOLTJE *et al.*, 2003).

A começar pelo *PROCHECK*, esse *software* avalia os diversos parâmetros estereoquímicos da estrutura, como a determinação dos ângulos torcionais da cadeia principal (Φ e Ψ) e laterais (*Chi*), maus contatos ou impedimentos estéricos, planaridade das ligações peptídicas, energias das ligações de hidrogênio, geometria tetraédrica das ligações de carbono, dentre outros fatores (LASKOWSKI *et al.*, 1996). Dentre as avaliações do *PROCHECK* está o “Fator G” que faz uma média relativa dos parâmetros examinados entre as estruturas com relação à qualidade estereoquímica, representando quão incomum são tais propriedades (LASKOWSKI; MACARTHUR; MOSS, 1993).

Outro parâmetro de validação corresponde a qualidade dos ambientes químicos de cada resíduo de aminoácido, e o *software* utilizado para esse fim corresponde ao *Verify3D*, o qual atribui *scores* com referência a uma análise envolvendo estruturas de proteínas conhecidas presentes no banco de dados PDB, avaliando assim a compatibilidade do modelo atômico tridimensional (EISENBERG; LUTHY; BOWIE, 1997). No *ProsaWeb*, as pontuações de qualidade de uma proteína são exibidas comparando-se todas as estruturas proteicas conhecidas com o atual analisado, e partes problemáticas encontradas em uma estrutura são destacadas em gráficos (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

2.6.2 Docking Molecular

Estudos computacionais por meio de *docking* molecular buscam identificar

a posição energeticamente favorável no alvo molecular posicionando pequenas moléculas em diferentes orientações e conformações de acordo com as interações intermoleculares, fornecendo uma resposta que prediz afinidade da molécula pelo alvo (*score*). Na descoberta de medicamentos modernos, o encaixe entre proteína-ligante desempenha um papel importante na previsão da orientação do ligante quando conectado a um receptor, sendo ele uma proteína ou enzima, usando formas de interações eletrostáticas para quantificá-las. A soma de todas as interações é aproximada por uma pontuação de encaixe que representa a potencialidade de ligação (KROEMER, 2007). Com o passar do tempo os procedimentos de encaixe foram melhorados permitindo a flexibilidade tanto do receptor quanto do ligante (*docking* flexível-flexível) (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017).

O preparo das proteínas aqui é um item importante para a realização das etapas seguintes à da modelagem por homologia, a fim de garantir correções estruturais da estrutura, como por exemplo correção dos átomos de hidrogênio, cadeias laterais incompletas e *loops*, estados de protonação ambíguos e resíduos invertidos (SASTRY *et al.*, 2013). Uma das etapas de preparo é a submissão da proteína à um campo de força. Campos de força correspondem à energia total da molécula quando descrita em termos de contribuições advindas das distorções dos ângulos e distância entre os átomos e suas torções, se tratando de uma interação sem ligação química, ou seja, contribuições de estiramento, deformação, torção das ligações, buscando melhorar a qualidade do resultado quando do preparo das moléculas estudadas. A forma funcional de cada campo de força é um conjunto de termos que descrevem movimentos específicos da molécula (HINCHLIFFE, 2003).

A validação dos protocolos de *docking* molecular foi realizada por meio do estudo de reancoramento (*Redocking*) tentando reproduzir o modo de ligação original presente na estrutura cristalográfica escolhida, utilizando a proteína alvo já preparada e o composto inibidor que se encontra cocrystalizado junto à proteína, que também foi preparado e minimizado.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo estudar uma série de novos éteres oxímicos sintetizados a partir do safrol, por meio de estratégias da Química Medicinal tais como Síntese Química e Modelagem Molecular, visando a obtenção de novos protótipos de fármacos leishmanicidas.

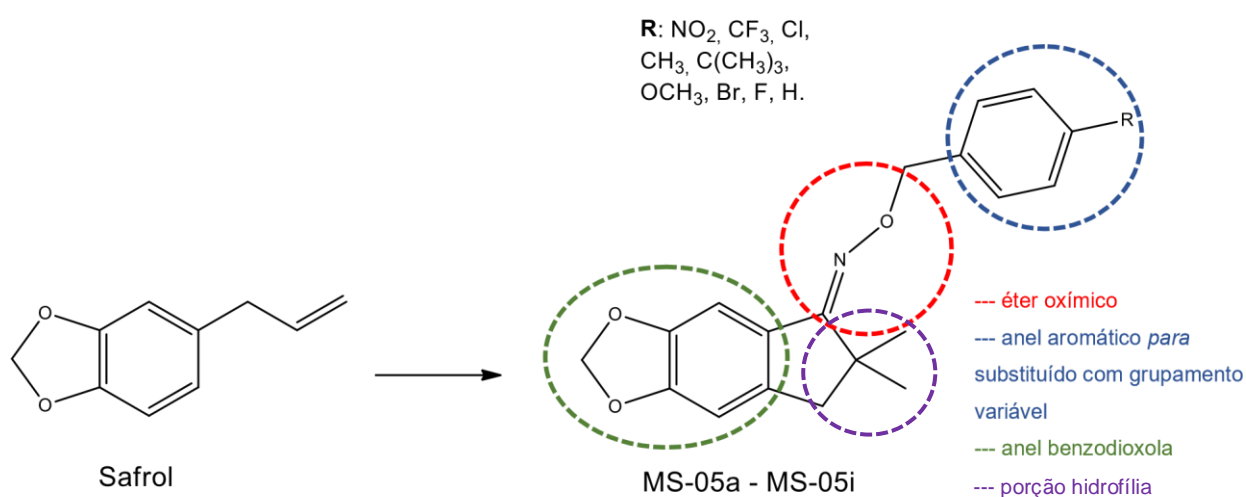
Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Realizar o estudo de Modelagem Molecular por Homologia a fim de obter a estrutura tridimensional da proteína CPB2.8 de *Leishmania mexicana*. Estudar, por meio de técnicas como a de *Docking Molecular*, a avaliação dos perfis de afinidade e parâmetros físico-químicos da série de derivados do safrol, com alvos biológicos selecionados as enzimas da *Leishmania*: CPB2.8 e CRK3;
- b) Sintetizar, por meio de estratégias da Síntese Orgânica, os derivados da série de éteres oxímicos a partir do safrol;
- c) Estabelecer uma relação entre estrutura química e possível atividade leishmanicida com base nos resultados dos estudos computacionais das interações das moléculas sintetizadas.

4 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Os éteres oxímicos foram selecionados como possíveis candidatos a protótipos de fármacos leishmanicidas após uma pesquisa bibliográfica do modo de ação e características estruturais de alvos enzimáticos essenciais para a sobrevivência do parasito do gênero *Leishmania* no hospedeiro humano a fim de se planejar racionalmente as moléculas de interesse com melhor afinidade entre eles.

Figura 11 - Série de éteres oxímicos planejados a partir do Safrol.



Fonte: da autora.

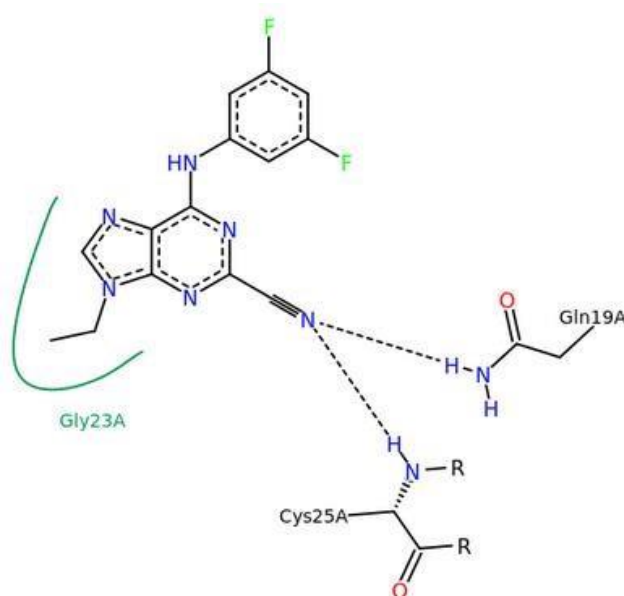
A escolha dos alvos enzimáticos baseou-se em alguns fatores, como a sua importância para a viabilidade do parasito; a ausência de estruturas semelhantes em humanos, e a semelhança de grupos funcionais de fármacos conhecidos que interajam com as classes de enzimas selecionadas.

Sendo então a CPB2.8 uma das enzimas utilizadas no trabalho, houve um estudo sobre as possíveis interações entre ela e a série de moléculas propostas. Com base na literatura foi possível observar a sua alta afinidade por substratos de caráter básico, característica encontrada nos compostos da série pela presença do nitrogênio do éter oxímico. Como exemplo, é possível observar a estrutura do inibidor cristalizado junto com a cisteína protease do *Trypanosoma cruzi*, ilustrado na Figura 12, utilizada como molde nos estudos de modelagem computacional e que compartilha do mesmo sítio ativo que a CPB2.8 da *Leishmania*. Na estrutura,

os principais aminoácidos do sítio ativo (CYS25 e GLN19) interagem diretamente com uma nitrila (MOTT *et al.*, 2010). Sendo assim, a presença de grupos funcionais semelhantes entre os compostos da série e um inibidor conhecido da cisteína protease da cruzaina de *T. cruzi*, que possui 60% de identidade com a enzima CPB2.8, pode ser um indicativo de uma possível interação desejada.

A relação estrutura x atividade estabelecida por MOTT (2010) quando estudou a estrutura do inibidor da CPB e análogos, associou a presença de átomos eletronegativos ligados ao anel aromático à uma melhor atividade, além disso percebeu que uma porção hidrofílica, como o grupo etil ligado ao nitrogênio era bem tolerado. A nitrila teve papel importante na interação de hidrogênio, o que traça um paralelo para a semelhança com o éter oxímico estudado, além da afinidade por porções básicas, que é o caso do nitrogênio oxímico e a possibilidade de gerar interações de hidrogênio com a cisteína nessa porção; há também a presença do anel aromático *para*-substituído com átomos mais e menos eletronegativos e grupos mais hidrofílicos para fins de comparações, além das metilas geminais que tornam essa porção da molécula mais hidrofóbica.

Figura 12 - Estrutura molecular do inibidor da enzima cisteína protease de *T. cruzi* (PDB 3I06).

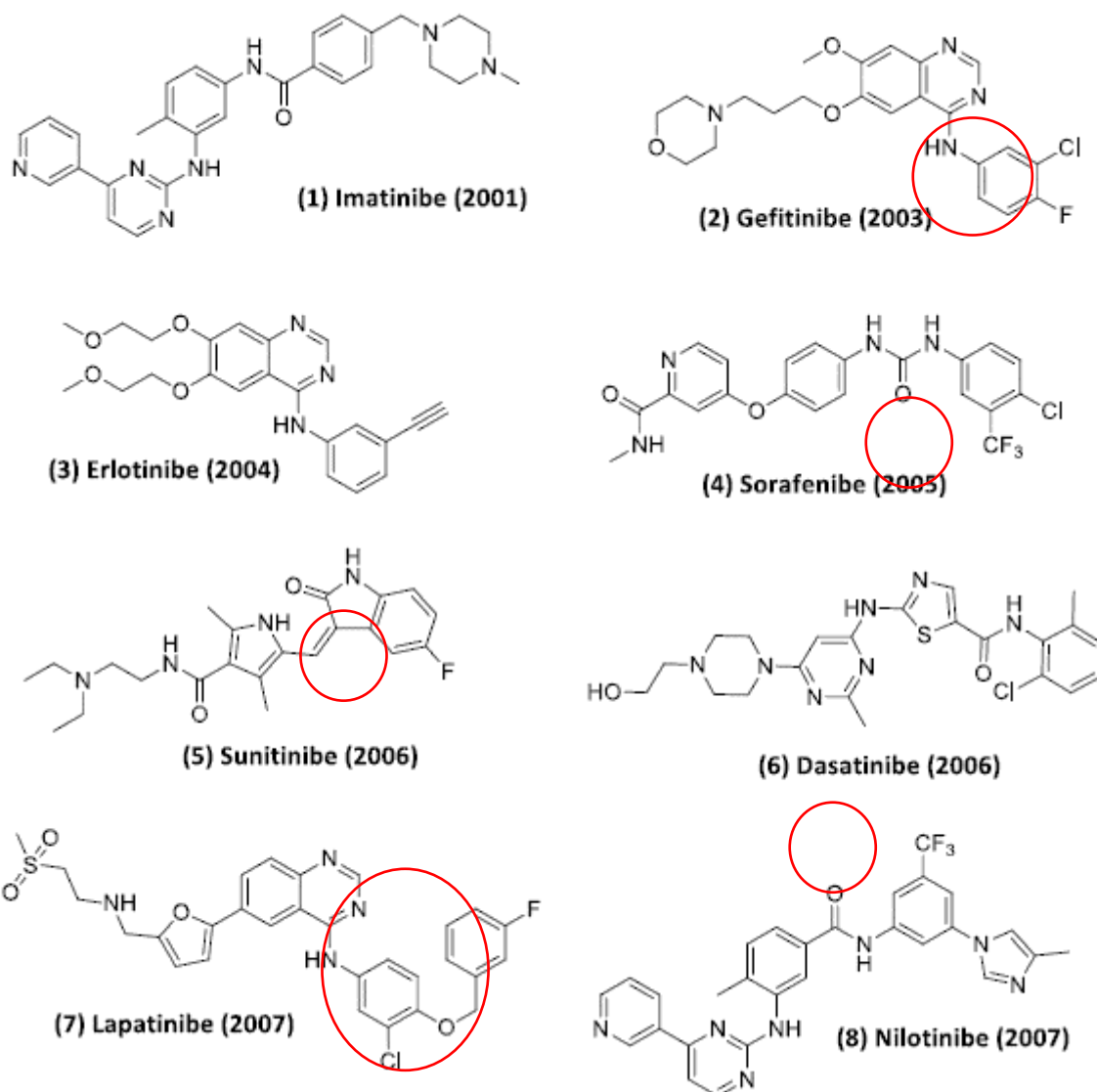


Fonte: PROTEIN DATA BANK (2019).

O outro alvo selecionado para a realização dos estudos de modelagem

molecular com a finalidade de se estabelecer uma comparação do modo de interação entre a série e enzimas essenciais para o parasito foi a enzima CRK3, que relata inibidores do domínio intracelular de proteínas quinases conhecidos, conforme ilustra a Figura 13.

Figura 13 - Inibidores conhecidos de proteínas cinase dependente de ciclina.



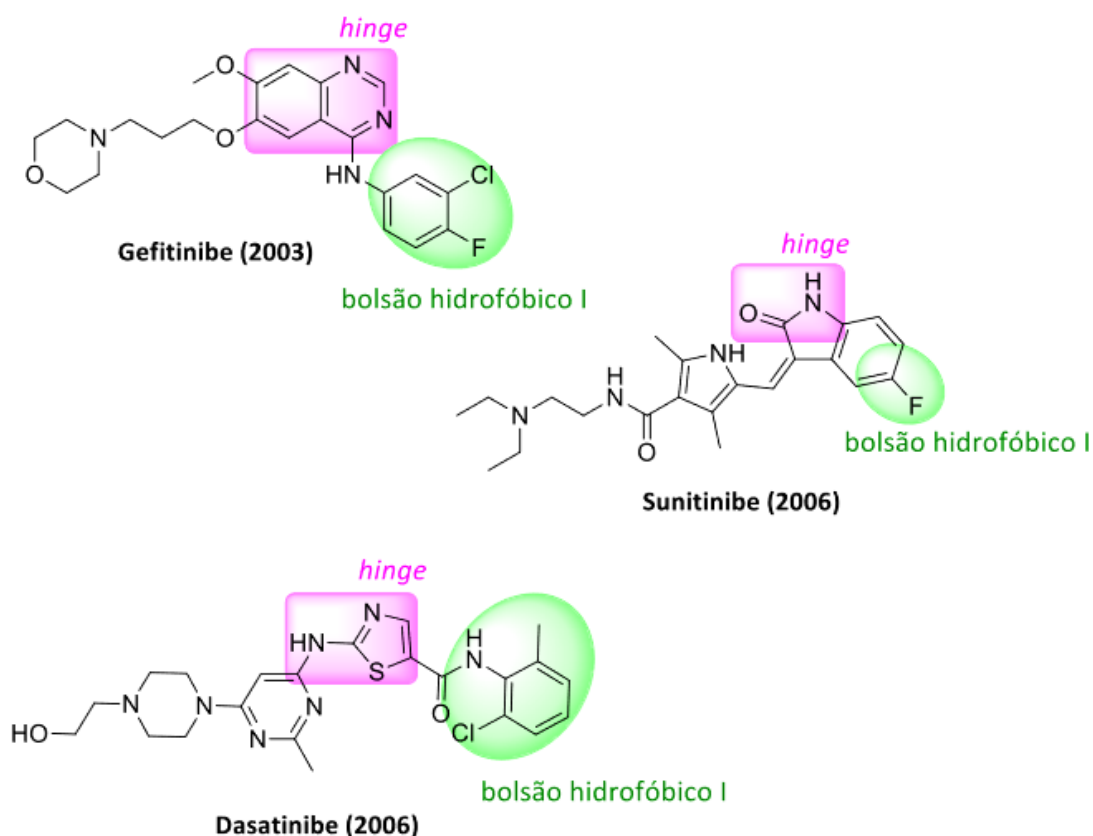
Fonte: BARREIRO; BARBOSA (2018).

Nela é possível observar os grupamentos semelhantes ao da série proposta, como o grupamento metóxido, a presença de grupamento básico, halogênios (Cloro, Flúor e Bromo) ligado diretamente à anéis aromáticos, grupamento éter e retiradores de elétrons como o CF_3 ; buscando assim a inibição da enzima quinase dependente de ciclina presente em espécies de *Leishmania*

(CRK3) (BARREIRO; BARBOSA, 2018).

Sabe-se que a estrutura x atividade da enzima CRK3 está intimamente ligada ao sítio ativo que se liga o ATP, por isso a semelhança entre os anéis bicíclicos nitrogenados. Sendo assim, a enzima possui uma região onde se ligaria a adenosina, chamada de *hinge* (entre os resíduos 80-84) possível de realizar interação de hidrogênio e uma porção hidrofóbica adjacente, relacionada diretamente à parte das moléculas em que contém um aromático ligado diretamente à átomos eletronegativos (FIGURA 14) (BARREIRO; BARBOSA, 2018).

Figura 14 - Estruturas químicas de inibidores conhecidos da enzima CRK3 e suas porções que se ligam a aminoácidos nas regiões do hinge e bolsão hidrofóbico.



Fonte: BARREIRO; BARBOSA (2018).

Daí é possível perceber a semelhança com a unidade aromática substituída em *para* com grupamento variável do éter oxímico, buscando a inibição da enzima.

Alterações no anel aromático na posição *para* ao grupamento carbonila do éter da série foi proposta para se investigar o perfil de interação entre os compostos e a enzima, além de obter uma relação com a atividade leishmanicida apresentada por estes.

A presença de um anel aromático substituído por um padrão catecólico mascarado na forma de um grupo acetal na molécula do safrol, faz dele matéria-prima de grande interesse. Quando as moléculas alvo possuem em suas estruturas anéis aromáticos contendo a porção metilendioxibenzeno, o uso destas substâncias como matérias-primas é estrategicamente vantajoso (COSTA, 2009).

Além disso as alterações propostas também tem relação com fármacos e patentes já registradas com comprovadas atividades leishmanicidas. Entre as variações estão: alterações de hidrossolubilidade; a adição de grupamentos volumosos; adição de grupamentos doares de elétrons ao anel aromático e retiradores de elétrons; grupamentos aceptores e doadores de interações de hidrogênio.

Os critérios de escolha se basearam em estudos de análogos de fármacos já conhecidos e de estudos de viabilidade de administração, como por exemplo a hidrossolubilidade, que no caso da Anfotericina B possui limitada solubilidade em água e baixa permeabilidade em membrana, devido ao seu peso molecular elevado e a presença de muitos grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio. Como resultado, é fracamente absorvida, apresentando baixa biodisponibilidade oral no homem. Por este motivo, a anfotericina B é administrada por via intravenosa, o que limita o seu uso em países pobres e em desenvolvimento, já que este processo demanda de hospitalização do paciente. Já as alterações nos grupamentos volumosos, eletronegativos também demonstram alterações já realizadas por exemplo no fármaco Pentamidina, que altera a sua atividade dependendo do tipo de grupo ligado diretamente ao anel da molécula (BASTOS *et al.*, 2016). Dessa forma seria possível traçar um paralelo com as moléculas de interesse e a resposta com base em alterações semelhantes.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas para a realização do estudo de modelagem molecular e síntese e caracterização dos éteres oxímicos propostos são descritas a seguir.

5.1 ESTUDOS COMPUTACIONAIS POR MODELAGEM MOLECULAR

A etapa dos estudos de química computacional do trabalho foi realizada no Laboratório de Modelagem Molecular e Simulação Computacional (MolMod – CS), da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. Foram utilizados computadores com o processador AMD Phenom™ X3 8650, 4.00 Gb de memória RAM e placa de vídeo nVidia GeForce™ 9500 GT, 512MB RAM e sistema operacional *openSUSE Tumbleweed*. O software de modelagem molecular utilizado é o pacote Schrödinger com a interface gráfica Maestro 11.2 (SCHRÖDINGER, 2019-3). Para a construção do ligante foi utilizada a ferramenta *LigPrep* e, para a realização do *docking* das moléculas utilizou-se a ferramenta *Induced Fit Docking* (IFD) combinado ao *Prime* (programa de predição da estrutura da proteína e de refinamento do composto) e ao *Glide* (que realiza o *docking* e fornece o *scoring* das moléculas, relacionando a interação ligante-receptor) (SCHRÖDINGER, 2019). Para realização da modelagem molecular por homologia foi utilizado o software *MODELLER* versão 9.16 com auxílio do programa *PROCHECK*, além de outros softwares online para validação da mesma.

5.1.1 Preparo dos Ligantes e Perfil de Biodisponibilidade

A construção dos ligantes (série de éteres oxímicos propostos), foi realizada utilizando a interface Maestro (Schrödinger) pelo *2D Sketcher* e preparados no programa *LigPrep*, presente na plataforma Schrödinger, a fim de otimizar a geometria destas moléculas, utilizando o campo de força OLPLS_3 e estado de ionização para pH igual a $7,0 \pm 2,0$ (usando Epik).

As propriedades físico-químicas da série de moléculas proposta foram avaliadas utilizando-se o programa *QuikProp* – Schrödinger, que avalia eficientemente propriedades farmacêuticas relevantes para milhares de compostos (SCHRÖDINGER, 2019), a fim de determinar seus perfis de

lipofilicidade, biodisponibilidade, avaliação do potencial de serem absorvidas pelo organismo humano e violações da regra de Lipinski (LIPINSKI, 2004).

5.1.2 Modelagem Molecular por Homologia e Validação

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

5.1.2.1 CRK3

A construção do modelo tridimensional por homologia estrutural para a proteína CRK3 foi baseada no estudo realizado pelo grupo de pesquisa do MolMod – CS da UNIFAL-MG descrito na literatura por PEREIRA (2013), a partir da estrutura já resolvida no banco de dados PDB 2R3I (1,28 Å).

5.1.2.2 rCPB2.8

A sequência primária de aminoácidos da proteína rCPB2.8 de *Leishmania mexicana* foi obtida no banco de dados UniProt com código P36400, possuindo 443 aminoácidos. Utilizou-se para a construção do modelo tridimensional a região de sequência de aminoácidos entre os resíduos 122 a 337, por corresponder à sequência de aminoácidos que compõe a forma ativa e mais estável da enzima em seu local de ação, removendo-se as regiões C-terminais e N-terminais que não são essenciais em sua atividade (MOTTRAM *et al.*, 1997) e que, com o auxílio do estudo realizado por COELHO *et al.*, 2017 demonstrou eficácia na obtenção.

A construção de um modelo tridimensional por homologia estrutural para a proteína rCPB2.8 foi adaptada de COELHO (2017) com alteração em apenas uma das estruturas utilizadas como molde, utilizando a proteína de código 3I06 (1,10 Å) em substituição da 2P7U (1,65 Å) utilizada pela autora. Iniciando-se então com a busca de proteínas homólogas com um grau de identidade sequencial, obtido pelo alinhamento local de estruturas conhecidas tridimensionalmente, com o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) foi também realizada uma breve busca por *templates* por meio do servidor online de bioinformática estrutural MODBASE, banco de dados de modelos comparativos de estrutura de proteínas (PIEPER *et*

al., 2013) e *SWISSMODEL* dedicado à modelagem por homologia de estruturas de proteína 3D (WATERHOUSE *et al.*, 2018). Foram selecionadas duas estruturas cristalográficas (Código PDB: 3IUT – 1,2 Å e 3I06) presente no banco de dados PDB, que possuíam boa resolução, distribuição dos resíduos no gráfico de Ramachandran e bom grau de identidade e similaridade.

Posteriormente, a modelagem estrutural comparativa foi realizada por meio do software *MODELLER* versão 9.16, com a construção de 100 modelos. A seleção do melhor foi realizada com auxílio do programa *PROCHECK* com análise do gráfico de Ramachandran. Ele foi então validado por meio de softwares online como *Verify3D* e *ProsaWeb*, além do cálculo do RMSD e então otimizado para a obtenção de uma estrutura adequada para futuros estudos de ancoramento molecular.

5.1.3 Preparo das Proteínas

A estrutura tridimensional da proteína CRK3 da *Leishmania sp.* e da proteína rCPB2.8 de *Leishmania mexicana* utilizada para realizar os estudos de ancoramento foi prevista pela técnica de modelagem molecular por homologia com um (2R3I) e múltiplos *templates* (3I06 e 3IUT) respectivamente.

Estas estruturas proteicas a serem utilizadas no estudo de ancoramento foram submetidas à preparação pelo programa *Protein Preparation Wizard* com adição de hidrogênios, atribuição de cargas parciais utilizando o campo de força OPLS-3 e atribuição dos estados de protonação a pH 7 dos resíduos, estimados utilizando cálculos de pKa do módulo PROPKA (SCHRÖDINGER, 2019). Todos as águas e heteroátomos foram removidos. Em seguida, a minimização foi realizada utilizando o campo de força OPLS-3 no módulo *Macromodel* em Schrödinger.

5.1.4 Docking Molecular e Validação

De modo a permitir uma interação entre o complexo alvo-receptor para análise, a simulação de docking molecular foi realizada fazendo uso do protocolo *Induced Fit Docking (IFD)* contido na suíte Schrodinger, que busca predizer o modo de ligação e as mudanças estruturais no receptor pela estratégia que utiliza o modo receptor e ligante flexível. A área da caixa de acoplamento foi definida

para incluir todos os resíduos de aminoácidos escolhidos (**CRK3** – LEU10, LYS33, VAL83, ASP86; **rCPB2.8** – GLN19, CYS25, ASN175, HIS159), que se encontram no sítio ativo de cada enzima particularmente, com dimensões de 20 × 20 × 20 Å. O campo de força utilizado foi o OPLS_3. Os complexos ligante-proteína finais foram visualizados usando a plataforma Maestro Versão 11.2 e figuras foram geradas utilizando esta interface gráfica e o software *Pymol* (SCHRÖDINGER, 2019).

O fármaco Pentamidina foi utilizado como padrão nos estudos *in silico* com a finalidade de se comparar a afinidade de ligação existente entre este fármaco com atividade leishmanicida conhecida e a proteína do estudo e escolhido a partir de um estudo prévio no qual obteve melhor perfil de afinidade com os alvos, além da maior semelhança entre grupos funcionais com os éteres oxímicos propostos dentre os fármacos analisados (Anfotericina B, Antimoniais Pentavalentes, Simataquina, Miltefosina).

A validação dos protocolos de docking molecular foi realizada por meio do estudo de reancoramento tentando reproduzir o modo de ligação original presente na estrutura cristalográfica escolhida, utilizando a proteína alvo já preparada e o composto inibidor que se encontra cocrystalizado junto à proteína, que também foi preparado e minimizado. Após o ancoramento utilizando o programa *Induced Fit Docking* (IFD), foi calculado a raiz do desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD), pelo programa *Align Binding Site* (Schrödinger), para se verificar a similaridade entre o modo de ligação experimental obtida por cristalografia e o método comparativo entre a solução de menor energia de *GlideScore* no reancoramento molecular e o diagrama de interações 2D para verificar se elas eram coerentes com a literatura.

5.2 SÍNTESE

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

A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel em suporte de alumínio com

detector de fluorescência (Macherey-Nagel, DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra Sil G/UV₂₅₄). As purificações por cromatografia em coluna (CCS) foram realizadas com sílica gel 60, 70-230 mesh (Sorblin). As purificações por placa preparativa foram realizadas com sílica gel 60 com detector a UV 254 nm (Macherey-nagel).

A análise de espectroscopia na região do infravermelho (IV) foi realizada no Núcleo Controle de Qualidade da UNIFAL-MG em espectrômetro Thermo Fisher Scientific Nicolet-iS50 e processados com o software MestreNova® versão 6.0.2-5475 (Mestrelab Research L.S®) com valores de bandas descritos em número de onda (cm⁻¹).

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

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Imunologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), em espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo sequencial XEVO-TQS (Waters Corporation) com fonte de ionização ESI (electrospray).

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

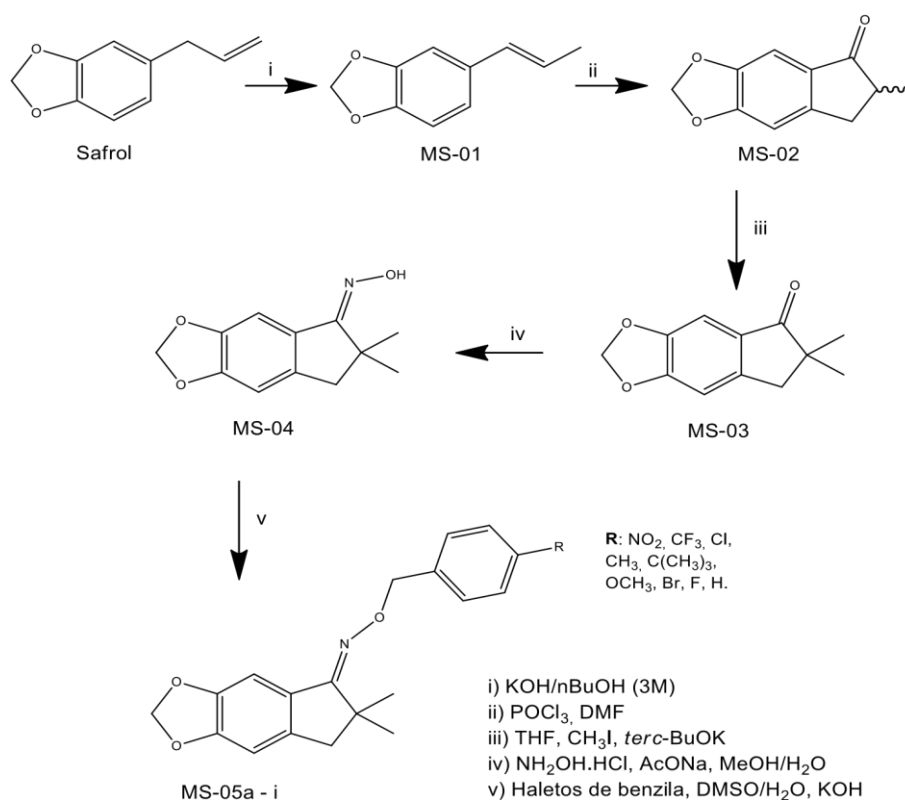
Os solventes e reagentes utilizados foram de grau P.A, e quando se fez necessário houve uma secagem de solventes.

5.2.1 Metodologia sintética

A série de moléculas proposta como protótipos a candidatos a fármaco, éteres oxímicos derivados do produto natural safrol, foi planejada por meio de uma rota sintética esquematizada na Figura 15. A primeira etapa (i) consiste na isomerização do produto de partida (safrol) gerando o composto **MS-01**. Em seguida passa pela reação de Vilsmeier Haack (etapa ii), formilando e ciclizando a

molécula anterior, gerando uma indanona (**MS-02**), que dispõe de um centro assimétrico. A fim de eliminá-lo e tornar a estrutura mais simples estereoquímicamente, faz-se uma reação de C-alkilação, adicionando uma metila ao carbono α adjacente à carbonila (etapa iii). O produto gerado (**MS-03**) é submetido a uma reação de adição com cloridrato de hidroxilamina em meio básico (etapa iv) produzindo o intermediário oxímico **MS-04**. Em seguida, este intermediário será submetido a reação com haletos de benzila (etapa v) formando a nova série de derivados de éteres oxímicos (**MS-05a – MS-05h**).

Figura 15 - Rota sintética para obtenção da série de novos derivados oxímicos (**MS- 05a-h**) a partir do Safrol (**MS-01**).

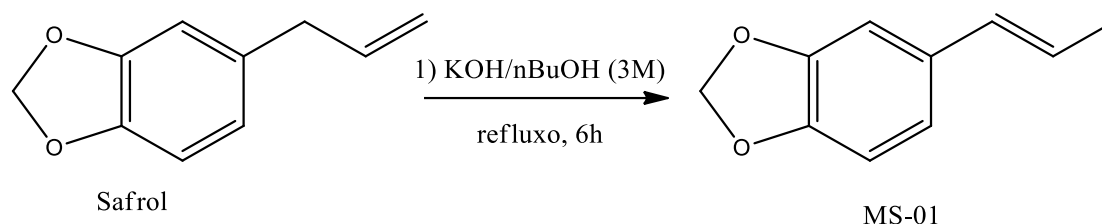


Fonte: da autora.

5.2.1.1 Síntese do intermediário 5-(1-propenil)-2H-1,3-benzodioxol (**MS-01**)

A síntese do composto **MS-01** (FIGURA 16) foi realizada e adaptada conforme método descrito por BARREIRO; LIMA (1992) por meio da reação de isomerização da dupla ligação terminal do Safrol.

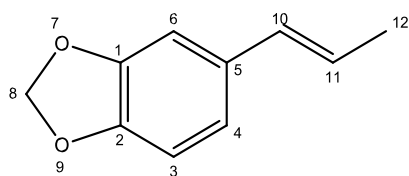
Figura 16 - Esquema sintético da obtenção do produto MS-01 por meio da reação de isomerização do Safrol.



Fonte: da autora.

Em balão bitubulado munido de condensador de refluxo foi adicionado 1 g (6,172 mmol) de safrol previamente purificado e 5 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) 3M em álcool butílico. A reação prosseguiu por 6 horas. Após este período, uma quantidade de 15 mL de água foi adicionada ao meio reacional e o pH foi neutralizado utilizando-se HCl concentrado. A obtenção da fase orgânica se deu por extrações com acetato de etila (3 x 20 mL), posteriormente lavada com solução saturada de NaCl (1 x 15 mL) e seca com Na₂SO₄ anidro. O solvente foi evaporado à pressão reduzida e o produto (MS-01) foi obtido na forma de um óleo amarelo com rendimento de 77,2%.

5.2.1.1.1 Dados de caracterização do intermediário 5-(1-propenil)-2H-1,3-benzodioxol (MS-01)



MS-01

5-(1-propenil)-2H-1,3-benzodioxol

Óleo amarelo com odor característico

F.M.: C₁₀H₁₀O₂

M.M.: 162,19 g.mol⁻¹

Rendimento: 77,2 %

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3023 (CH sp²), 2879 (CH sp³ - metila), 1598 (C=C alceno trans substituído), 1440, 1489, 1499 (C=C aromático), 1242 e 1029 (C-O-C metilenodioxila).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.85 (d, 3H, H₁₂, ³J_{H12-H11} = 6,43 Hz), 5.94 (s, 2H, H₈), 6.07 (dd, 1H, H₁₁, ³J_{H11-H12} = 6,57 Hz e ³J_{H11-H10} = 15,69 Hz) 6.32 (dd, 1H, H₁₀, ³J_{H10-H11} = 15,66 Hz), 6.74 (d, 2H, H₃ e H₄, ³J_{H3-H4} = 12,72 Hz), 6.89 (s,

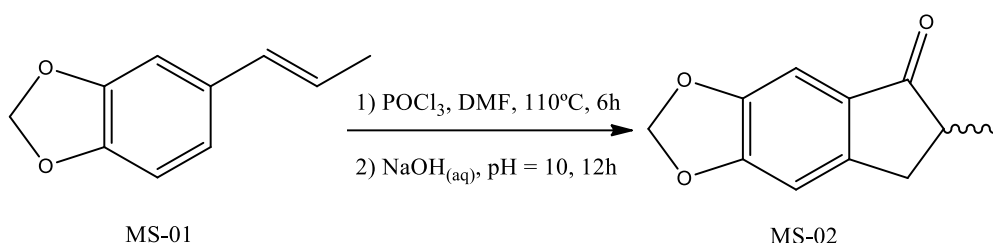
1H, H₆).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 18.40 (C₁₂), 100.92 (C₈), 105.32 (C₆), 108.22 (C₃), 120.09 (C₄), 123.94 (C₁₁), 130.54 (C₁₀), 132.49 (C₅), 147.92 (C₁), 145.50 (C₂).

5.2.1.2 Síntese do intermediário 6-metil-6,7-dihidro-2H,5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona (**MS-02**) (*BARREIRO; LIMA, 1992*)

A síntese do composto **MS-02** (FIGURA 17), foi também realizada e adaptada, conforme método descrito por BARREIRO; LIMA (1992) por meio da reação de Vilsmeier-Haack. Via reação “one pot”, a primeira etapa consiste na formilação do anel aromático (1) com posterior ciclização (2), a fim de se obter uma indanona adjacente ao anel aromático do produto de partida (**MS-01**).

Figura 17 - Esquema sintético da obtenção do produto **MS-02** por meio da reação de Vilsmeier-Haack a partir do isosafrol (**MS-01**).

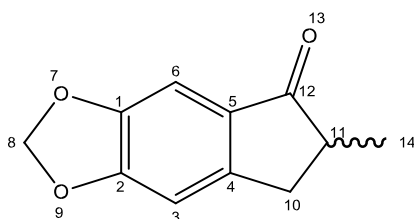


Fonte: da autora.

Em balão bitubulado acoplado a um condensador de refluxo 0,35 mL (3,751 mmol) de oxiclreto de fósforo (POCl₃) e 1,45 mL (18,869 mmol) de *N,N*-dimetilformamida (DMF) seca foram agitados em sistema fechado e anidro, sob atmosfera de Nitrogênio (N₂), a temperatura de 0 °C por 30 minutos, seguindo-se da adição de 0,500 g (3,086 mmol) de isosafrol (MS-01), quando a reação prosseguiu à temperatura de 110 °C durante 6 horas. O meio reacional foi vertido em 12 mL de gelo e o pH foi elevado ao valor de 10 com NaOH_(aq) 1M, mantendo-se sob agitação por 12 horas à temperatura ambiente. Posteriormente extrações com éter etílico foram realizadas (3 x 15 mL); as frações orgânicas foram reunidas, lavada com solução saturada de NaCl (1 x 10 mL) e seca com Na₂SO₄ anidro. O

solvente foi evaporado em pressão reduzida. Após o isolamento da reação, o produto reacional foi purificado em coluna cromatográfica (eluente: hexano/acetato de etila, 8:2) e obtido puro na forma de um sólido alaranjado com um rendimento de 62,3%.

5.2.1.2.1 *Dados de caracterização do intermediário 6-metil-6,7-dihidro-2H,5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona (MS-02)*



MS - 02

6-metil-6,7-dihidro-2H,5H-indeno[5,6d][1,3]dioxol-5-ona

Sólido alaranjado

F.M.: C₁₁H₁₀O₃

M.M.: 190,20 g.mol⁻¹

Rendimento: 62,3 %

F.F = 61-65 °C

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2964 (CH sp²), 2909 (CH sp³), 1681 (C=O carbonila), 1608 e 1465 (C=C aromático), 1317 e 1287 (C-H aromático), 1252 e 1024 (C-O-C).

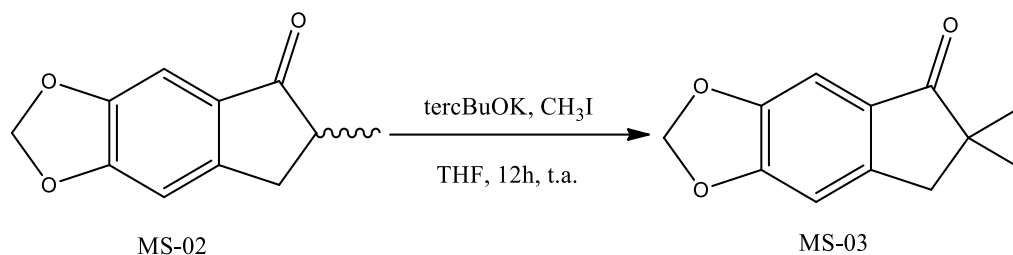
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.28 (d, 3H, H₁₄, ³J_{H-H} = 7,38 Hz), 2.56-2.63 (dd, 1H, H₁₀, ³J_{H-H} = 3,57 Hz e ²J_{H-H} = 16,87 Hz), 2.70 (m, 1H, H₁₁), 3.23-3.31 (dd, 1H, H₁₀, ³J_{H-H} = 7,50 Hz e ³J_{H-H} = 16,90 Hz) 6.05 (s, 2H, H₈), 6.80 (s, 1H, H₃), 7.09 (s, 1H, H₆).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 16.61 (C₁₄), 34.93 (C₁₀), 42.44 (C₁₁), 102.13 (C₈), 102.53 (C₃), 105.64 (C₆), 130.82 (C₄), 148.22 (C₂), 150.94 (C₁), 154.27(C₅), 207.47 (C₁₂).

5.2.1.3 Síntese do intermediário 6,6-dimetil-6,7-dihidro-2H,5H-indeno[5,6 d][1,3]dioxol-5-ona (**MS-03**) (RANU; JANA, 1999)

A síntese de **MS-03** (FIGURA 18) foi realizada por uma reação de substituição de um hidrogênio indanônico por metilas geminais eliminando centro assimétrico da molécula, adaptado da metodologia de RANU; JANA (1999).

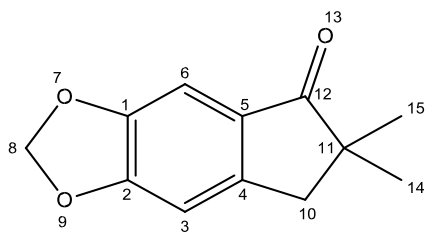
Figura 18 - Esquema sintético da obtenção do produto **MS-03** por meio de C-alkilação de **MS-02**.



Fonte: da autora.

Em um balão bitubulado foram adicionados 0,4 g (4,000 mmol) de *tert*BuOK solubilizados em 7,5 mL de tetraidrofurano (THF) previamente seco, em seguida foram colocados 0,250 g (1,315 mmol) do produto MS-02, após 30 minutos, foram adicionados 0,3 mL (4,817 mmol) de iodometano (CH₃I); a reação permaneceu em agitação magnética por 12 horas em temperatura ambiente. Passado o tempo reacional, o solvente (THF) foi retirado em rotavapor com pressão reduzida, obtendo um resíduo sólido ao qual foram adicionados 9 mL de água. Em seguida o pH foi ajustado para 7 com solução 1M de HCl e posteriormente realizadas extrações com acetato de etila (3 x 10 mL). A fração orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl (1 x 5 mL) e seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada em rotavapor a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado em coluna cromatográfica (eluente: hexano/acetato de etila, 8:2) com 74,9% de rendimento como um sólido amarelado.

5.2.1.3.1 Dados de caracterização do intermediário 6,6-dimetil-6,7-dihidro-2H,5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona (**MS-03**)



MS - 03

6,6-dimetil-6,7-dihidro-2H,5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona

Sólido amarelado

F.M.: C₁₂H₁₃O₃

M.M.: 205,21 g.mol⁻¹

Rendimento: 74,9 %

F.F = 69-72 °C

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2914 (CH sp^3), 1672 (C=O carbonila), 1608 e 1459 (C=C aromático), 1257 e 1021 (C-O-C metilenodioxila).

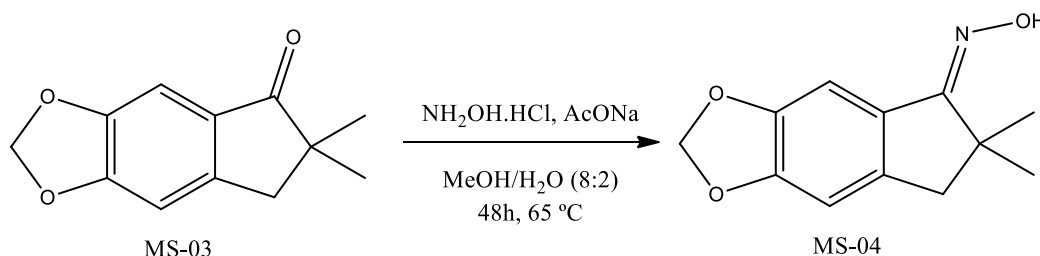
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.20 (s, 6H, H_{14} e H_{15}), 2.87 (s, 2H, H_{10}), 6.05 (s, 2H, H_8), 6.78 (s, 1H, H_3), 7.09 (s, 1H, H_6).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 25.42 (C_{14} e C_{15}), 42.83 (C_{10}), 46.04 (C_{11}), 102.10 (C_8), 102.87 (C_3), 105.73 (C_6), 129.64 (C_4), 148.23 (C_2), 149.60 (C_1), 154.39 (C_5), 209.45 (C_{12}).

5.2.1.4 Síntese do intermediário N-[(5)-6,6-dimetil-6,7-dihidro-2H,5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ilideno]hidroxilamina (**MS-04**) (GOPALSAMY, 2006)

A obtenção do intermediário oxímico (**MS-04**) foi realizada e adaptada a partir da metodoliga descrita por GOPALSAMY (2006) que, a fim de transformar a carbonila cetônica em oxima pela reação de adição de cloridrato de hidroxilamina, conforme esquema na Figura 19.

Figura 19 - Esquema sintético da obtenção do derivado oxímico (**MS-04**) a partir do intermediário indanônico (**MS-03**).

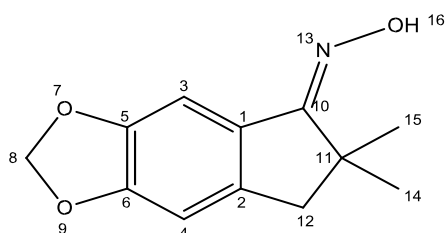


Fonte: da autora.

Em um balão monotubulado acoplado a um condensador, foram adicionados 0,070 g (0,341 mmol) do derivado MS-03, 0,22 g de AcONa (2,683 mmol), 0,19 g de $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ (2,714 mmol) juntamente com a mistura de 2 mL de MeOH/ H_2O (8:2). O meio reacional permaneceu a 65°C por 48 horas. Decorrido este tempo, adicionou-se água (2 mL) ao meio reacional, que em seguida foi extraído com diclorometano (3 x 5 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl (1 x 3 mL), seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório sobre pressão reduzida. O resíduo sólido foi purificado em

coluna cromatográfica (eluente: hexano/acetato de etila, 7:3) e obtido em forma de um sólido branco com 54,6% de rendimento.

5.2.1.4.1 *Dados de caracterização do intermediário N-[(5)-6,6-dimetil-6,7-dihidro-2H,5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ilideno]hidroxilamina (MS-04)*



MS - 04

N-[(5)-6,6-dimetil-6,7-dihidro-2H,5Hindeno[5,6-d][1,3]dioxol-5ilideno]hidroxilamina

Sólido branco

F.M.: C₁₂H₁₄NO₃

M.M.: 220,21 g.mol⁻¹

Rendimento: 54,6 %

F.F = 77-79 °C

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3251 (O-H oxima), 2958 (CH sp²), 2919 (CH sp³), 1603 (C=N), 1266 e 1024 (C-O-C), 1321 e 1465 (CH aromático), 930 (N-O).

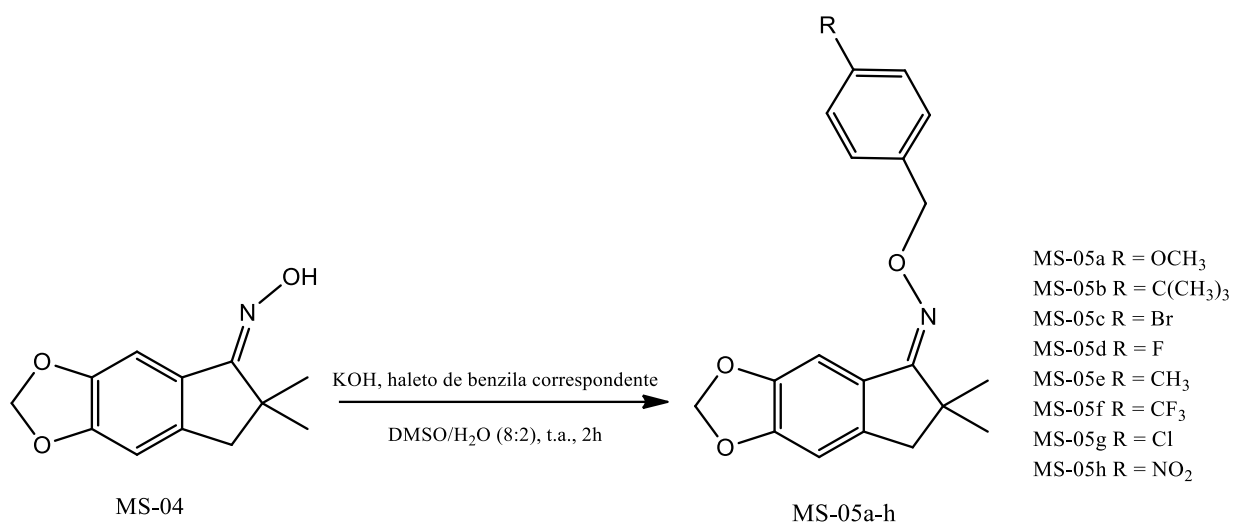
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.32 (s, 6H, H₁₄ e H₁₅), 2.83 (s, 2H, H₁₂), 6.00 (s, 2H, H₈), 6.71 (s, 1H, H₄), 7.94 (s, 2H, H₃).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 28.43 (C₁₄ e C₁₅), 42.64 (C₁₁), 45.90 (C₁₂), 101.55 (C₈), 105.33 (C₄), 109.27 (C₃), 126.02 (C₂), 141.66 (C₆), 146.82 (C₅), 150.42 (C₁), 165.09 (C₁₀).

5.2.1.5 Procedimento geral da síntese dos derivados éteres oxímicos (**MS-05**) (LI, et al. 2002)

A última etapa da rota sintética foi a reação de formação da série de éteres derivados da oxima (**MS-05a-h**) adaptado de LI (2002), na qual o intermediário **MS-04** foi submetido a reações de acoplamento com os respectivos haletos de benzila *p*-substituídos para fornecer os produtos desejados.

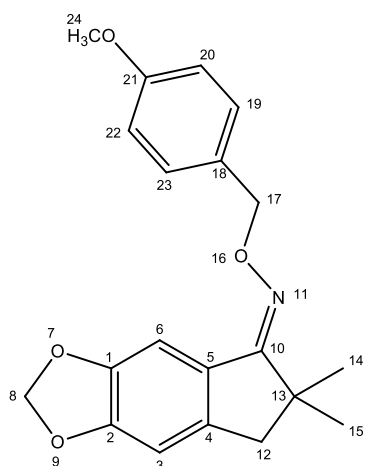
Figura 20 - Esquema sintético da obtenção dos éteres de oxima (**MS-05a-h**) a partir da oxima (**MS-04**).



Fonte: da autora.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 15 mL de dimetilsufóxido/água (8:2), foram adicionados 0,600 g de hidróxido de potássio (0,107 mol – 13 equivalentes) e 0,150 g do derivado MS-04 (0,83 mmol – 1 equivalente). A mistura ficou sob agitação magnética em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 equivalentes do haleto de benzila correspondente. A reação continuou por, aproximadamente, 30 minutos, quando se observou o total consumo do material de partida (derivado MS-04) por cromatografia em camada delgada (Eluente: hexano/acetato de etila – 60:40). Adicionou-se, então, 30 mL de solução saturada de cloreto de sódio ao balão contendo a mistura e fez-se a transferência para um funil de separação de 100 mL. Obteve-se a fase orgânica pela extração com acetato de etila (4 x 20 mL), sendo depois lavada com água destilada (2 x 20 mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O produto obtido foi submetido à purificação por cromatografia em coluna de sílica, a fim de se isolar o produto de interesse da mistura de reagentes com um rendimento variável.

5.2.1.5.1 Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-metoxibenzil) oxima (**MS-05a**)



MS-05a

(Z)-6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-metoxibenzil) oxima

Óleo branco

F.M.: C₂₀H₂₁NO₄

M.M.: 339,39 g.mol⁻¹

Rendimento: 65,3%

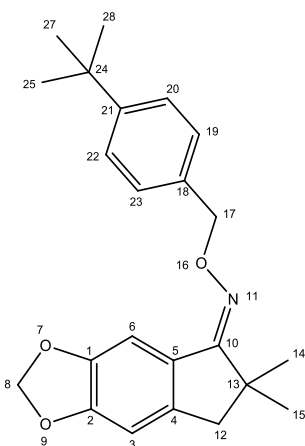
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2954 (C-H), 1603 (C=N), 1262 (C-O éter), 1237 e 1029 (C-O-CH₃), 941 (N-O).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.32 (s, 6H, H₁₄ e H₁₅), 2.79 (s, 2H, H₁₂), 3.81 (s, 3H, H₂₄), 5,11 (s, 2H, H₁₇), 5.95 (s, 2H, H₈), 6.68 (s, 1H, H₃), 6.89 (d, 2H, H₂₀ e H₂₂, ²J_{H-H} = 8,55 Hz), 7.36 (d, 2H, H₁₉ e H₂₃, ²J_{H-H} = 8,53 Hz), 7.73 (s, 1H, H₆).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 28.54 (C₁₄ e C₁₅), 42.65 (C₁₃), 45.89 (C₁₂), 55.26 (C₂₄), 76.11 (C₁₇), 101.43 (C₈), 105.28 (C₆), 109.16 (C₃), 113.68 (C₂₀ e C₂₂), 126.38 (C₅), 129.84 (C₁₉ e C₂₃), 130.18 (C₁₈), 141.58 (C₄), 146.58 (C₁), 150.13 (C₂), 159.19 (C₂₁), 164.58 (C₁₀).

EM ESI (m/z): calculado para [M+H]⁺ = 340,39; encontrado: 340,53

5.2.1.5.2 Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-(terc-butil)benzil) oxima (**MS-05b**)



MS-05b

(Z)-6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-(terc-butil)benzil) oxima

Óleo amarelado

F.M.: C₂₃H₂₇NO₃

M.M.: 365,47 g.mol⁻¹

Rendimento: 31,2%

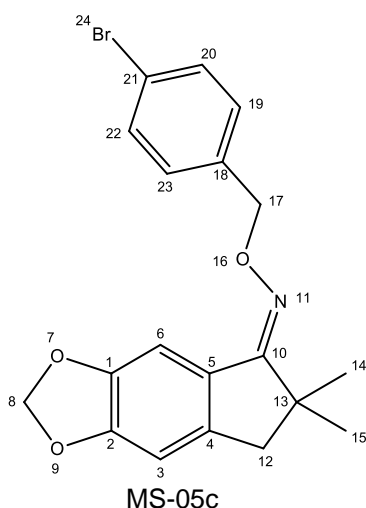
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2954 (CH sp^3), 1608 (C=N), 1465 e 1262 (C-O éter), 1034 (C-O), 1009 (N-O).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.32 (s, 6H, H_{14} e H_{15}), 1.35 (s, 9H, H_{25} , H_{28} e H_{27}), 2.81 (s, 2H, H_{12}), 5.18 (s, 2H, H_{17}), 5.97 (s, 2H, H_8), 6.70 (s, 1H, H_3), 7,40 (s, 4H, H_{19} , H_{20} , H_{23} e H_{22}), 7.80 (s, 1H, H_6)

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 28.57 (C_{14} e C_{15}), 31.42 (C_{25} , C_{27} e C_{28}), 34.99 (C_{24}), 42.69 (C_{13}), 45.92 (C_{12}), 76.33 (C_{17}), 101.44 (C_8), 105.31 (C_6), 109.26 (C_3), 125.28 (C_{20} e C_{22}), 126.41 (C_5), 127.91 (C_{19} e C_{23}), 135.11 (C_{18}), 141.59 (C_4), 146.61 (C_1), 150.16 (C_2), 150.54 (C_{21}), 164.52 (C_{10}).

EM ESI (m/z): calculado para $[\text{M}+\text{H}]^+ = 366,47$; encontrado: 366,35

5.2.1.5.3 Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-bromobenzil) oxima (**MS-05c**)



(Z)-6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-bromobenzil) oxima

Óleo branco

F.M.: $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{BrNO}_3$

M.M.: $388,26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendimento: 21,6%

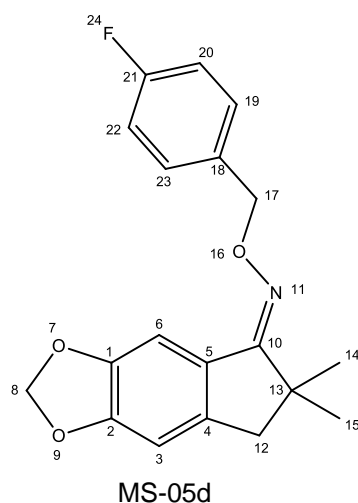
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2914 (C-H sp^3), 1603 (C=N), 1470 e 1266 (C-O éter), 1034 (C-O), 1005 (N-O).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.26 (s, 6H, H_{14} e H_{15}), 2.80 (s, 2H, H_{12}), 5.13 (s, 2H, H_{17}), 5.97 (s, 2H, H_8), 6.69 (s, 1H, H_3), 7.23 (d, 2H, H_{20} e H_{22} , $^2J_{\text{H-H}} = 8,40$ Hz), 7.29 (d, 2H, H_{19} e H_{23} , $^2J_{\text{H-H}} = 8,43$ Hz), 7.75 (s, 1H, H_6).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 28.53 (C_{14} e C_{15}), 42.74 (C_{13}), 45.80 (C_{12}), 75.51 (C_{17}), 101.53 (C_8), 105.38 (C_6), 109.05 (C_3), 121.64 (C_{21}), 126.21 (C_5), 129.39 (C_{19} e C_{23}), 131.58 (C_{20} e C_{22}), 137.01 (C_{18}), 141.77 (C_4), 146.70 (C_2), 150.35 (C_1), 165.07 (C_{10}).

EM ESI (m/z): calculado para $[\text{M}+\text{H}]^+ = 389,26$; encontrado: 389,34.

5.2.1.5.4 Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-fluorbenzil) oxima (**MS-05d**)



(*Z*)-6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-fluorbenzil) oxima

Óleo amarelado

F.M.: C₁₉H₁₈FNO₃

M.M.: 327,35 g.mol⁻¹

Rendimento: 26,7%

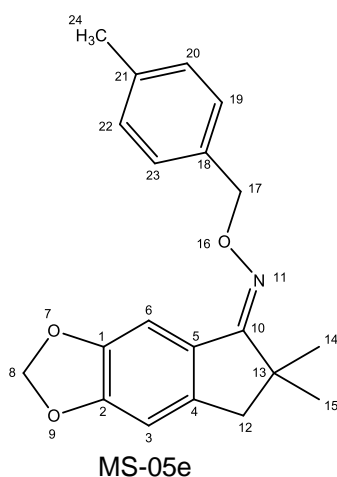
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2919 (C-H sp³), 1603 (C=N), 1510 (C-O), 1465 e 1262 (C-O éter), 1034 (N-O).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.28 (s, 6H, H₁₄ e H₁₅), 2.79 (s, 2H, H₁₂), 5.14 (s, 2H, H₁₇), 5.96 (s, 2H, H₈), 6.69 (s, 1H, H₃), 7.03 (t, 2H, H₂₀ e H₂₂, ²J_{H-H} = 8,58 Hz), 7.39 (dd, 2H, H₁₉ e H₂₃, ²J_{H-H} = 5,55 Hz e ³J_{H-H} = 8,31 Hz), 7.74 (s, 1H, H₆).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 28.51 (C₁₄ e C₁₅), 42.70 (C₁₃), 45.88 (C₁₂), 75.60 (C₁₇), 101.49 (C₈), 105.35 (C₆), 109.06 (C₃), 115.01 e 115.29 (C₂₀ e C₂₂), 126.26 (C₅), 129.68 e 129.99 (C₁₉ e C₂₃), 134.02 (C₁₈) 141.72 (C₄), 146.66 (C₁), 150.27 (C₂), 160.74 e 163.99 (C₂₁), 164.92 (C₁₀).

EM ESI (m/z): calculado para [M+H]⁺ = 328,35; encontrado: 328.39.

5.2.1.5.5 Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-metilbenzil) oxima (**MS-05e**)



(*Z*)-6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-metilbenzil) oxima

Óleo amarelado

F.M.: C₂₀H₂₁NO₃

M.M.: 323,39 g.mol⁻¹

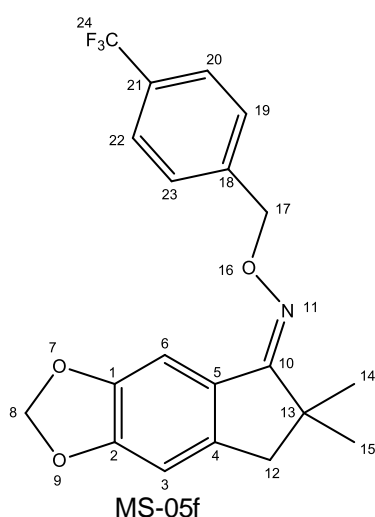
Rendimento: 32,9%

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2919 (C-H sp^3), 1900 (anel *p*-substituído), 1603 (C=N), 1465 e 1262 (C-O éter), 1034 (N-O).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.29 (s, 6H, H_{14} e H_{15}), 2.36 (s, 3H, H_{24}), 2.80 (s, 2H, H_{12}), 5.15 (s, 2H, H_{17}), 5.96 (s, 2H, H_8), 6.68 (s, 1H, H_3), 7.16 (d, 2H, H_{20} e H_{22} , $^2J_{\text{H-H}} = 7,80$ Hz) 7.32 (d, 2H, H_{19} e H_{23} , $^2J_{\text{H-H}} = 7,95$ Hz), 7.76 (s, 1H, H_6).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 21.25 (C_{24}), 28.54 (C_{14} e C_{15}), 42.66 (C_{13}), 45.90 (C_{12}), 76.34 (C_{17}), 101.44 (C_8), 105.29 (C_6), 109.20 (C_3), 126.39 (C_5), 128.24 (C_{19} e C_{23}), 129.01 (C_{20} e C_{22}), 135.05 (C_{18}), 137.32 (C_{21}), 141.58 (C_4), 146.60 (C_1), 150.14 (C_2), 164.59 (C_{10}).

5.2.1.5.6 Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-(trifluormetil)benzil) oxima (**MS-05f**)



(Z)-6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-(trifluormetil)benzil) oxima

Óleo amarelado

F.M.: $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{NO}_3$

M.M.: 377,36 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

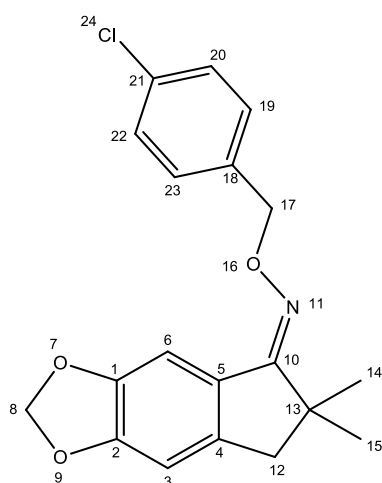
Rendimento: 33,5%

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2919 (C-H sp^3), 1465 e 1266 (C-O éter), 1317 (C-F), 1058 (N-O)

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.27 (s, 6H, H_{14} e H_{15}), 2.80 (s, 2H, H_{12}), 5.24 (s, 2H, H_{17}), 5.98 (s, 2H, H_8), 6.70 (s, 1H, H_3), 7.51 (d, 2H, H_{19} e H_{23} , $^2J_{\text{H-H}} = 8,10$ Hz), 7.60 (d, 2H, H_{20} e H_{22} , $^2J_{\text{H-H}} = 7,96$ Hz), 7.77 (s, 1H, H_6)

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 28.47 (C_{14} e C_{15}), 42.77 (C_{13}), 45.89 (C_{12}), 75.38 (C_{17}), 101.54 (C_8), 105.40 (C_3), 109.02 (C_6), 125.26 e 125.21 (C_{20} e C_{22}), 125.42 (C_{24}), 126.16 (C_{21}) 127.62 (C_5), 127.88 (C_{19} e C_{23}), 141.85 (C_{18}), 142.57 (C_4), 146.74 (C_2), 150.40 (C_1), 165.27 (C_{10}).

5.2.1.5.7 Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-clorobenzil) oxima (**MS-05g**)



MS-05g

(Z)-6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-clorobenzil) oxima

Óleo transparente

F.M.: C₁₉H₁₈ClNO₃

M.M.: 343,80 g.mol⁻¹

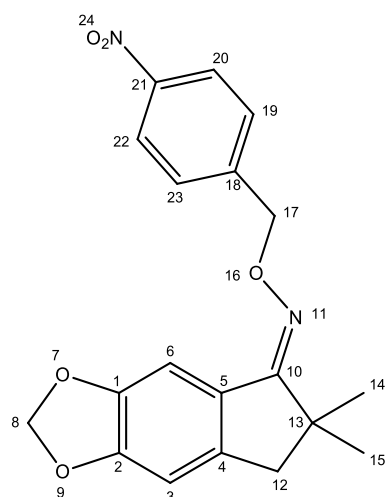
Rendimento: 22,3%

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2860(C-H), 1079 (N-O), 1900 (anel *p*-substituído), 1465 e 1262 (C-O), 2860 (C-H sp³), 797 (C-Cl).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.28 (s, 6H, H₁₄ e H₁₅), 2.80 (s, 2H, H₁₂), 5.15 (s, 2H, H₁₇), 5.97 (s, 2H, H₈), 6.70 (s, 1H, H₃), 7.28 (d, 2H, H₂₀ e H₂₂, ³J_{H-H} = 8,40 Hz), 7.33 (d, 2H, H₁₉ e H₂₀, ³J_{H-H} = 8,49 Hz), 7.76 (s, 1H, H₆).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 28.53 (C₁₄ e C₁₅), 42.74 (C₁₃), 45.89 (C₁₂), 75.49 (C₁₇), 101.53 (C₈), 105.38 (C₆), 109.06 (C₃), 126.23 (C₅), 128.63 (C₂₀ e C₂₁), 129.08 (C₁₉ e C₂₃), 133.49 (C₂₁), 136.52 (C₁₈), 141.76 (C₄), 146.70 (C₁), 150.32 (C₂), 165.04 (C₁₀).

5.2.1.5.8 Dados de caracterização do 6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-nitrobenzil) oxima (**MS-05h**)



MS-05h

(Z)-6,6-dimetil-6,7-diidro-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona O-(4-nitrobenzil) oxima

Óleo amarelo

F.M.: C₁₉H₁₈N₂O₅

M.M.: 354,36 g.mol⁻¹

Rendimento: 45,9%

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2914 (C-H sp^3), 1262 e 1034 (C-O éter), 1603 (C=N), 1514 e 1336 (NO_2 – deformação axial assimétrica e simétrica).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.25 (s, 6H, H_{14} e H_{15}), 2.80 (s, 2H, H_{12}), 5.29 (s, 2H, H_{17}), 5.99 (s, 2H, H_8), 6.71 (s, 1H, H_3), 7.53 (d, 2H, H_{19} e H_{23} , $^2J_{\text{H-H}} = 8,46$ Hz), 7.76 (s, 1H, H_6), 8.19 (d, 2H, H_{20} e H_{22} , $^2J_{\text{H-H}} = 8,67$ Hz).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 28.46 (C_{14} e C_{15}), 42.84 (C_{13}), 45.87 (C_{12}), 74.82 (C_{17}), 101.62 (C_8), 105.47 (C_6), 108.93 (C_3), 123.57 (C_{20} e C_{22}), 126.00 (C_5), 128.09 (C_{19} e C_{23}), 142.03 (C_4), 146.33 (C_{18}), 146.81 (C_2), 147.29 (C_1), 150.54 (C_{21}), 165.72 (C_{10}).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pelos estudos de modelagem molecular, as etapas de síntese e caracterização dos intermediários dos derivados de éteres oxímico são descritos a seguir.

6.1 ESTUDOS COMPUTACIONAIS POR MODELAGEM MOLECULAR

A construção do modelo tridimensional por homologia estrutural para a proteína CRK3 foi baseada em estudos prévios já citados na literatura por PEREIRA (2013), enquanto a proteína rCPB2.8 baseou-se na busca por estruturas já resolvidas e que demonstraram melhor identidade e similaridade com a estrutura de interesse quando comparadas à outros estudos.

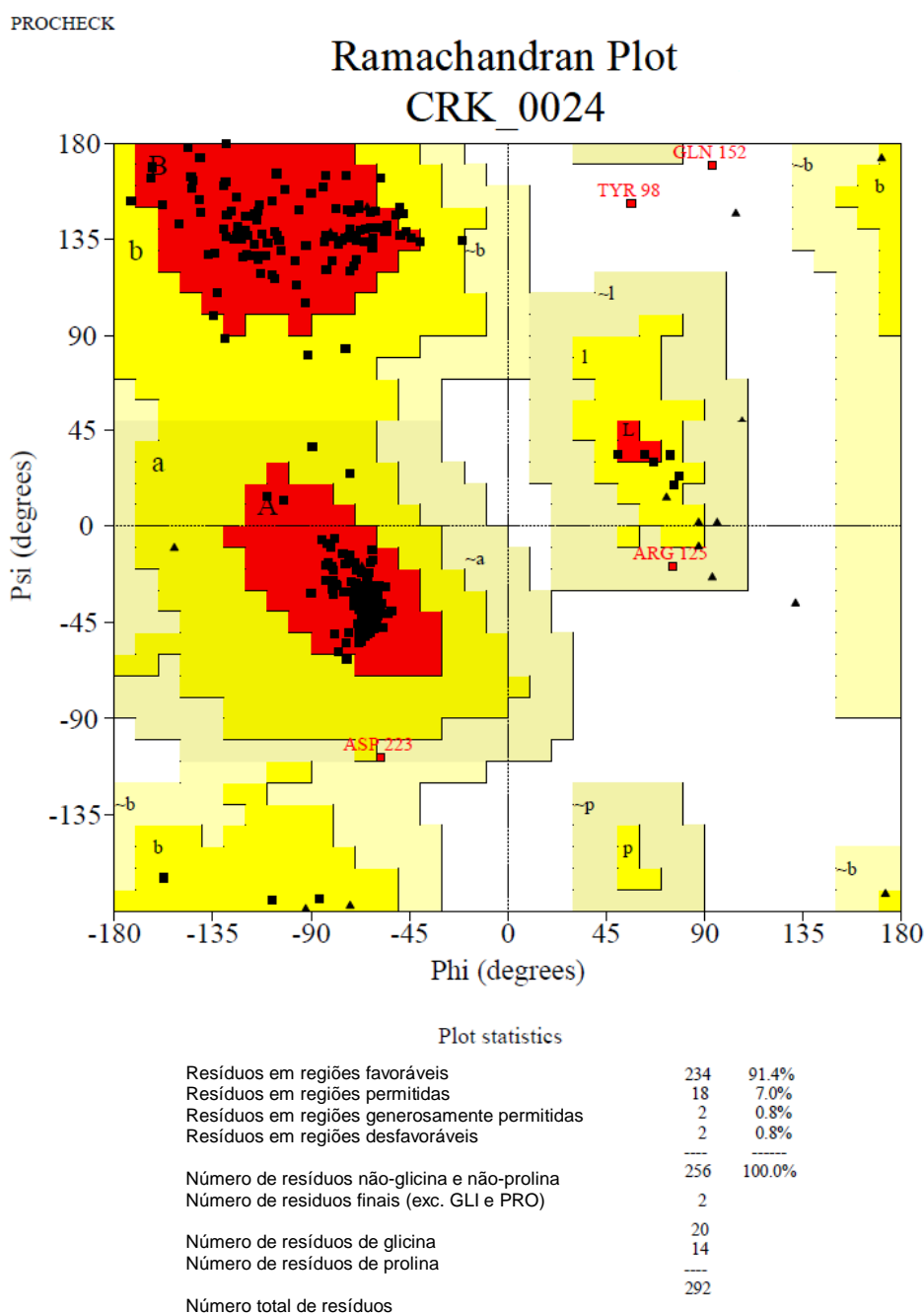
6.1.1 CRK3

A modelagem por homologia da proteína CRK3 foi realizada apenas para obter o molde para os estudos posteriores de *docking* molecular. Sendo assim, a fim de checar se havia sido feita com sucesso, foi gerado o gráfico de Ramachandran (FIGURA 21) para comparar com o estudo realizado por PEREIRA (2013) (FIGURA 22). Esse gráfico define os resíduos de aminoácidos da estrutura da proteína que se encontram nas regiões energeticamente favoráveis (vermelho), permitidas (amarelo), generosamente permitidas (bege) e desfavoráveis (branco), orientando na avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais da proteína modelada (FILHO; ALENCASTRO, 2003). Nesse caso, avaliando as propriedades estereoquímicas da cadeia principal, leva-se em conta que nem todos os ângulos na estrutura de um peptídeo são possíveis, devido a efeitos estéricos entre os resíduos dos aminoácidos, já que os átomos ocupam um determinado espaço e não devem ser colocados tão próximos devido a uma possível sobreposição de suas nuvens eletrônicas (PEREIRA *et al.*, 2013; FAIR, 2000).

Uma das formas de avaliação prediz que uma estrutura de excelente qualidade possui mais de 90% dos resíduos de aminoácidos localizados nas regiões mais favoráveis (MORRIS *et al.*, 1992). No gráfico do estudo de PEREIRA,

(2013) (FIGURA 22) a quantidade de resíduos favoráveis foi a mesma obtida no trabalho (FIGURA 21), ambas com resíduos acima de 91% nessa região.

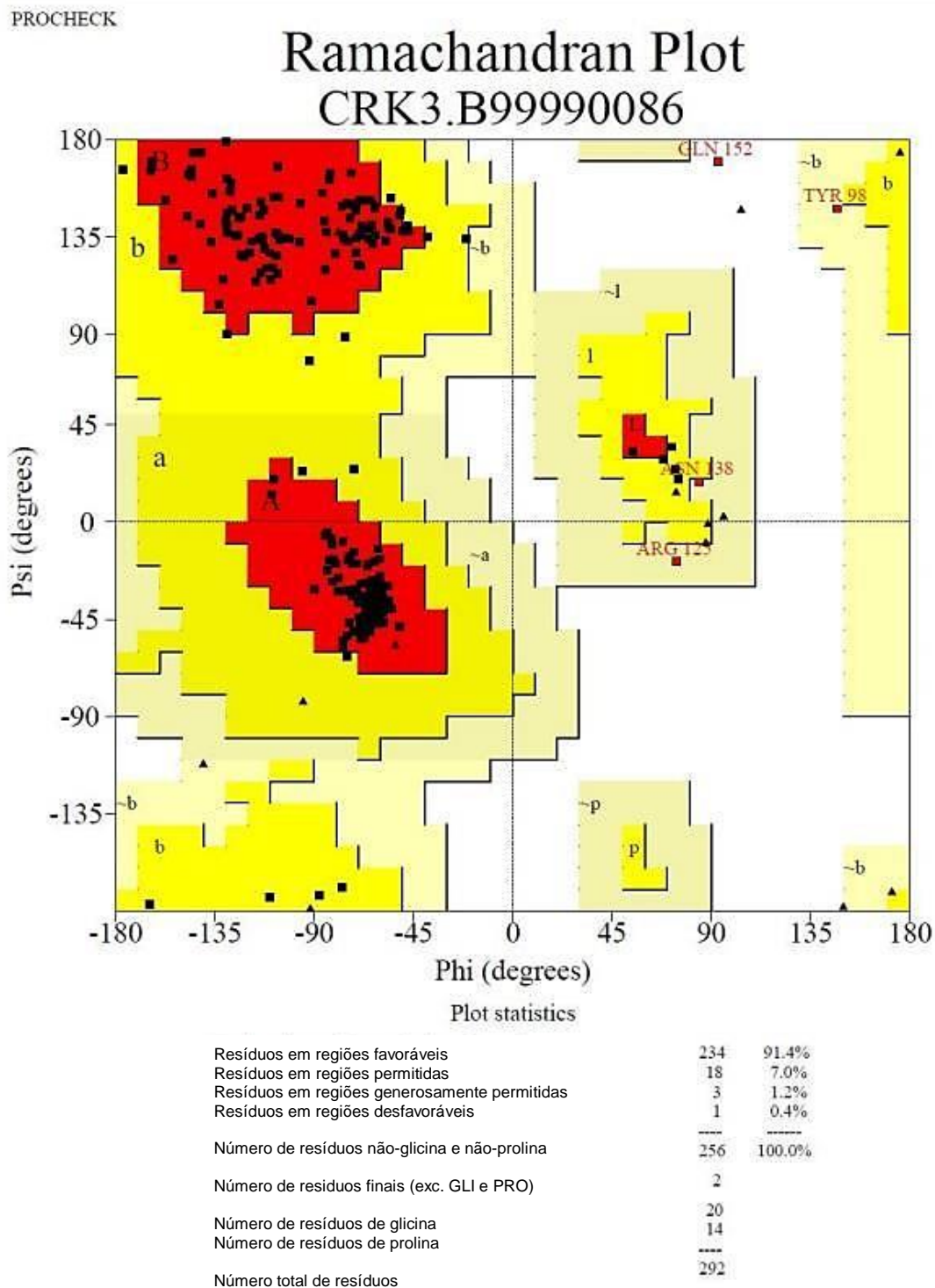
Figura 21 - Gráfico de Ramachandran obtido por Modelagem por Homologia conforme descrito por PEREIRA *et al.*, 2013.



Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Fonte: da autora.

Figura 22 - Gráfico de Ramachandran gerado por PEREIRA (2013).

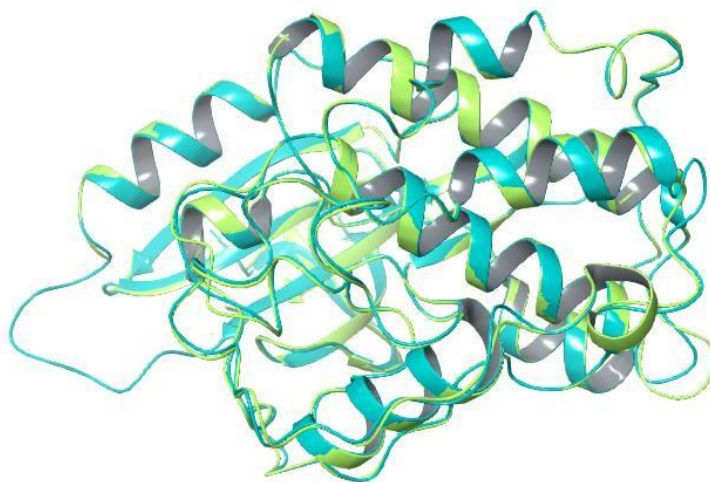


Fonte: PEREIRA (2013).

A escolha da realização da modelagem por homologia com apenas um template e segundo estudo já realizado se deu após diversas tentativas de

modelar a proteína com mais de um template e outros obtidos por meio do BLAST. Sendo assim, o melhor resultado foi por meio da escolha de apenas um template (PDB: 2R3I). Isso pode ser justificado pois com menos de 40% de identidade sequencial, os modelos construídos a partir de vários templates são mais precisos do que aqueles construídos usando apenas um, enquanto isso, a vantagem de usar vários templates desaparece gradualmente acima de 40% de identidade sequencial template/alvo (FISER, 2010). O cálculo do RMSD, que mede a distância média entre os átomos em comum das duas estruturas, também foi realizado, obtendo um resultado de 0,367 Å, aceitável para continuação do estudo (Figura 23). Quanto menor esse valor, mais em comum tem as estruturas analisadas.

Figura 23 - Sobreposição das estruturas 2R3I (verde) e sua proteína homóloga gerada (azul).



Fonte: da autora.

6.1.2 rCPB2.8

A busca por proteínas homólogas à estrutura primária da proteína cisteíno protease tipo B (rCPB2.8) iniciou-se com a busca por proteínas com um grau de identidade sequencial, obtido pelo alinhamento local de estruturas conhecidas tridimensionalmente, com o algoritmo PSI-BLAST (JOHNSON; ZARETSKAYA; MADDEN, 2008) e, com o auxílio do servidor online de modelagem estrutural de

proteínas *ModWeb* (*ModBase*) (PIEPER *et al.*, 2013).

Assim como a enzima CRK3, após diversos testes com os *templates* encontrados, com altos graus de identidade, similaridade e boa resolução, tanto com um ou mais *templates*, foram selecionadas duas estruturas cristalográficas (PDB: 3IUT e 3I06) presentes no banco de dados PDB. A escolha de ambas se deu a priori devido a seu alto grau de identidade com a proteína de interesse, levando em conta também a similaridade entre elas, além de um boa resolução, que corresponde a distância mínima dentro da qual dois átomos próximos podem ser distinguidos adequadamente, o ideal são estruturas com valores abaixo de 2,0 Å, que indicam uma melhor qualidade para modelagem (OLIVEIRA, 2018).

Ambas estruturas escolhidas já foram relatadas recentemente na literatura com a finalidade de modelar a estrutura de rCPB2.8, a 3I06 recentemente por FEY (2018) com 61,00 % de identidade e a estrutura com o código 3IUT por COELHO (2017) com 59,81%. As duas estruturas possuíam boa resolução, de 1,1 Å e 1,2 Å respectivamente, levando em conta que a resolução envolve a probabilidade de assinalamento correto das conformações das cadeias laterais e interações interatômicas, o parâmetro de escolha envolve proteínas com resoluções menores que 2,0 Å, acima disso a qualidade tende a cair (GUIDO; ANDRICOPOULO, 2008).

Para a construção da estrutura tridimensional por modelagem comparativa foi utilizado o *software* *MODELLER* versão 9.16 e, por meio dele foram construídos 100 modelos diferentes de estruturas, e a escolha por apenas um deles se deu pelo programa *PROCHECK*, por análise da estrutura com melhor qualidade estereoquímica, que possuía maior quantidade de resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis e permitidas e menor número de aminoácidos em regiões desfavoráveis no gráfico de Ramachandran (LASKOWSKI *et al.*, 1996) e levando também em conta o “Fator G” no qual valores abaixo de -0,5 são classificados como incomuns e valores abaixo -1,0 são classificados como altamente incomuns (LASKOWSKI; MACARTHU; MOSS, 1993) de forma que, quanto menor seu valor maior sua qualidade. Contudo, os valores principais dos dois melhores modelos obtidos se encontravam na faixa de -0.06 e -0.013, demonstrando boa qualidade estereoquímica dos mesmos.

O alinhamento global entre as sequências-alvo e os *templates* foram realizados pelo programa ClustalΩ (LARKIN; BLACKSHIELDS; BROWN, 2007),

para demonstrar o grau de similaridade entre as sequências (FIGURA 24) apresentando um valor de matriz percentual de identidade maior que 59%. Através dele é possível observar que elas dispõem de grande quantidade de regiões comuns compartilhadas (*), onde graus de identidade igual ou superior a 30% evidenciam grande probabilidade dessas proteínas apresentarem estruturas 3D semelhantes e a criação de um molde fiel para a proteína alvo (SANDER; SCHNEIDER, 1991).

Figura 24 - Alinhamento global de múltiplas sequências entre a sequência alvo e os *templates* de código PDB 3IUT e 3I06 realizados pelo programa Clustal Omega.

```

rCPB2.8      VPDVDWREKGAVT PVKDQGCAGSCWAFSAVGNIEGQWYLAGHELVSLSLSEQQLVSCDDMN
3IUT         APAAVDWRARGAVTAVKDDGGCGSCWAFSAIGNVECQWFLAGHPLTNLAEQMLVSCDKTD
3I06         APAAVDWRARGAVTAVKDDGGCGSCWAFSAIGNVECQWFLAGHPLTNLSEQMLVSCDKTD
..* ***** :***** ***** *****:*** * **:* ***** *..*:* ***** :

rCPB2.8      DGCDDGMLLQAFDWLLQNTINGHLHTEDSYPVVSGNGYVPECSNSSSELVVGAIIDGHVLI
3IUT         SGCSSGLMNNAFEWIVQENNGAVYTEDSYPYASGEGISPPCTTSG-HTVGATIIGHVELP
3I06         SGCSSGLMNNAFEWIVQENNGAVYTEDSYPYASGEGISPPCTTSG-HTVGATIIGHVELP
..*.* ***** :***:***:***:*** :*****:***: * *:. * . * * * * * * * :

rCPB2.8      SSEKAMAANLAKNGPIAIALDASSFMSYKSGVLTACIGKQLNHGVLLVGYDMTGEVPPYV
3IUT         QDEAQIAAWLAVNGPVAVAVDASSWMTYTGGMVTSVSEQLDHGVLLVGYNDGAAVPYWI
3I06         QDEAQIAAWLAVNGPVAVAVDASSWMTYTGGMVTSVSEQLDHGVLLVGYNDSAAVPYWI
..* :***** * *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:* : * * * * :

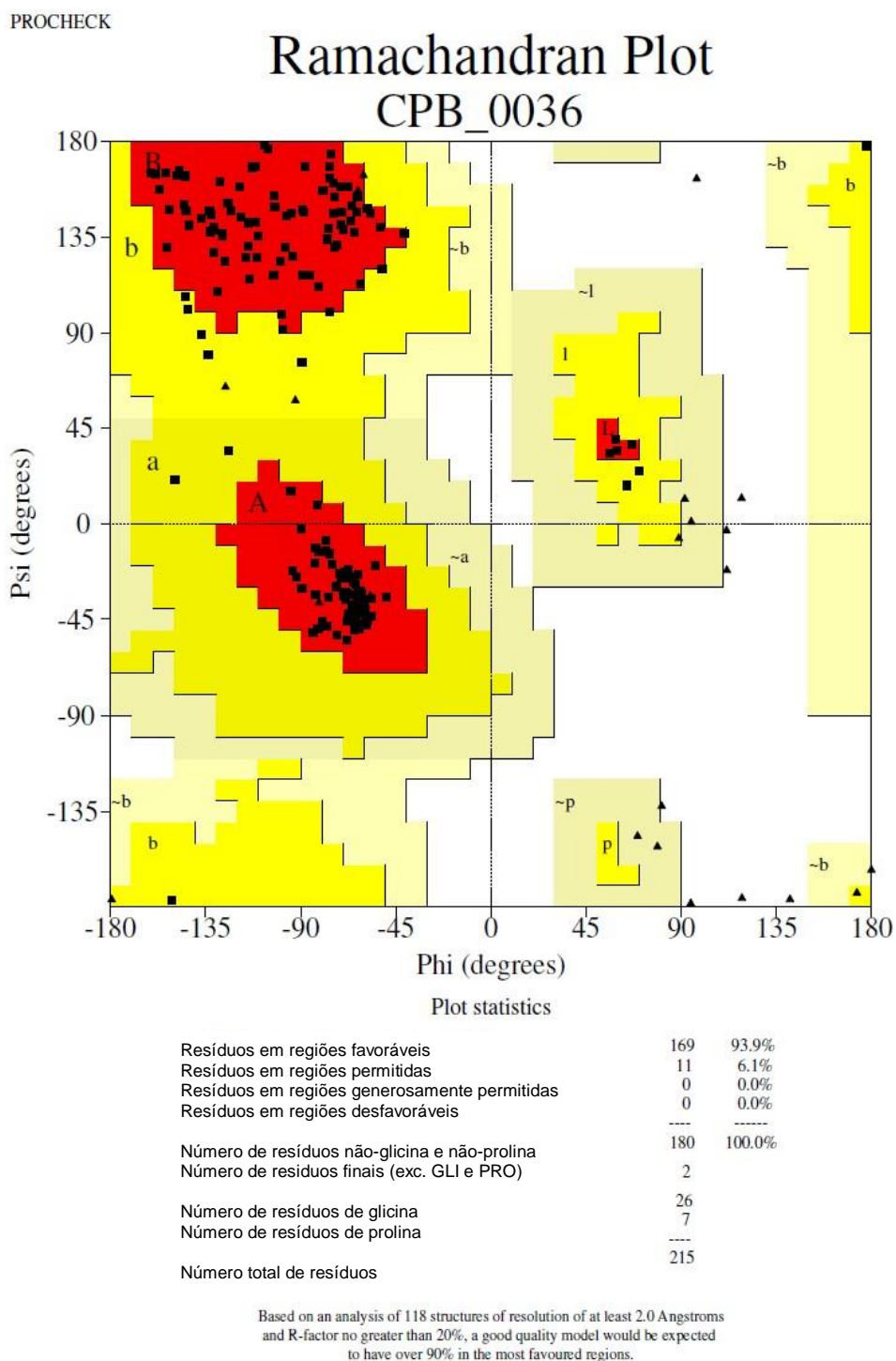
rCPB2.8      IKNSWGGDWGEQGYVRVVMGVNACLLSEYPVSAHVRES----
3IUT         IKNSWITQWGEEGYIRIAKGSNQCLVKEEASSAVVGHVHHHHH
3I06         IKNSWITQWGEEGYIRIAKGSNQCLVKEEASSAVV-----
***** :*****:***: * * * * * * * * * *

```

Fonte: da autora.

A validação da estrutura gerada de acordo com o gráfico de Ramachandran demonstrou 93,9% de seus resíduos nas regiões favoráveis, 6,1% em regiões permitidas e 0% em regiões desfavoráveis (FIGURA 25).

Figura 25 - Gráfico de Ramachandran da enzima rCPB2.8 gerado pelo programa PROCHECK.

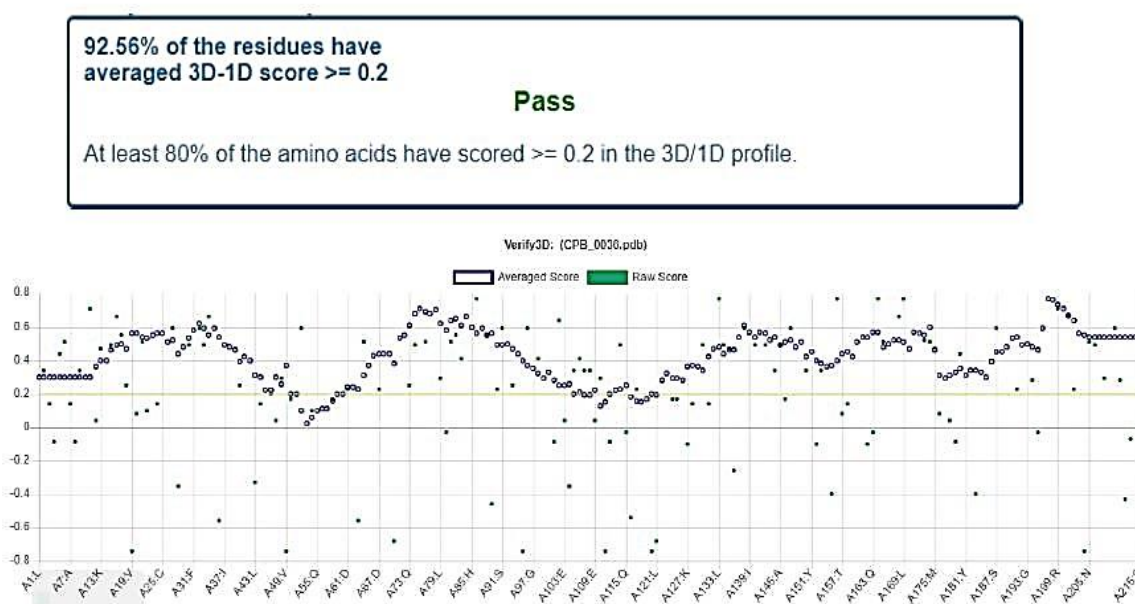


Fonte: da autora.

O *Verify3D* por sua vez, atribui uma classe estrutural com base na localização e ambiente de cada posição de resíduos de aminoácidos, comparando

os resultados obtidos com boas estruturas. Espera-se que a pontuação de modelo predito seja superior a 80% o qual indica boa resolução (KHOR; TYE; LIM, 2014). Os resultados provenientes do programa *Verify3D*, ilustrados na Figura 26, demonstra que a maioria dos valores obtidos se encontram dentro da faixa aceitável (0,16 e 0,80) e 92,56% dos resíduos possuem uma pontuação média 3D-1D maior que 0,2, um valor ao qual pode se adotar que o envelhecimento estrutural construído é confiável, além de ser maior que o valor descrito por COELHO (2017) de 88,13%.

Figura 26 - Perfil 3D da sequência de aminoácidos do modelo da enzima rCPB2.8 obtida pelo *Verify3D*.



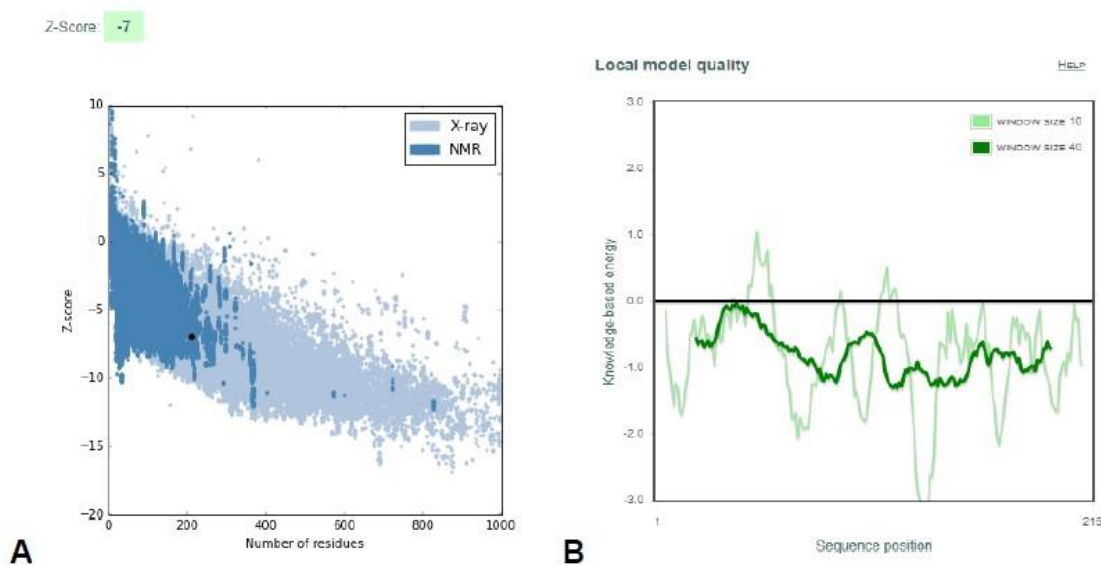
Fonte: da autora.

A pontuação *Z-score*, ilustrada na Figura 27A, indica a qualidade geral da estrutura em um gráfico que contém as pontuações de todas as cadeias proteicas determinadas experimentalmente (por raio-X ou RMN), no banco de dados PDB atual (em azul). Trata-se de uma comparação do modelo obtido por homologia com proteínas nativas de tamanhos semelhantes já resolvidas, baseado nas coordenadas dos átomos de Carbono alfa (C α) da estrutura gerada e avaliando o desvio de energia total da estrutura em relação a uma distribuição de energia de conformações aleatórias (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Pode-se verificar que o *Z-score* obtido para a estrutura da proteína cisteíno protease (-7,0) está dentro do

intervalo de pontuações encontradas tipicamente para proteínas nativas de tamanho similar (200 aminoácidos) depositadas no PDB.

A pontuação de energia “*knowledge-based energy*”, ilustrada na Figura 27B, mostra a qualidade representando as energias como uma função da posição da sequência de aminoácidos. A avaliação da energia de cada resíduo de aminoácido possui uma variação muito grande em um gráfico, dessa forma, nessa avaliação agrupa-se uma quantidade maior de resíduos da proteína e mede-se a energia média entre eles. Em verde escuro a linha no gráfico demonstra a média de energia por resíduo em um grupo de 40 aminoácidos, enquanto em verde claro, o grupo contém apenas 10 resíduos. É possível ver a diferença de flutuação da linha quando se diminui o tamanho da janela de aminoácidos. Em geral, valores positivos correspondem a partes problemáticas ou erradas da estrutura de entrada, levando-se em conta que valores de energia menores geram proteínas mais estáveis (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Aqui, a energia média a cada 40 resíduos, mostrado em verde escuro, demonstra valores de energia abaixo de 0, validando a estrutura tridimensional obtida neste parâmetro.

Figura 27 - Gráfico de Z-score e de energia gerados pelo software ProSA-web do modelo da enzima rCPB2.8 obtido por modelagem por homologia.

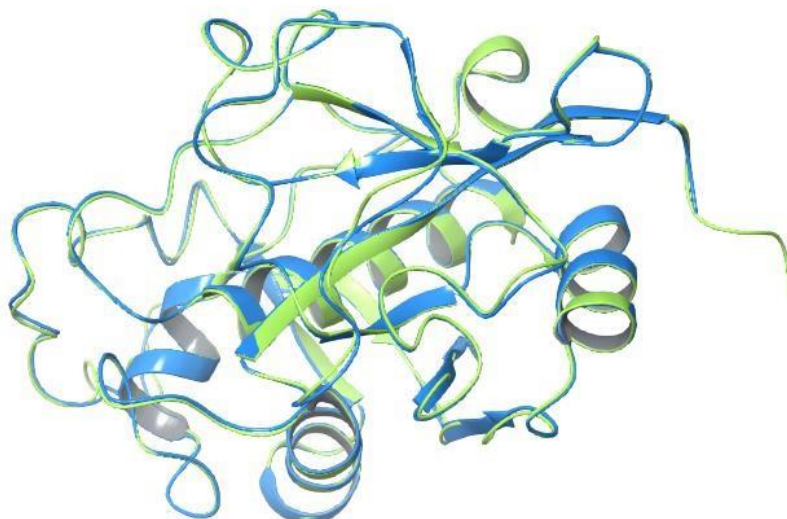


Fonte: da autora.

A comparação estrutural entre o modelo gerado com um de seus *templates* mostrou um RMSD de 0,328 Å. Como usual, nesse trabalho foi aceito como

metodologia validada, considerando que valores de RMSD $\leq 2,0$ Å são satisfatórios quando da comparação entre a estrutura co-cristalizada com a experimental (MORGON; COUTINHO, 2007).

Figura 28 - Sobreposição da proteína gerada por homologia (verde) e a proteína 3I06 (azul).

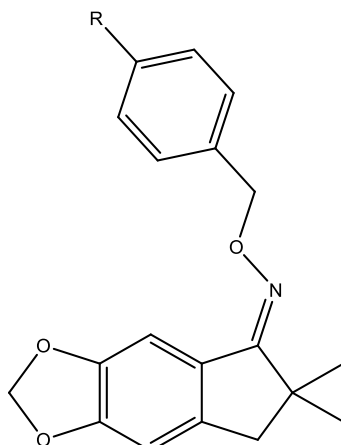


Fonte: da autora.

6.1.3 Análise dos ligantes

A avaliação das propriedades físico-químicas das moléculas da série proposta tem o objetivo de prever os processos farmacocinéticos envolvidos na administração destas pela via oral, estimando a solubilidade e a permeabilidade em membranas pela comparação de propriedades de fármacos já conhecidos. Por meio de um levantamento realizado com mais de 200.000 compostos do banco de dados ChEMBL, HANN e KESERÜ em 2012 constataram que compostos que apresentem $\text{LogP} < 4$ e massa molecular < 400 Da apresentam propriedades ADMET mais favorável de acordo com a regra de 4/400 de *GlaxoSmithKline* e a potência na escala micromolar é obtida em compostos que apresentem massa molecular > 250 Da e $\text{logP} > 2$. Esses valores também tem íntima relação com as regras de Lipinski, que parte de critérios semelhantes ($\text{PM} < 500$ Da; $\text{logP} < 5$, nº de doadores de Hidrogênio < 5 ; nº aceptores de Hidrogênio < 10) (LIPINSKI, 2004).

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas das moléculas estudadas.



MS-05 (a-h)

Molécula	Subst.	P.M (Da)	LogP (O/A)	Doador H	Aceptor H	Abs. Oral (%)
Pentamidina		340,429	2,595	2	4,00	63,0
Inibidor QI2 (rCPB2.8)		300,270	3,021	1	5,50	96,6
Inibidor SCF (CRK3)		319,340	4,177	1	4,00	100,0
MS-05a	OCH ₃	339,395	4,216	0	5,20	100,0
MS-05b	C(CH ₃) ₃	365,477	5,633	0	4,20	100,0
MS-05c	Br	388,269	4,981	0	4,20	100,0
MS-05d	F	327,359	4,438	0	4,20	100,0
MS-05e	CH ₃	323,395	4,719	0	4,20	100,0
MS-05f	CF ₃	377,367	5,175	0	4,20	100,0
MS-05g	Cl	343,813	4,897	0	4,20	100,0
MS-05h	NO ₂	354,366	4,127	0	4,20	100,0
MS-05i	H	309,368	4,233	0	4,20	100,0

Fonte: da autora

Subst. = substituinte; P.M = Peso Molecular; LogP (octanol/água); H = hidrogênio; Abs. Oral = Absorção oral

Nenhum dos ligantes analisados apresentou massa molecular > 400 Da, no entanto todos possuíram um $\log P > 4$, porém pouco acima em sua maioria. Apenas a molécula MS-05b [(C(CH₃)₃)₃] e MS-05f [CF₃] violou um dos parâmetros de Lipinski, que avalia através de propriedades moleculares a farmacocinética da molécula em questão. Essa violação foi com relação ao seu $\log P > 5$, no entanto a regra aceita apenas uma violação em algum dos parâmetros, sendo assim aceitável para o estudo, além de contarem com uma absorção oral experimental de 100%.

6.1.4 *Docking* Molecular

Com a finalidade de determinar a melhor orientação e conformação de um ligante no seu sítio receptor, estratégias de ancoramento (*docking*) molecular vem sendo desenvolvidas e empregadas no processo de planejamento e desenvolvimento de novos fármacos. Diversos fatores influenciam nas interações formadas entre ligante-receptor, dentre eles estão a flexibilidade do ligante e da proteína, a presença de cofatores que podem ou não fazer parte dessa interação entre o complexo, moléculas de água presente do meio, e outros (ALONSO; BLIZNYUK; GREARY, 2006).

Uma vez que as moléculas de água não estão envolvidas diretamente na estabilização do complexo elas não foram consideradas no processo de *docking* (DE LUCA *et al.*, 2018).

A ideia geral das técnicas de ancoramento é a de gerar um leque de conformações por meio de interações intermoleculares entre uma proteína alvo e ligantes, ordenando-os por meio de um score com base em suas estabilidades (TAYLOR; JEWsbury; ESSEX, 2002).

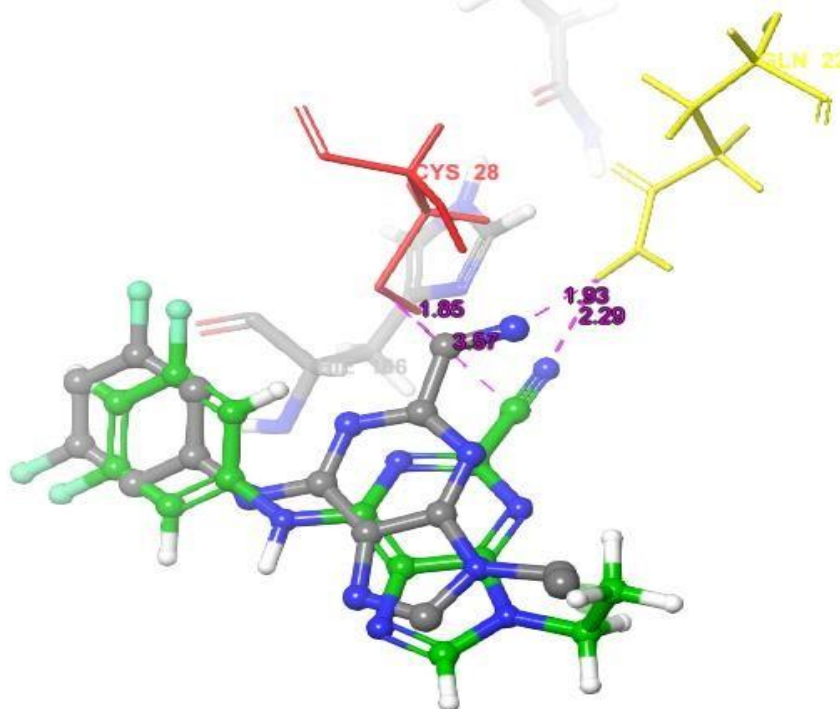
6.1.4.1 Validação do *docking* molecular

A fim de validar os resultados de *docking* obtidos, faz-se o *redocking* da estrutura cristalográfica gerada e o composto inibidor de seu *template*, a fim de reproduzir o modo de ligação proteína/inibidor. Para a validação dos protocolos de ancoramento molecular um valor de RMSD $\leq 2,0$ Å demonstra baixa distorção entre o composto inibidor ancorado aos resíduos de aminoácidos do sítio ativo

(CARUGO; PONGOR, 2001; YUSUF *et al.*, 2008). O reancoramento das enzimas estudadas apresentou resultados de RMSD satisfatórios, como é demonstrado a seguir, validando os métodos de ancoramento molecular utilizados.

Por meio do programa “*Superposition*” (Schrodinger), que alinha cada átomo do ligante inibidor (QL2) da proteína original obtida do PDB de código 3I06, usada como um dos moldes, com o ligante do *redocking* da proteína modelada rCPB2.8 de menor energia, o cálculo de RMSD após sobreposição de ambas foi de 1,111 Å. Além de um resultado < 2.0 Å conforme descrito anteriormente, a distância da ligação de hidrogênio formada pelo resíduo GLN22 que faz parte do sítio ativo da enzima não tiveram uma grande diferença, enquanto do resíduo e ligante originais do PDB foi de 1,93 Å o ligante do *redocking* foi de 2,29 Å. Ainda que a distância entre o resíduo de CYS28, parte da tríade catalítica do alvo, tenha uma diferença maior de 1,85 Å para 3,57 Å do *redocking*, com o átomo de carbono nitrogenado, esse valor demonstra que apesar da diferença ainda é possível a formação de uma ligação covalente (FEY *et al.*, 2018), como acontece com o inibidor cristalografado (FIGURA 29).

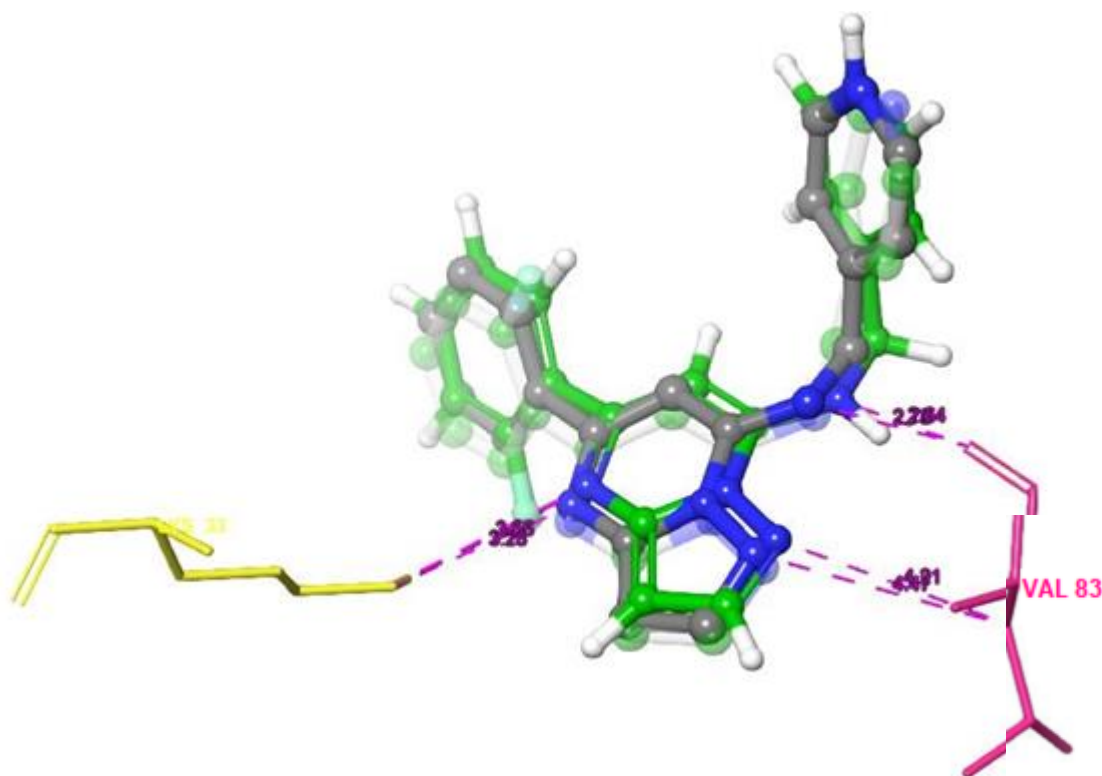
Figura 29 - Ligante da proteína 3IUT (QL2) em cinza sobreposta ao da proteína modelada do *redocking* (rCPB2.8) com o ligante em verde.



Fonte: da autora.

Os resultados obtidos com a proteína CRK3 também demonstraram eficácia quando validados. Ainda melhor que com a enzima rCPB2.8, com um RMSD de 0,435 Å entre os ligantes da proteína 2R3I e o *redocking* com a proteína molde, a diferença de distância das ligações com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima também foram muito próximas. As ligações de hidrogênio entre os resíduos de VAL83 e LYS33 tiveram diferenças entre 0,1 - 0,5 Å e se mantendo entre os resíduos e átomos conforme ocorre com o inibidor e a enzima original (FIGURA 30).

Figura 30 - Ligante da proteína 2R3I (SCF) em cinza sobreposta ao da proteína modelada do redocking (CRK3) com o ligante em verde.



Fonte: da autora.

Resultado semelhante foi obtido com a proteína CDC2 humana (2R3I) e o *redocking* a partir dela com um RMSD de 0,854 Å.

6.1.4.2 rCPB2.8

A partir dos resultados de energia de ligação obtidos pelo *docking*,

expressos por meio da Tabela 2 abaixo, a Pentamidina fármaco de segunda escolha e menos tóxico para tratamento da leishmaniose apresentou um valor melhor do que todos os ligantes, inclusive que o inibidor da cisteína protease da cruzaina.

Tabela 2 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (*GlideScore*), entre as moléculas da série proposta e a enzima rCPB2.8; o número de interações de hidrogênio e os resíduos que participam desta interação, boas interações de *van der Waals* e interações π -stacking.

Ligante	<i>GlideScore</i> (Kcal. mol ⁻¹)	L ligação H	aa	π st acking	aa	Interações boas de vdW
Pentamidina	-7,521	4	ASP21, ASP67, ASP191	0		206
MS-05g [Cl]	-6,515	0		2	TRP188, TRP192	242
MS-05c [Br]	-6,461	0		1	TRP192	261
Inibidor QL2	-6,422	1	GLN22	0		158
MS-05f [CF ₃]	-6,365	0		2	TRP188, TRP192	290
MS-05d [F]	-6,329	1	TRP188	0		232
MS-05a [OCH ₃]	-5,919	3	GLN22, GLY23, TRP192	1	TRP192	218
MS-05i [H]	-5,894	0		2	TRP188, TRP192	236
MS-05b [C(CH ₃) ₃]	-5,609	2	GLY23, TRP192	1	TRP192	227
MS-05h [NO ₂]	-5,440	1	GLY23	1	TRP192	191
MS-05e [CH ₃]	-5,200	0		1	TRP192	224

Fonte: da autora.

aa = aminoácidos; vdW = van der Waals; H = hidrogênio; Subst. = Substituinte

No entanto, os ligantes com dois substituintes eletronegativos Cl (**MS-05g**) e Br (**MS-05c**) apresentaram um valor de interação melhores que o do inibidor

QL2, com uma base purínica substituída por um anel ligado a dois átomos de flúor e uma nitrila, de um dos moldes utilizado (PDB: 3I06). Ainda que não tenham apresentado nenhuma ligação de hidrogênio com a enzima alvo, que caracteriza uma ligação forte, estes compostos se caracterizam por possuírem grupamentos retiradores de elétrons do anel aromático, possibilitando a interação π -stacking entre este anel aromático e o anel aromático rico em elétrons do TRP188 e TRP192. O TRP188 faz parte de um dos subsítios de interação com o substrato, próximo ao sítio ativo das cisteíno proteases denominado S1' juntamente com GLN22, resíduo este que apresentou ligação de hidrogênio com o inibidor. Junto disso, eles apresentaram um número maior de interações boas, seguido somente do composto **MS-05f** (-CF₃).

A maior parte dos compostos apresentaram interação π -stacking com o TRP188. COELHO (2017) em estudo obteve moléculas com atividade expressiva *in vitro* contra a *Leishmania*, e a mais alta delas possuía o mesmo tipo de interação, com o mesmo resíduo catalítico.

O composto (**MS-05a**) com uma metoxila como substituinte, apresentou um perfil de interação semelhante ao do inibidor com o resíduo de GLN22, aminoácido com cadeia lateral polar não carregado contendo um grupamento amida, que atua como um grupamento receptor de interação de hidrogênio e o nitrogênio do éter oxímico do ligante proposto bem como ocorre com o nitrogênio da nitrila do inibidor. Ainda que a enzima rCPB2.8 tenha uma alta afinidade por compostos de caráter básico, o único composto que permitiu a interação entre o nitrogênio do éter oxímico mais próximo desse perfil foi o **MS05a** (-OCH₃), com um valor médio de energia entre os demais.

Um inibidor covalente bem-sucedido de proteases de cisteína em sua forma pré-reativa deve primeiro ser capaz de se encaixar não covalentemente no local de ligação da enzima, a fim de trazer o centro eletrofílico para perto do átomo de enxofre de cisteína, resíduo da tríade catalítica. Interações de ligação não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, iônicas, van der Waals e processos de de-solvatação, são responsáveis e importantes pela correta ligação do ligante. A modelagem molecular aborda rotineiramente essas contribuições não covalentes à ligação ao ligante sem levar em consideração a contribuição da reação covalente (VICIK *et al.*, 2006).

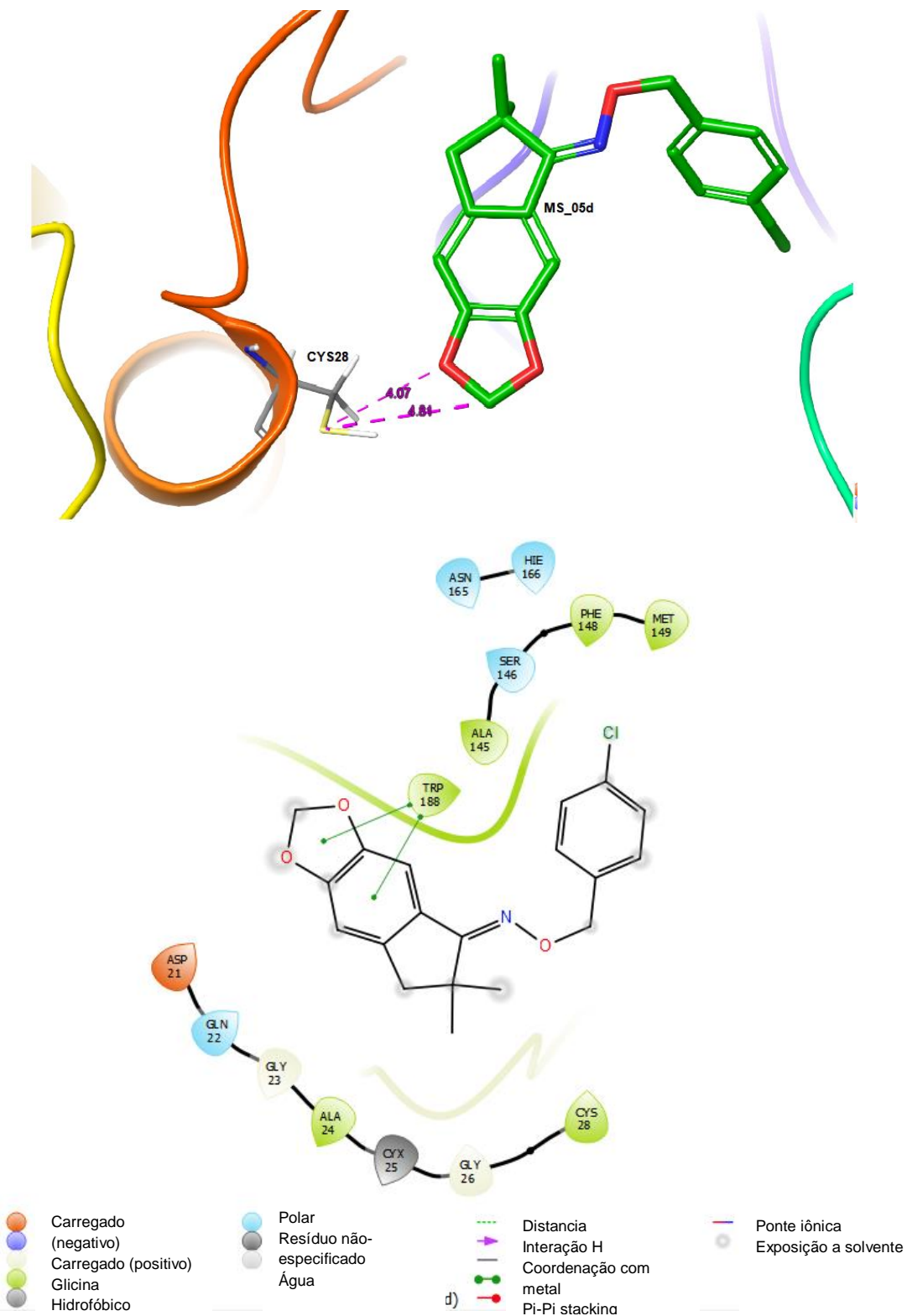
Em analogia com estudos anteriores (FEY *et al.*, 2018) no presente estudo

de acoplamento, foi determinado o potencial para uma possível formação de ligação covalente para a melhor pose de ligação dos três ligantes de maior valor de *GlideScore* e da Pentamidina medindo a distância entre o átomo de enxofre nucleofílico do resíduo de cisteína do sitio ativo e os átomos eletrofilicos do ligante e outros possíveis responsáveis por esse tipo de interação. Os modos de ligação previstos com uma distância menor que 5,00 Å foram interpretados como possível geometria inicial para uma formação de ligação covalente conforme descrito por FEY, et al. (2018). Além deles foi considerado também as interações de van der Waals boas entre o ligante e o resíduo.

Embora nenhum dos ligantes propostos tenham apresentado interação de hidrogênio, que se caracteriza por ser mais forte que as demais, e de nenhum outro tipo diretamente com a tríade catalítica da enzima (CYS, ASN, HIS) e, uma vez que o inibidor **QL2** apresenta uma ligação covalente entre o enxofre da CYS25 e seu carbono da nitrila, tais medidas foram comparadas a fim de prever se poderia ocorrer uma possível interação prevendo se os ligantes podem vir a expressar uma atividade nos posteriores testes de atividade leishmanicida.

O composto **MS-05h** (-Cl) apresentou uma distância de 4,07 Å entre o enxofre da cisteína e o átomo de oxigênio do grupamento metilenodioxil do safrol e 4,81 Å com o átomo de carbono do mesmo grupo, além de apresentar três tipos de boa interação de van der Waals entre esses átomos (FIGURA 31).

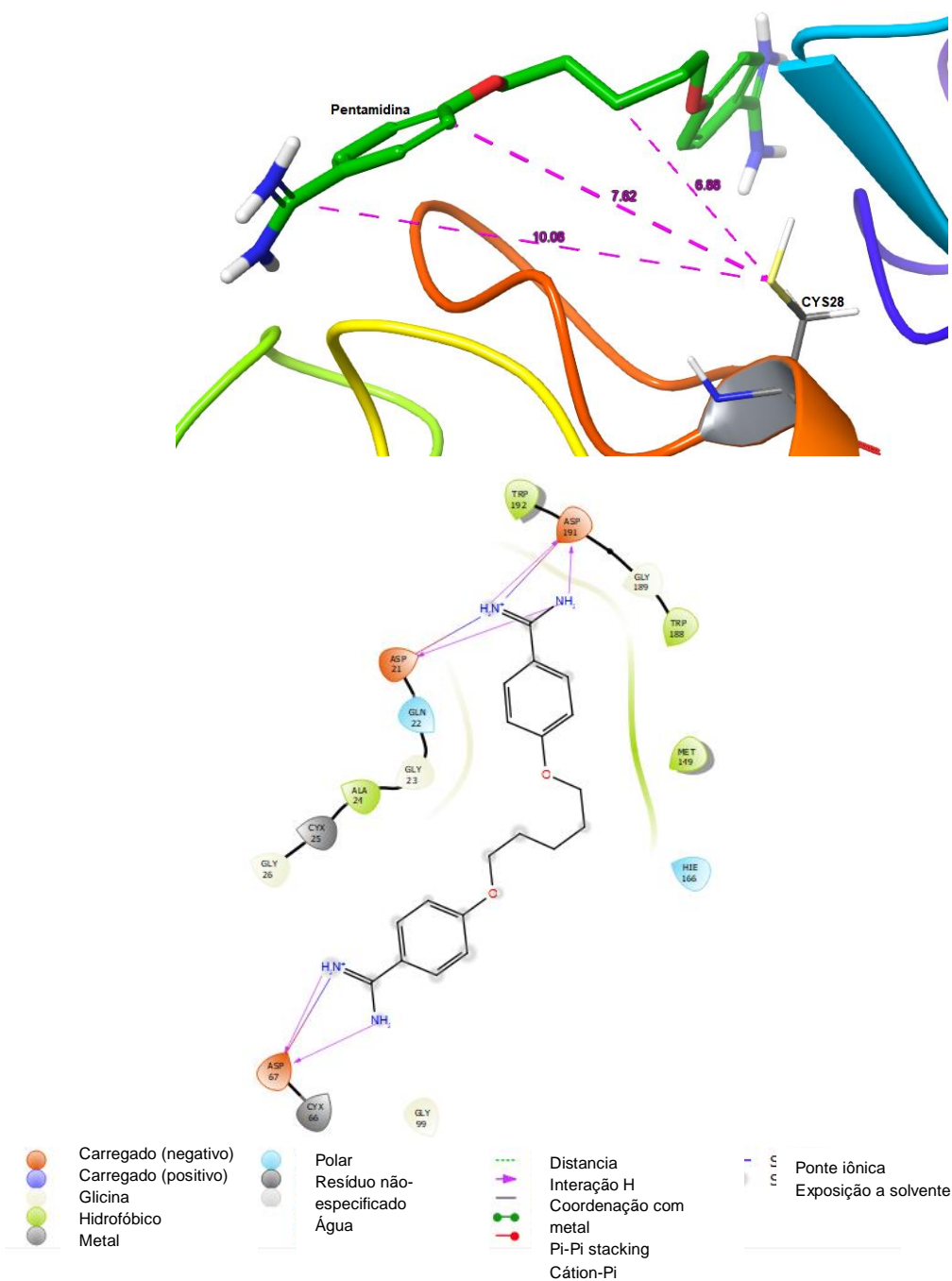
Figura 31 - Estrutura tridimensional representando as distâncias de interações possíveis de se tornar covalente entre o enxofre da CYS28 e os possíveis átomos mais próximos do ligante MS-05d de melhor valor de *GlideScore* e suas interações em 2D.



Fonte: da autora.

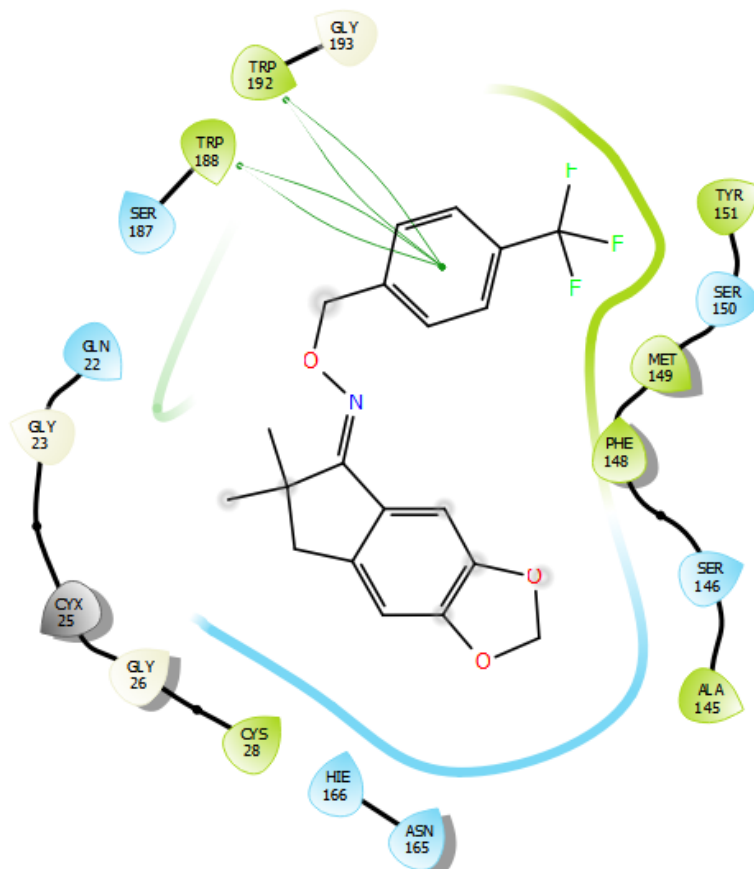
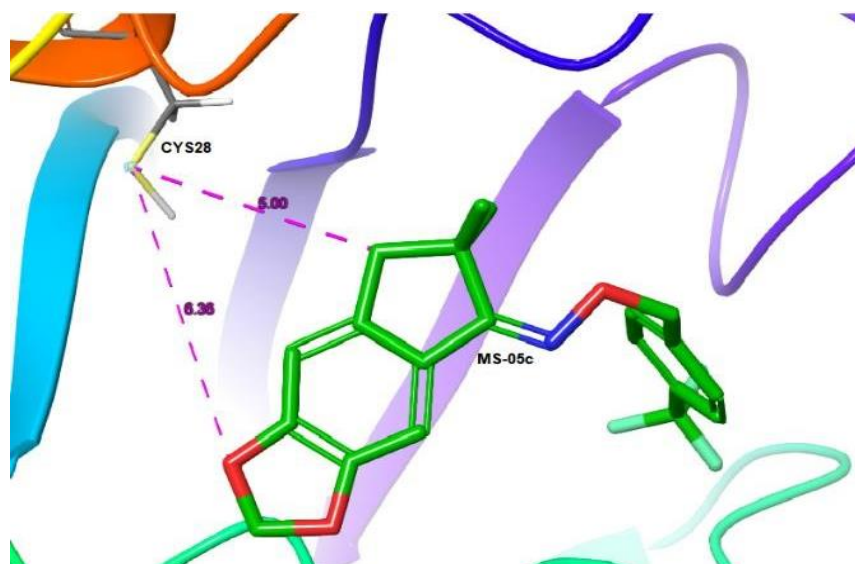
Já a **Pentamidina**, além de não apresentar nenhum tipo de interação boa de van der Waals manteve as distâncias entre o enxofre e seus átomos acima de 5,00 Å (FIGURA 32). O mesmo ocorreu com o composto **MS-05f** (-CF₃) (FIGURA 33).

Figura 32 - Estrutura tridimensional representando as distâncias de interações possíveis de se tornar covalente entre o enxofre da CYS28 e os possíveis átomos mais próximos do ligante Pentamidina de melhor valor de *GlideScore* e suas interações em 2D.



Fonte: da autora.

Figura 33 - Estrutura tridimensional representando as distâncias de interações possíveis de se tornar covalente entre o enxofre da CYS28 e os possíveis átomos mais próximos do ligante MS-05f de melhor valor de *GlideScore* e suas interações em 2D.

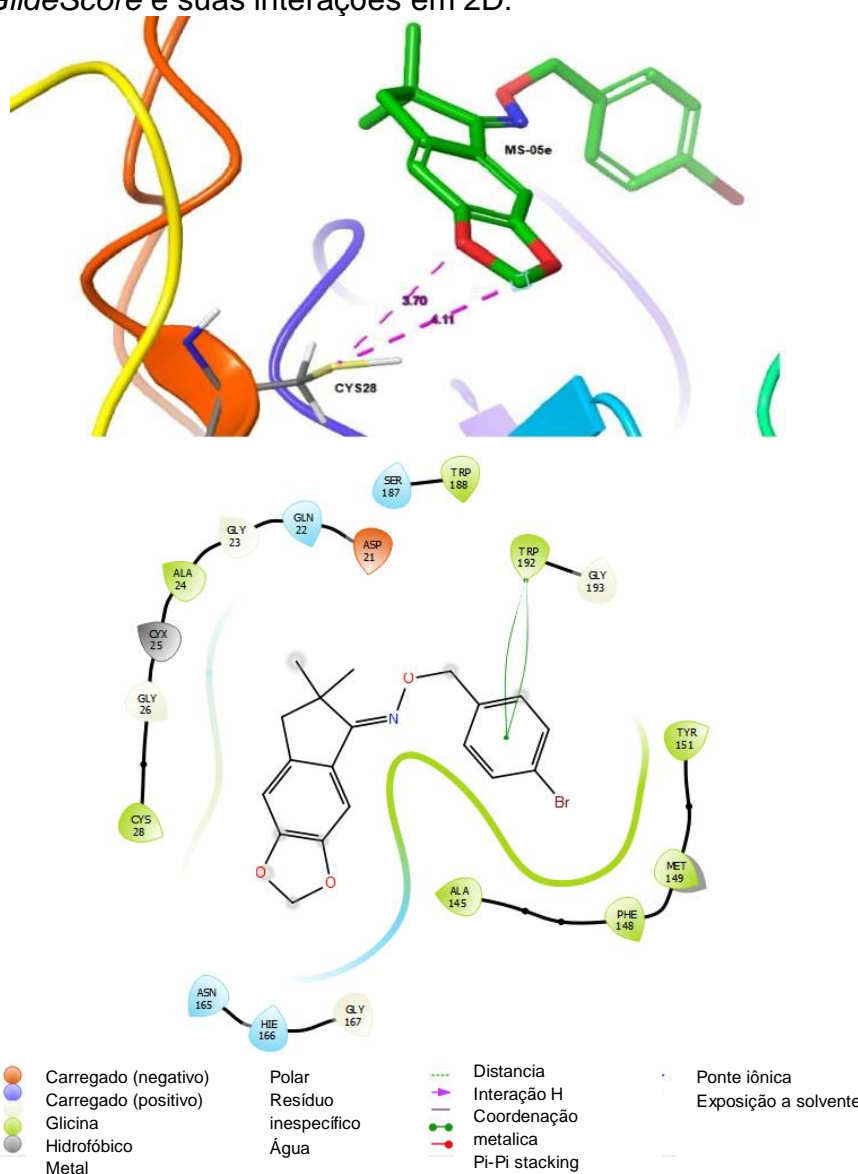


- | | | | |
|--|--|---|--|
| ● Carregado (negativo) | ● Polar | --- Distância | — Ponte iônica |
| ● Carregado (positivo) | ● Resíduo não-especificado | — Interação H | ○ Exposição a solvente |
| ● Glicina | ● Água | — Coordenação com metal | |
| ● Hidrofóbico | | ●—● Pi-Pi stacking | |
| ● Metal | | —● Cátion-Pi | |

Fonte: da autora

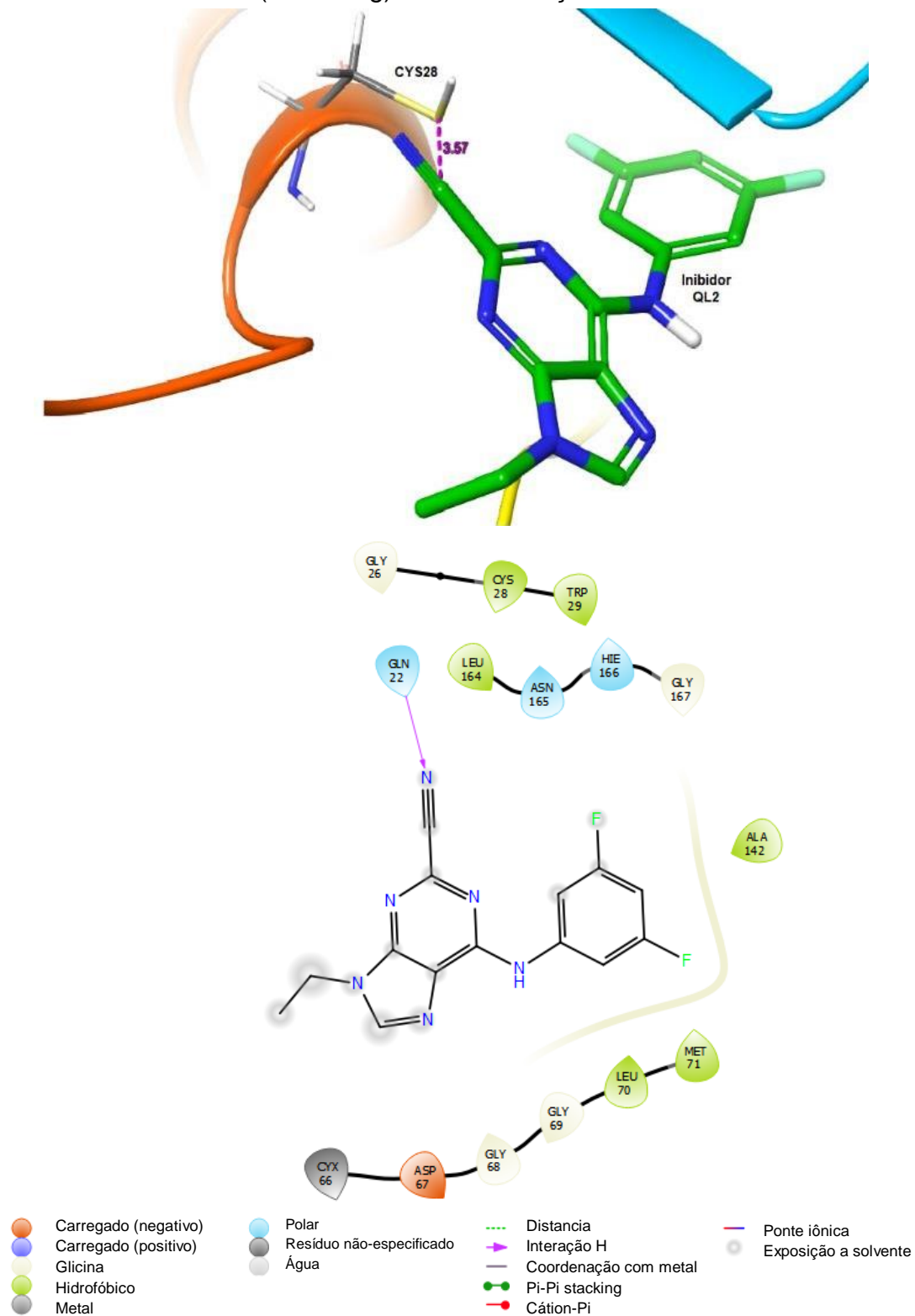
Já o ligante substituído com o Br (**MS-05c**) foi o que apresentou uma menor distância de ligação entre o enxofre e o oxigênio de seu anel com um valor de 3,70 Å e 4,11 Å com o carbono metilênico (FIGURA 34) além de ser responsável pelas cinco interações boas com o resíduo, distância essa muito próxima que a da ligação covalente realizada a partir do redocking do inibidor **QL2** (FIGURA 35).

Figura 34 - Estrutura tridimensional representando as distâncias de interações possíveis de se tornar covalente entre o enxofre da CYS28 e os possíveis átomos mais próximos do ligante MS-05c de melhor valor de *GlideScore* e suas interações em 2D.



Fonte: da autora.

Figura 35 - Estrutura tridimensional representando as distâncias das menores interações possíveis de se tornar covalente entre o enxofre da CYS28 e os possíveis átomos mais próximos do inibidor QL2 de melhor valor de *GlideScore* (redocking) e suas interações em 2D.



Fonte: da autora.

Quando comparadas com os resultados obtidos pelo estudo recente de FEY (2018) tais distâncias demonstram um valor mais promissor do que o obtido por ele, no qual, assim como COELHO (2017), também apresentou moléculas de aziridina com atividade inibitória satisfatória para a *Leishmania*. Já com base em resultados obtidos por DE LUCA (2018), a distância entre os resíduos e átomos eletronegativos da série de benzimidazóis está semelhante com os melhores resultados de IC₅₀ (uM) frente o parasito, com valores acerca de 0,4, 0,5 e 0,6 uM.

Os estudos de modelagem molecular ainda precisam se atrelar aos ensaios biológicos que devem ser realizados quando as substâncias estiverem sintetizadas. Mas a partir do resultado obtido é possível prever que os ligantes propostos tem sim alta capacidade de apresentar atividades expressivas frente ao parasito. Da análise dos resultados também se ve que a presença de um substituinte retirador de elétrons possuem um perfil de ligação melhor que os doadores.

Por outro lado, outro estudo de ancoramento possível de ser realizado é com base na descoberta de sítios alostéricos na enzima da rCPB2.8 por COELHO (2017), responsável pelo aumento da atividade enzimática da *Leishmania*, a fim de relacionar as substâncias a uma possível ligação no local, com a finalidade de se fazer uma análise mais completa sobre os éteres oxímicos propostos caracterizando suas interações.

6.1.4.3 CRK3 e CDC2 humana

O inibidor SFC conhecido por inibir a enzima CDC2 humana, presente na estrutura cristalográfica cocrystalizado com esta enzima (código PDB: 2R3I), foi estudado para avaliar sua afinidade com a enzima CRK3 de *Leishmania*, devido à similaridade entre as duas enzimas (Tabela 3). Da mesma forma, com o objetivo de se evitar efeitos adversos indesejáveis devido a possibilidade de existir baixa seletividade dos compostos propostos com a enzima alvo em relação à enzima humana, já que as enzimas CRK3 de *Leishmania* e CDC2 humana possuem aproximadamente 57% de identidade, buscou-se verificar a afinidade entre as moléculas propostas e a enzima humana por estudos de ancoramento molecular (Tabela 4).

Tabela 3 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (*GlideScore*), entre as moléculas da série proposta e a enzima CRK3, o número de interações de hidrogênio e os resíduos que participam desta interação, boas interações de *van der Waals* e interações π -stacking.

Ligante	<i>GlideScore</i> (Kcal.Mol ⁻¹)	Ligação H	aa	π stacking	aa	Interação boa de vdW
Inibidor SCF	-9,562	3	LYS33, VAL83	0		346
MS-05f [CF ₃]	-8,666	2	LYS33, VAL83	0		358
MS-05h [NO ₂]	-8,588	1	LYS33	1	PHE88	371
MS-05a [OCH ₃]	-8,517	2	LYS33, VAL83	0		413
MS-05d [F]	-8,355	1	LYS88	0		378
Pentamidina	-8,064	6	GLU12, VAL83, GLU84, ASP86, GLU161	0		324
MS-05c [Br]	-8,061	0		0		384
MS-05i [H]	-7,914	2	LYS128, ASN131	0		305
MS-05g [Cl]	-7,437	0		0		330
MS-05b [C(CH ₃) ₃]	-6,839	2	TYR82, LYS89	0		297
MS-05e [CH ₃]	-6,772	1	ASN131	0		244

Fonte: da autora.

aa = aminoácidos; vdW = van der Waals; H = hidrogênio

Com base nos resultados ilustrado na tabela acima, responsável pela enzima CRK3 observamos que a **Pentamidina** obteve um valor de *GlideScore* menor em comparação com alguns dos compostos analisados. Já o inibidor **SCF**,

foi a molécula que teve maior afinidade com a enzima em questão. Tanto na enzima CDC2 quanto na CRK3, o inibidor resolvido junto com ela, obteve um valor bem acima que o do fármaco.

Tabela 4 - Resultados do estudo de ancoramento molecular expressos em valores de energia de interação (*GlideScore*), entre as moléculas da série proposta e a enzima CDC2 humana, o número de interações de hidrogênio e os resíduos que participam desta interação, boas interações de van der Waals e interações π -stacking.

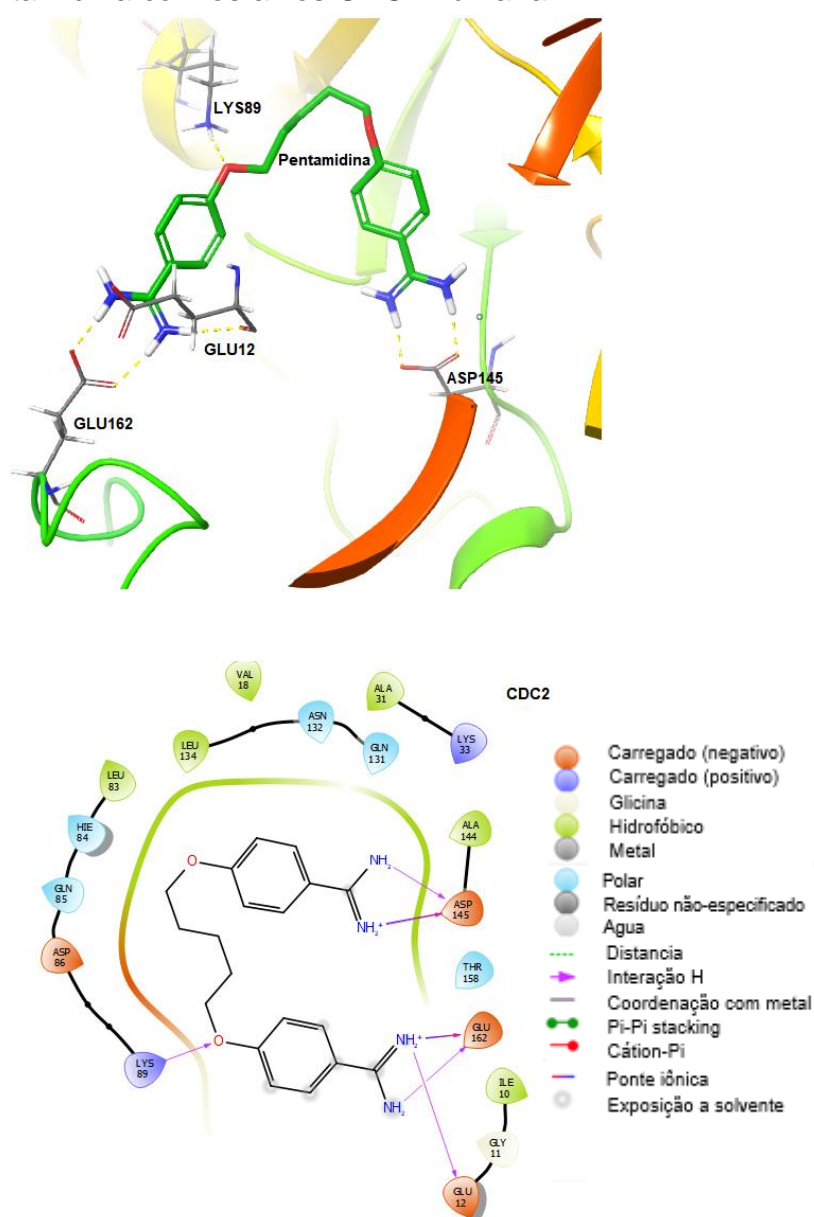
Ligante	<i>GlideScore</i> (Kcal.mol ⁻¹)	Ligação H	aa	π stacking	aa	Interação boa de vdW
Inibidor SCF	-10,376	3	GLU8, LEU83	0		307
MS-05i [H]	-9,469	1	LEU83	0		308
MS-05a [OCH ₃]	-8,533	0		1	PHE80	390
MS-05d [F]	-8,318	1	LEU83	0		332
MS-05e [Ch ₃]	-7,865	1	LYS89	1	PHE80	324
Pentamidina	-7,813	6	GLU12, LYS89, ASP145, GLU162	0		261
MS-05f [CF ₃]	-7,739	1	LYS89	0		323
MS-05g [Cl]	-7,203	0		0		302
MS-05c [Br]	-6,732	0		0		298
MS-05b [C(CH ₃) ₃]	-6,274	0		0		356
MS-05h [NO ₂]	-6,109	2	LYS129, ASN132	0		310

Fonte: da autora.

aa = aminoácidos; vdW = van der Waals; H = hidrogênio

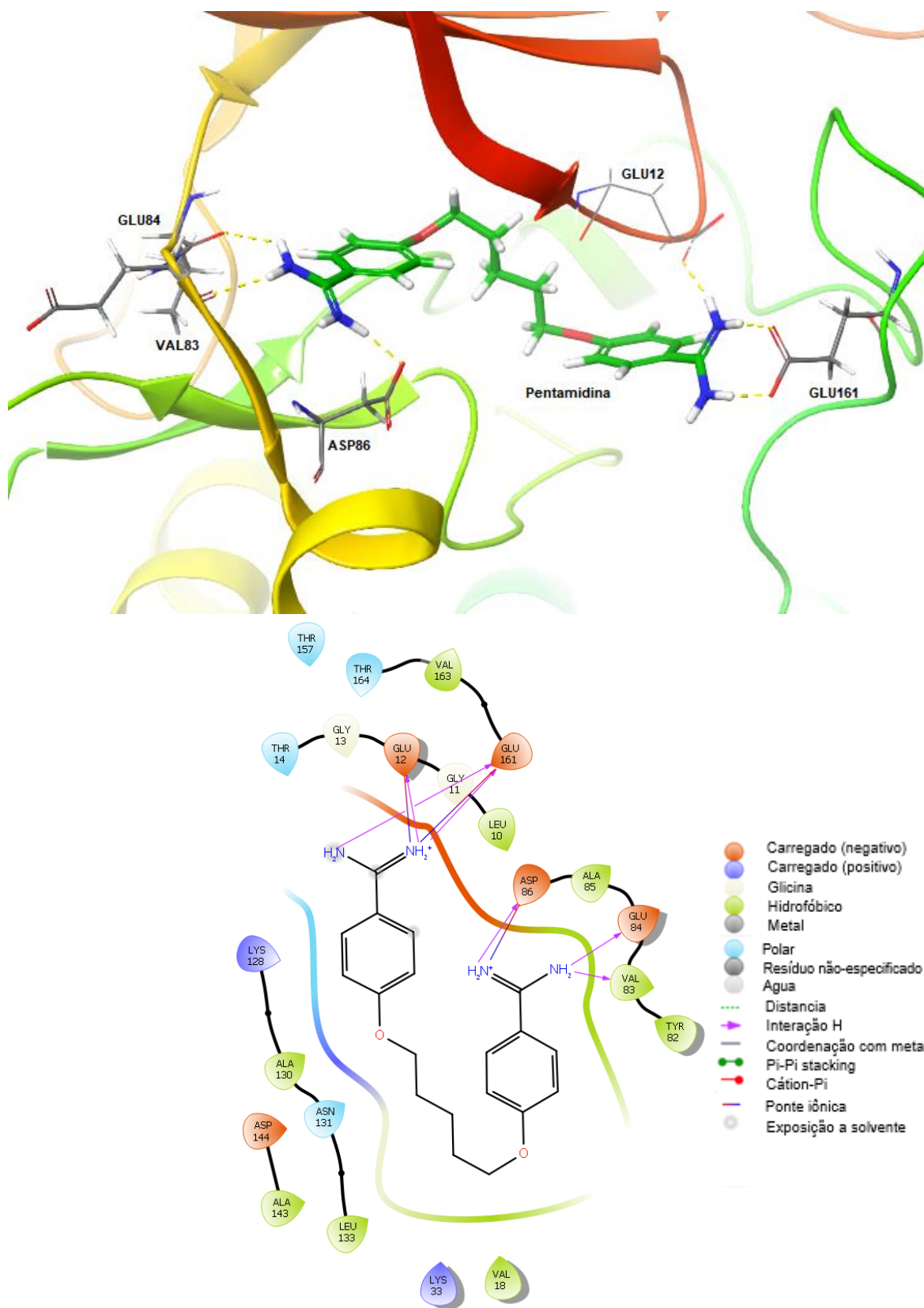
A Pentamidina por sua vez apresentou na molécula CRK3 interações fortes, de hidrogênio, com aminoácidos do sítio ativo (VAL83 e ASP86), diferente das interações apresentadas pela enzima humana, o que pode estabelecer uma seletividade maior pela enzima do protozoário, já que é um dos fármacos de segunda escolha utilizados atualmente. No entanto, ainda na enzima humana (CDC), o fármaco foi o que apresentou maior número de interações de hidrogênio entre aminoácidos, o que pode explicar sua alta toxicidade.

Figura 36 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes do fármaco Pentamidina com os alvos CDC2 humana.



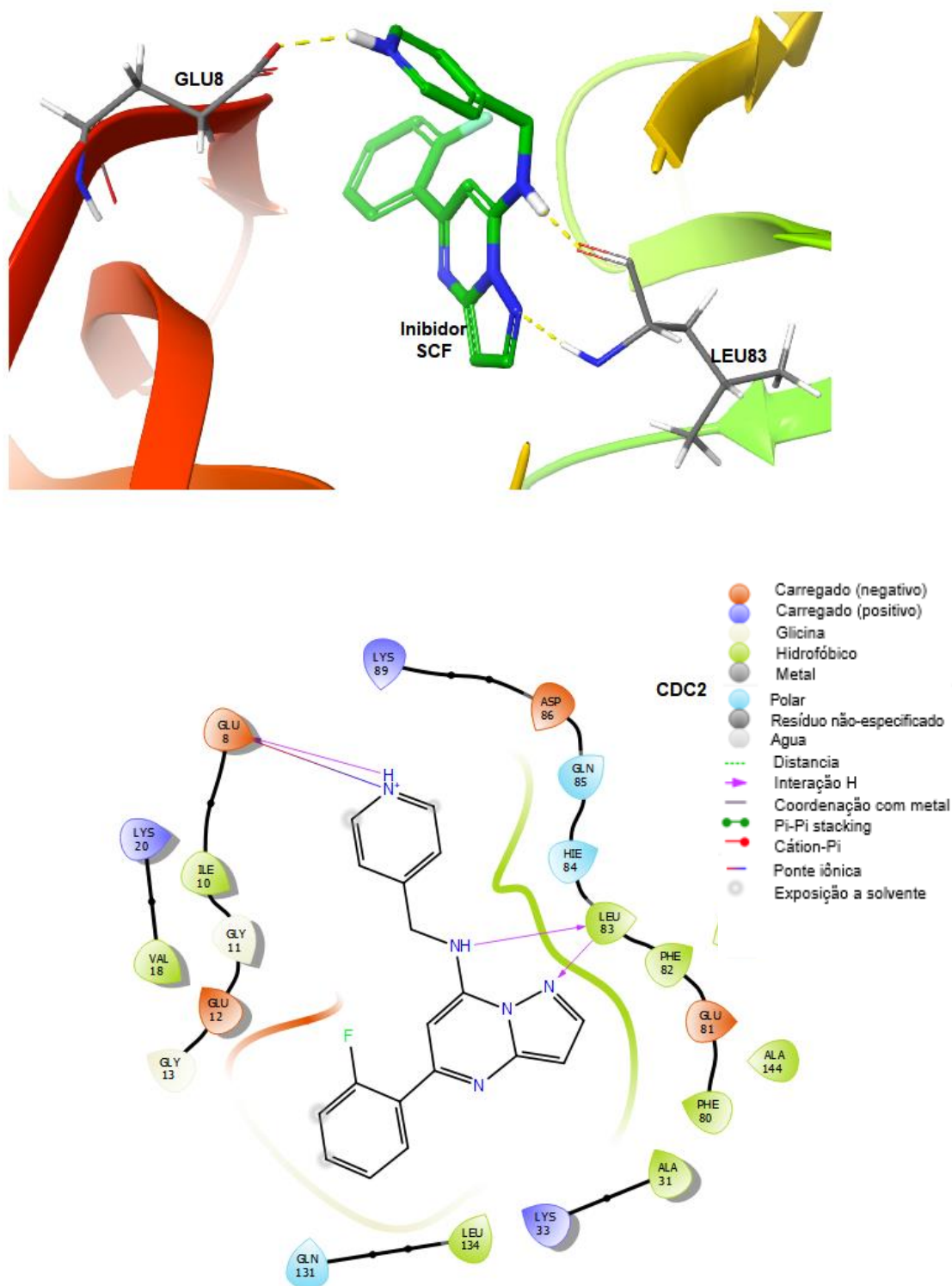
Fonte: da autora.

Figura 37 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes do fármaco Pentamidina com os alvos CRK3.



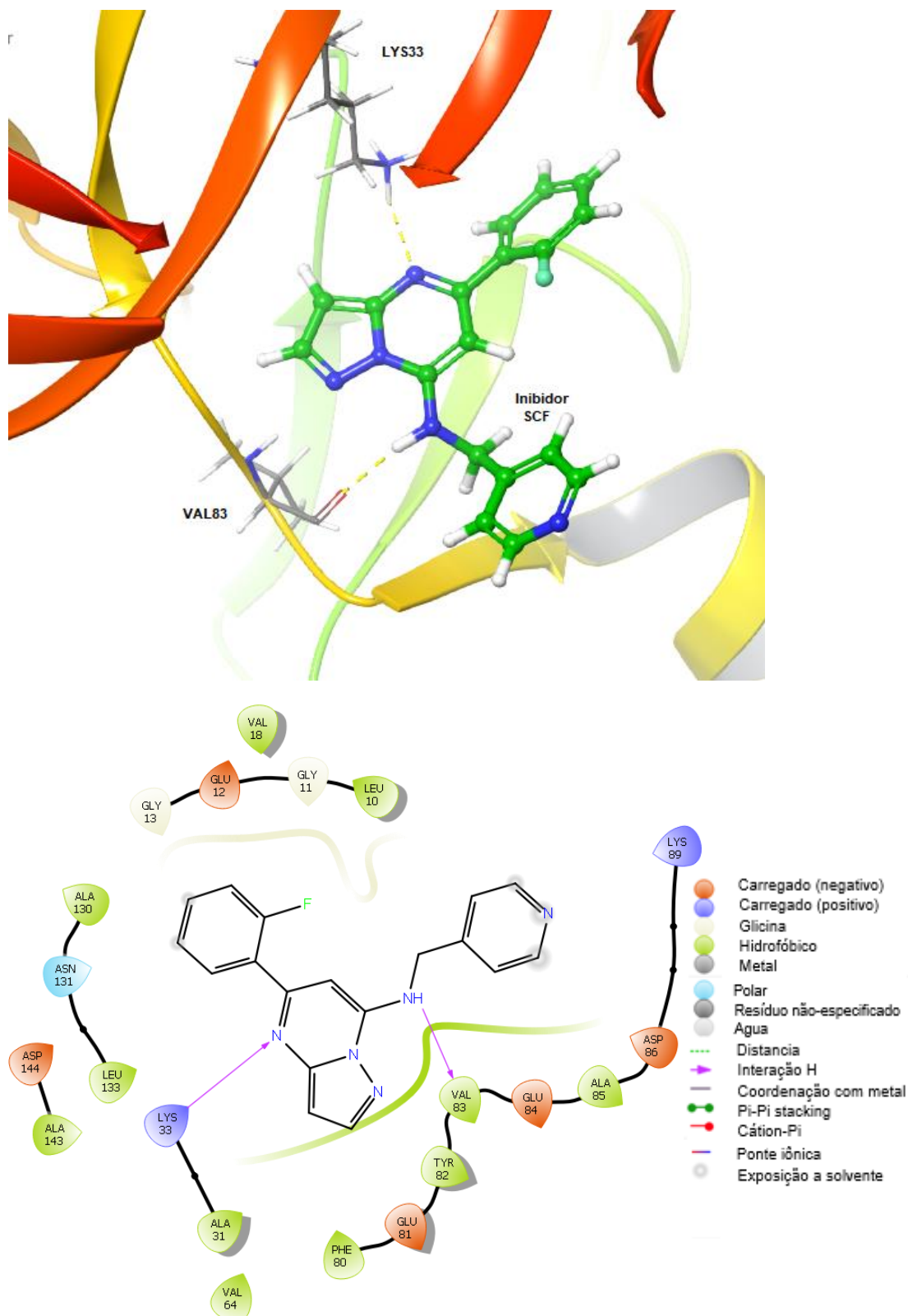
Fonte: da autora.

Figura 38 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes do inibidor SCF com os alvos CDC2 humana.



Fonte: da autora.

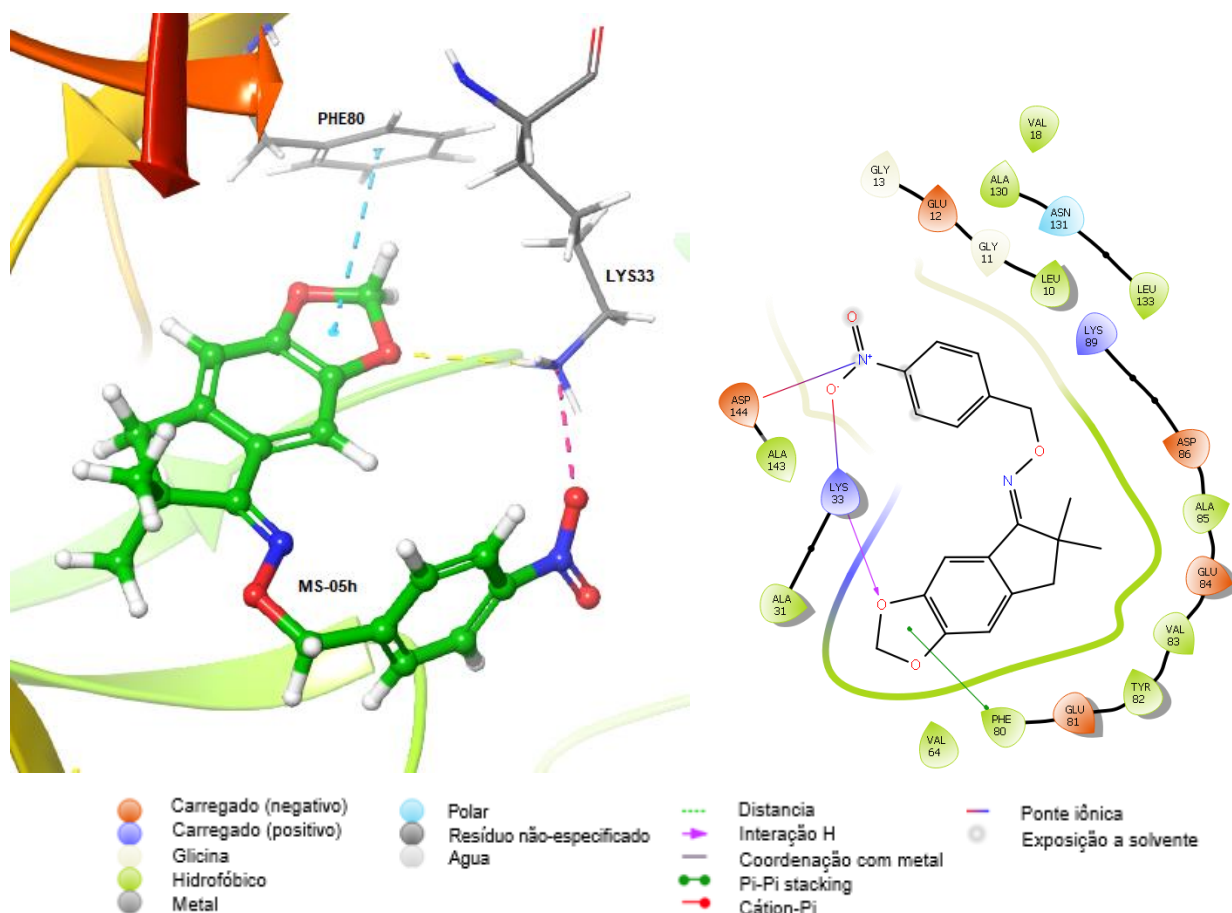
Figura 39 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes do inibidor SCF com os alvos CRK3.



Fonte: da autora.

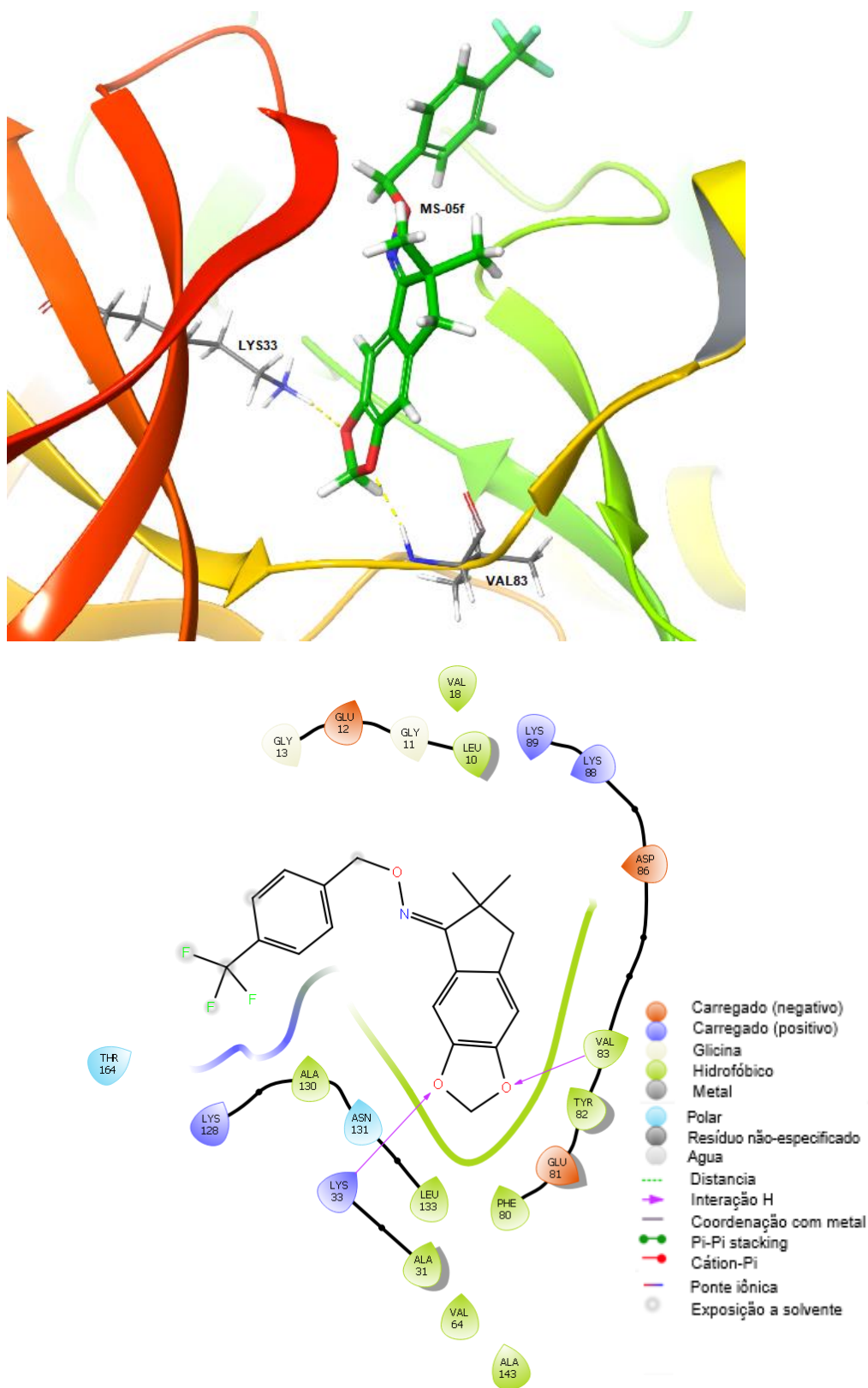
As três moléculas de maior valor de *GlideScore* na enzima da leishmania, foram **MS-05f** (-CF₃), **MS-05i** (-NO₂) e **MS-05a** (-OCH₃), todas apresentaram interação de hidrogênio com a LYS33, pertencente ao sítio ativo da proteína além de duas delas (**MS-05f** e **MS-05a**) apresentarem interação também com a VAL83, semelhante ao inibidor enzimático e, resíduo que corresponde à porção de *hinge* presente no sítio ativo de enzimas quinases dependentes de ciclina. Se comparados com a enzima humana, a molécula portando um grupo nitro como substituinte do éter oxímico, se trata do ligante mais promissor para a enzima protozoária, uma vez que na CDC2 foi a molécula que apresentou menor valor de *GlideScore*. Esse composto se caracteriza por possuir grupamento eletronegativo, retirador de elétrons do anel aromático, possibilitando a interação pi-stacking entre este anel aromático e o anel aromático rico em elétrons da PHE80.

Figura 40 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes da molécula MS-05i com o alvo CRK3.



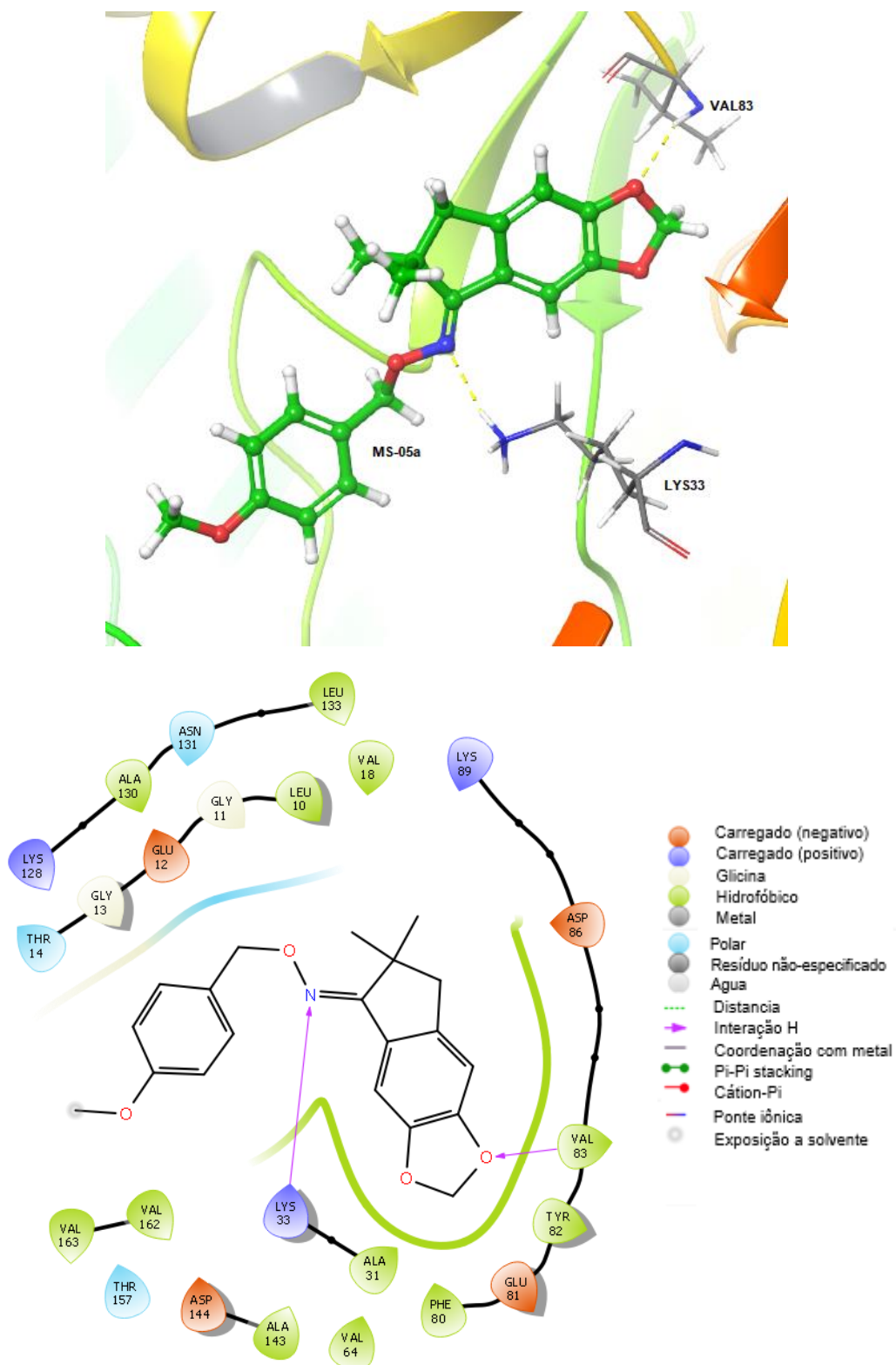
Fonte: da autora.

Figura 41 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes da molécula MS-05f com o alvo CRK3.



Fonte: da autora.

Figura 42 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes da molécula MS-05a com o alvo CRK3.



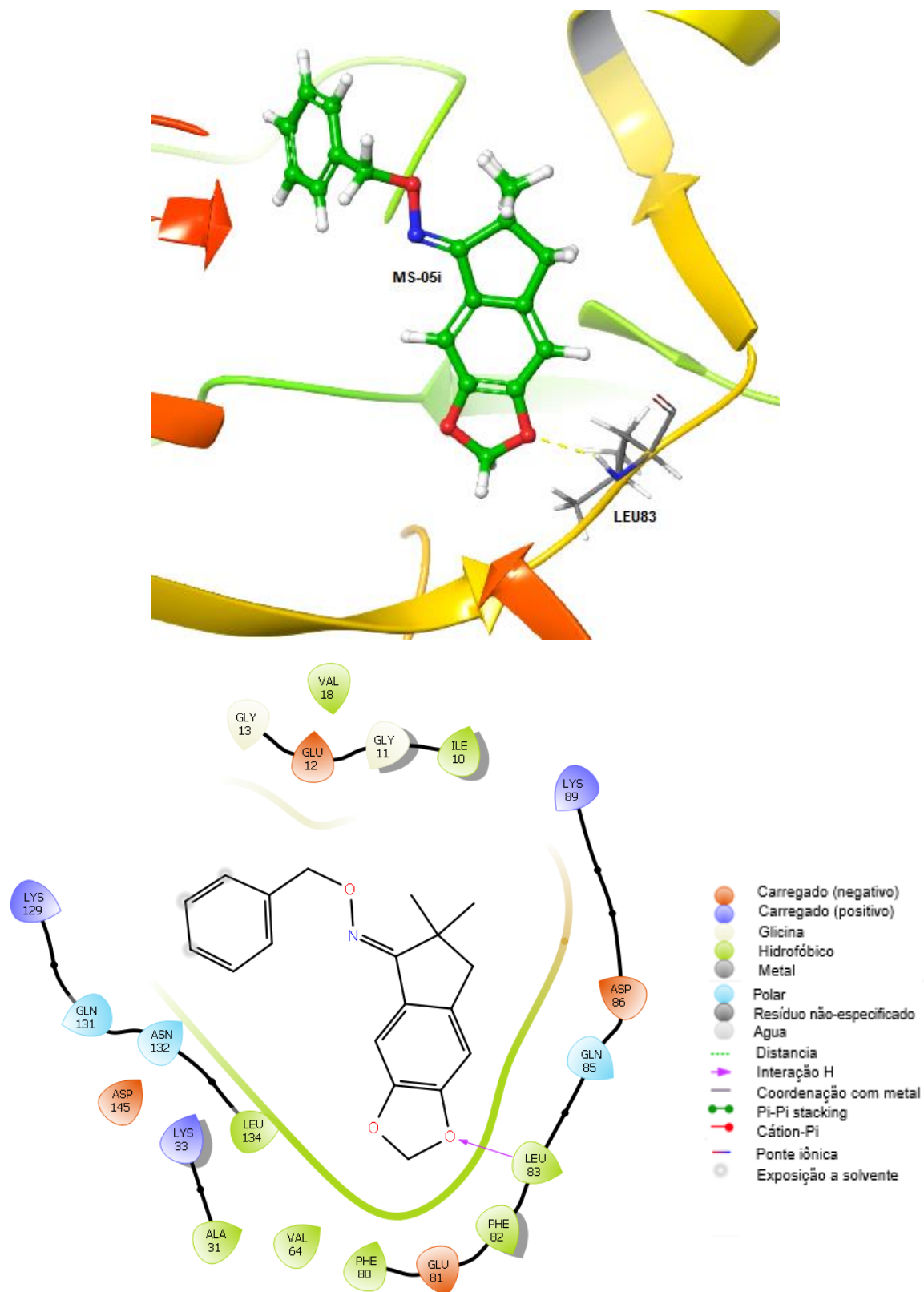
Fonte: da autora.

A molécula **MS-05a** (-OCH₃), ainda que com um valor de interação alto na CRK3, também apresentou alto valor na enzima humana e maior número de boas interações de van der Waals em ambas, o que demonstra que a busca por uma molécula específica para o parasito deve ser criteriosa. De acordo com os valores obtidos, a presença de grupamento volumoso doador de elétrons no anel aromático *para*-dissubstituído resultou na piora do perfil de interação entre a CRK3 e os compostos, conferindo às moléculas **MS-05b** [-C(CH₃)₃] e **MS-05e** (-CH₃) um menor valor de *GlideScore*, com exceção da **MS-05a** que portava a metoxila nessa posição.

A maior parte das interações entre os éteres oxímicos e a enzima CRK3 se deu principalmente no oxigênio da metilenodioxila e, no caso da molécula **MS-05a** (-OCH₃), com o nitrogênio oxímico, o que demonstra uma boa escolha do esqueleto da molécula, que pode proporcionar ligações de hidrogênio fortes.

As moléculas portando um flúor (**MS-05d**) e um hidrogênio (**MS-05i**), demonstraram interação de hidrogênio com a LEU83, aminoácido que na enzima da leishmania muda para VAL83 e, por apresentarem esse perfil de interação, não demonstram moléculas que possam ser seletivas nesse caso, uma vez que tanto a valina, quanto a leucina, se trata de aminoácidos apolares e de carga neutra. Vale ressaltar que a molécula substituída por um hidrogênio (**MS-05i**), que apresentou o menor valor de energia de ligação seguida apenas de seu inibidor na enzima humana, também pode ser uma alternativa a ser estudada, para outros fins, uma vez que a CDC tem um papel crucial na regulação da divisão celular e sua atividade anormal está intimamente relacionada com diversos tipos de cancer um inibidor seletivo da enzima humana pode ser uma proposta de um protótipo a fármaco quando se tratado da inibição dessas células anormais em casos de câncer e desregulação da mesma (GRANT *et al.*, 2004).

Figura 43 - Interações em 3D e 2D e seus respectivos aminoácidos participantes da molécula MS-05i com o alvo CDC2 humana.



Fonte: da autora.

A comparação entre as moléculas e estudos feitos até agora, nos traz uma boa expectativa sobre os ligantes, uma vez que foi possível obter sucesso na modelagem por homologia da enzima quando comparadas as cadeias de aminoácidos entre elas. CLEGHORN (2011) e PEREIRA (2013) relataram que as divergências nas cadeias laterais de aminoácido da CRK3 com a CDC2 humana se tratava da substituição de PHE82 e LEU83 com tirosina e valina na CRK3, GLN85 é substituído por alanina e HIS84 por glutamato (PRAJAPATI; PANDEY, 2017), o que ocorreu com a estrutura modelada, demonstrando que não houve divergências entre os modelos e um sucesso na homologia.

A partir dos resultados obtidos com os estudos da modelagem computacional, uma vez que foi verificado *in silico* um perfil de afinidade adequado das moléculas propostas para gerar um efeito biológico inibitório nas enzimas em questão, o planejamento e execução da rota sintética para obtenção dos produtos se deu a seguir. A fim de, futuramente, serem feitos estudos de atividade biológica para correlacionar os resultados obtidos na modelagem e testes de atividade *in vitro* e *in vivo*. Para isso, foi realizada a etapa sintética através da rota proposta com o objetivo de gerar os derivados oxímicos puros além de corroborar a proposta de uma rota simples, reproduzível e eficaz.

6.2 ETAPA SINTÉTICA

Os métodos de síntese e suas caracterizações são descritos a seguir.

6.2.1 Reação de Isomerização do Safrol (MS-01)

Reações de isomerização são abordadas na literatura a partir de diversas metodologias, em sua maioria tais reações utilizam como catalisador álcalis, como por exemplo o KOH, em soluções alcoólicas sob altas temperaturas, isso pois esta metodologia é comum para conversão de muitos alilbenzenos em seu isômero correspondente (CREMASCO; BRAGA, 2010). Em 2010, CREMASCO e BRAGA realizaram reação de isomerização diretamente com o óleo essencial de Pimenta longa, rico em safrol, com NaOH por pouco tempo de reação obtendo cerca de 97% de rendimento.

Outras metodologias já foram reportadas para a reação de isomerização,

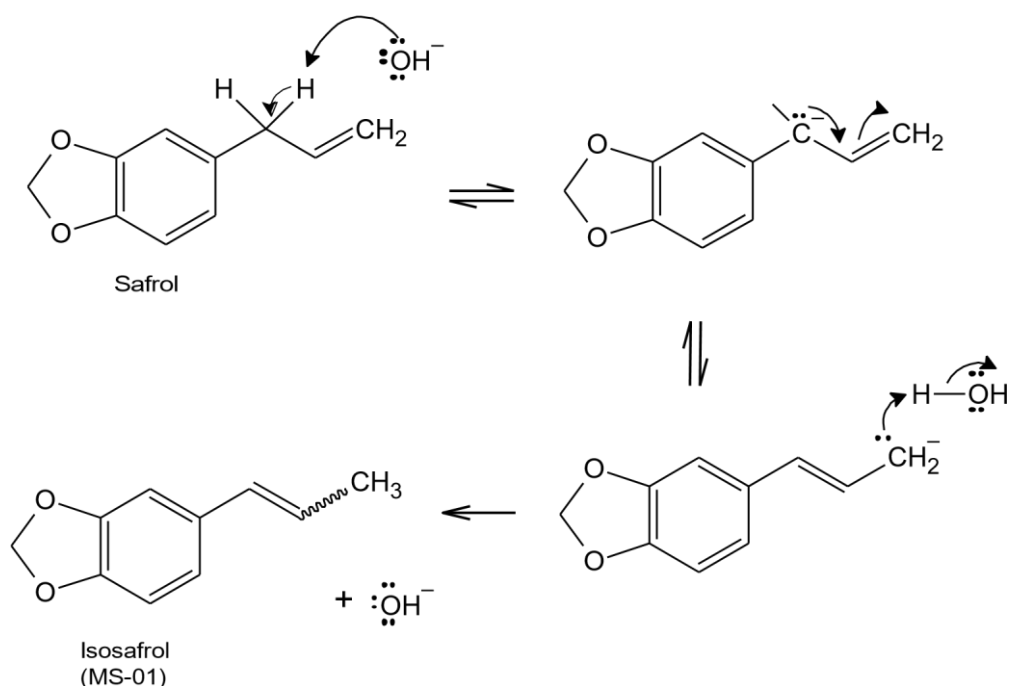
isso ocorre devido seu rico emprego como intermediário na síntese de compostos mais complexos. Um estudo de revisão recentemente publicado detalhou diversas reações e seus mecanismos gerais de isomerização de alilbenzenos, dentre elas reações mediadas por bases, metais de transição, hidreto de sódio, catalisada por Pd, na presença e ausência de solventes e em tempos variados de reação (HASSAM *et al.*, 2015).

No estudo que se segue, optou-se pela metodologia clássica descrita por KAISER; DOMBA; SKIBBE (1962) e utilizada posteriormente por BARREIRO; LIMA (1992), fazendo uso de KOH/*n*-BuOH (3M) sob refluxo que, além de barata e simples, não depende de muitas horas de duração e fornece bons rendimentos do produto desejado, levando também em conta a maior reatividade do potássio com relação ao sódio (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

O produto da isomerização da dupla ligação na cadeia lateral do anel aromático do safrol, 5-(*prop-1-en-1-il*)benzo[*d*][1,3]dioxola ou isosafrol (**MS-01**), se apresentou de forma termodinamicamente estável, após a purificação. O isolamento do produto foi necessário, visto que, no acompanhamento por CCD da reação que utiliza como catalisador o hidróxido de potássio (KOH) em *n*-butanol, houve a formação de um subproduto mais polar e ainda, o solvente empregado não é completamente removido em evaporador rotativo, como o ocorrido na metodologia baseada. O subproduto foi mandado para análise de RMN, mas mesmo assim não foi possível identificá-lo, tornando-o um empecilho para a obtenção de rendimentos maiores, acerca de 90% como relatado comumente na literatura. O rendimento máximo desta etapa, após purificação, foi de 77% na forma de um óleo amarelo.

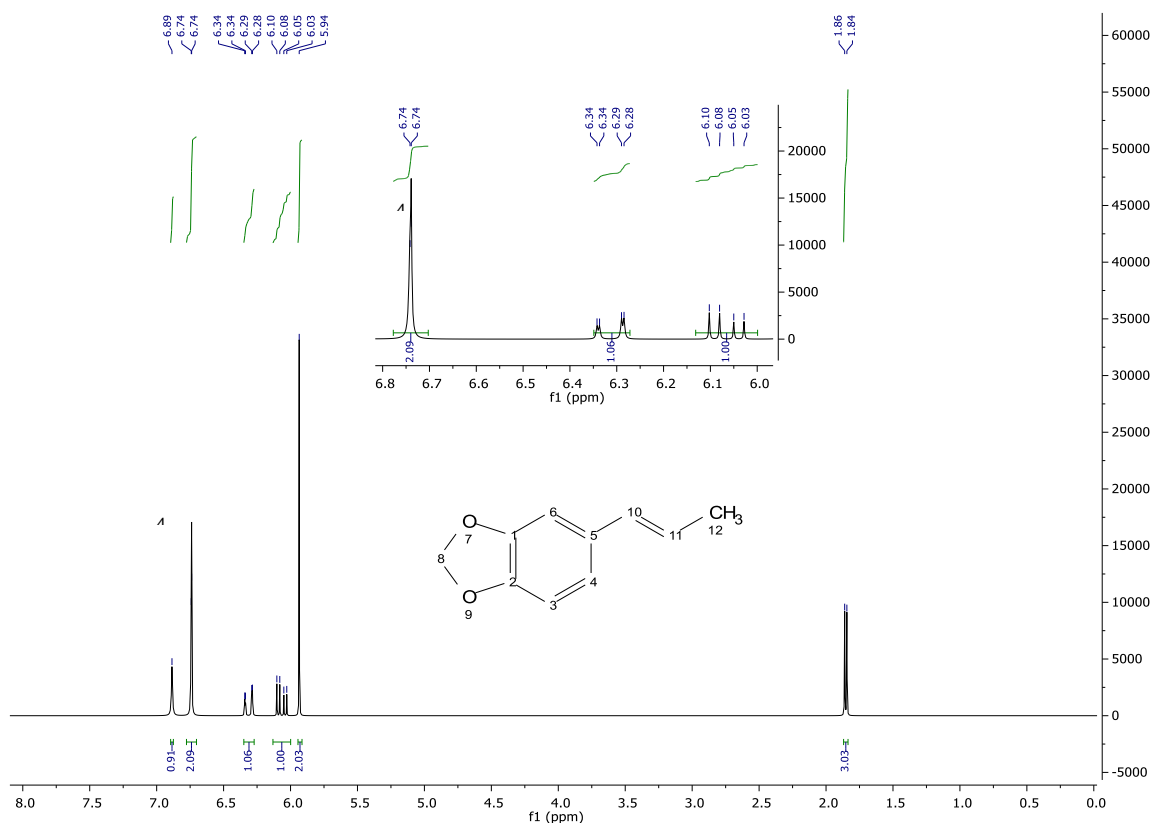
O mecanismo da reação de isomerização do safrol (FIGURA 44), inicia com a desprotonação do carbono vizinho à dupla ligação pelo hidróxido de potássio, que é uma base forte e, com isso, o carbono assume uma carga negativa. Esse carbono com carga negativa forma a dupla ligação com o carbono adjacente, no mesmo instante a carga se desloca para o metileno. Esse então, abstrai o próton de uma água e se estabiliza formando um grupamento metila. Como a base funciona como um catalisador da reação, a mesma é recuperada no final (LIMA, 1989).

Figura 44 - Proposta do Mecanismo de reação da isomerização do safrol.



Fonte: adaptado de LIMA (1989).

De acordo com o observado no espectro de RMN ^1H , a isomerização do alceno da molécula do safrol confirmou-se pela presença de um duplete em δ 1,85 ppm ($J = 6,43$ Hz) atribuído ao hidrogênio da metila terminal do isosafrol (H12). O simpleto em δ 5,94 ppm foi relacionado aos hidrogênios da metilenodioxila (H8), confirmando-se pela sua intensidade e deslocamento devido à ligação direta ao átomo bastante eletronegativo de oxigênio, e os simpletos em δ 6,89 e δ 6,74 ppm (H6, H3, H4) referente ao deslocamento químico dos três hidrogênios do anel aromático, mais próximos da faixa entre δ 6,00–7,00 ppm que, ainda que apareçam 1 simpleto e 1 duplete, respectivamente, demonstra uma possível sobreposição dos sinais dos hidrogênios aromáticos acoplados nas posições 3 e 4, apresentando uma constante de acoplamento 3J de 12,72 Hz. Em δ 6,07 ppm (H11) (dd, 1H, $J = 6,57$ Hz e 15,69 Hz) e δ 6,32 ppm (H10) (dd, 1H, $J = 15,66$ Hz) ocorreram sinais atribuídos aos hidrogênios vinílicos, confirmados pelas constantes de acoplamento, que confirma a ligação entre os hidrogênios da cadeia alílica e, por apresentarem constantes de acoplamento próximo de 15 Hz, indica que a molécula (MS-01) assume a conformação *trans* (PAVIA *et al.*, 2010).

Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H da substância MS-01 (CDCl_3 , 300 MHz).

Fonte: da autora.

No espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Espectro 2, Página 130), na presença de 10 carbonos diferentes na molécula, a formação do isosafrol se confirma principalmente pelo deslocamento químico em δ 18.40 ppm que evidencia a formação da metila ($-\text{CH}_3$) bastante desblindada e ausente na molécula de safrol, confirmada pelo espectro de RMN DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3) abaixo na mesma figura. O metileno ($-\text{CH}_2$), com seu sinal em δ 100.92 ppm, indica o carbono ligado aos dois oxigênios que apresenta menor deslocamento do que um metileno vicinal terminal. Além disso foi possível perceber a presença de três sinais com menor intensidade atribuídos aos átomos de carbono quaternário do anel aromático (com deslocamentos acima de δ 130.00 ppm) e o deslocamento químico em δ 123,94 e 130,54 ppm referente aos carbonos com hibridização sp^2 da dupla do isosafrol, confirmando o produto reacional cuja estrutura já encontra-se descrita na literatura (MOHOTTALAGE; TABACCHI; GUERIN, 2007). O auxílio de DEPT 135 nesse caso foi bastante importante, principalmente por demonstrar apenas um sinal de metileno.

6.2.2 Reação de Vilsmeier-Haack (MS-02)

Após a obtenção do isosafrol (MS-01) a etapa subsequente consiste na obtenção de um intermediário indanônico (MS-02).

A obtenção da indanona por meio do produto de partida safrol poderia ser uma hipótese, bastante atrativa, para obtenção do produto desejado. BARREIRO (1989) relatou a conversão da dupla ligação alílica em etilcarboxila com posterior ciclização por meio de quatro etapas, dentre elas a bastante conhecida acilação de Friedel-Crafts. No entanto a alternativa não parecia viável devido à grande quantidade de etapas e baixos rendimentos relatados. Anos depois, BARREIRO e LIMA, (1992) volta a descrever a obtenção da indanona, agora com o reagente de Vilsmeier-Haack, utilizada para a introdução de uma unidade aldeídica em sistemas aromáticos, por meio de uma reação de substituição eletrofílica aromática, que se mostrou mais acessiva no estudo atual.

A obtenção da *6-metil-6,7-dihidro-5h-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-ona (MS02)*, ocorre por meio da formação de uma ciclopentanona substituída com uma metila, a partir de dimetilformamida (DMF) e oxiclreto de fósforo (POCl_3), subsequente a uma etapa de ciclização. O produto da reação, também precisou passar por purificação, devido a formação de subprodutos. O rendimento máximo desta etapa, puro, foi de cerca de 60%, como um sólido alaranjado.

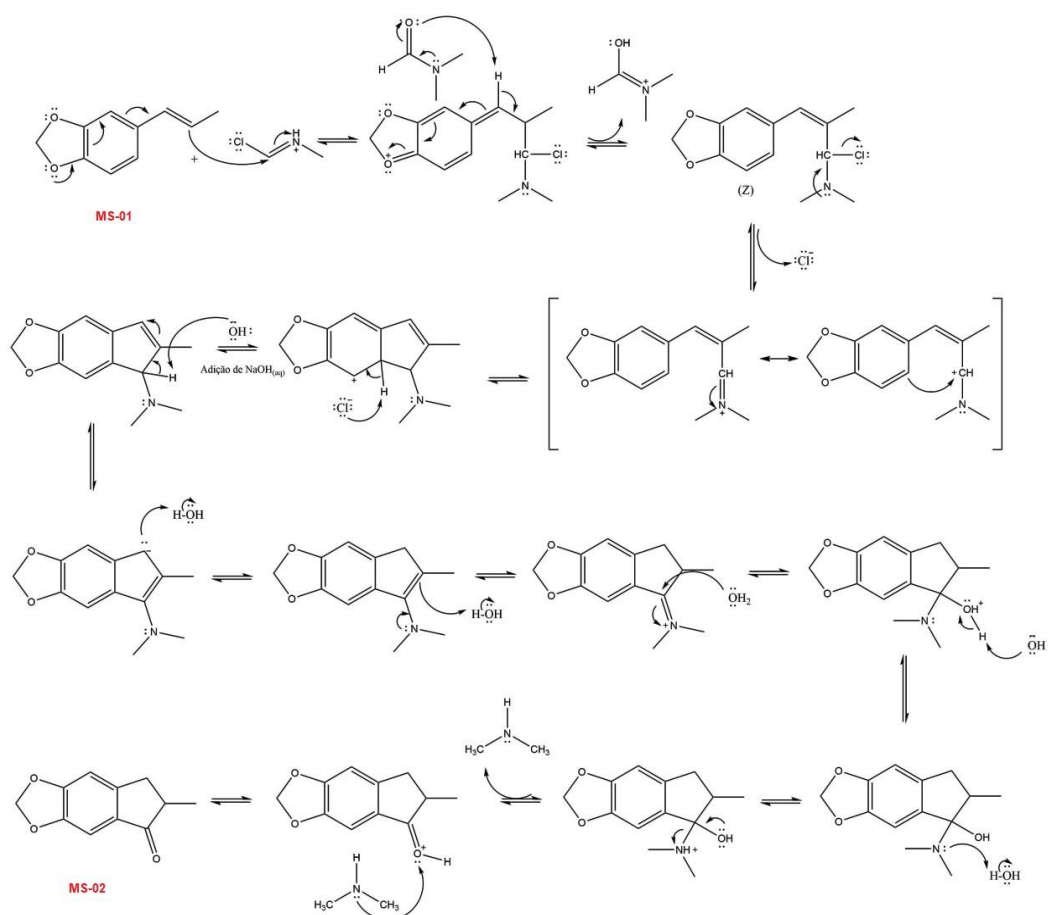
Esta etapa começa com a formação do reagente de Vilsmeier-Haack. O íon cloroimínio, obtido pela reação de uma amida substituída (DMF) com o oxiclreto de fósforo (POCl_3) conforme já descrito anteriormente.

A proposta de mecanismo (FIGURA 46) para a formação da indanona a partir do isosafrol (MS-01) é com base em ciclizações de Vilsmeier-Haack levando a formação de aminoindenos, que posteriormente sofrem hidrólise de modo a produzir indanonas. O reagente de Vilsmeier irá atuar como um eletrófilo e o isosafrol como um nucleófilo. O oxigênio do anel metilenodioxifenilo do isosafrol, que é um grupo doador de elétrons, doa um par de elétrons, de tal forma que o anel entra em ressonância e os elétrons da dupla ligação consigam atacar o eletrófilo. Adiante a olefina perde um próton e o anel retoma a sua aromaticidade. O nitrogênio (advindo do íon imínico), que também é um doador de elétrons doa um par de elétrons para formar a dupla e, o cloro como bom grupo abandonador, é eliminado. O ponto chave para que a ciclização ocorra é a formação do isômero

(Z) e a etapa de aquecimento durante a reação é o fator limitante para este ser formado, visto que temperaturas altas favorece a sua formação (WITIAK *et al.*, 1974).

Após a saída do cloro são formados híbridos de ressonância, porém para que haja o ataque nucleofílico do anel, o carbono precisa estar deficiente de elétrons, portanto este híbrido é o favorecido. A retirada do próton por uma base (Cl⁻) retorna a aromaticidade do anel. Com isso, o meio aquoso fortemente básico proporciona a isomerização da dupla ligação de alilamina e ocorre a hidrólise da enamina gerada, produzindo o derivado indanônico (MS-02) (WITIAK *et al.*, 1974).

Figura 46 - Mecanismo da reação de Vilsmeier Haack seguida de ciclização do Isosafrol (MS-01)



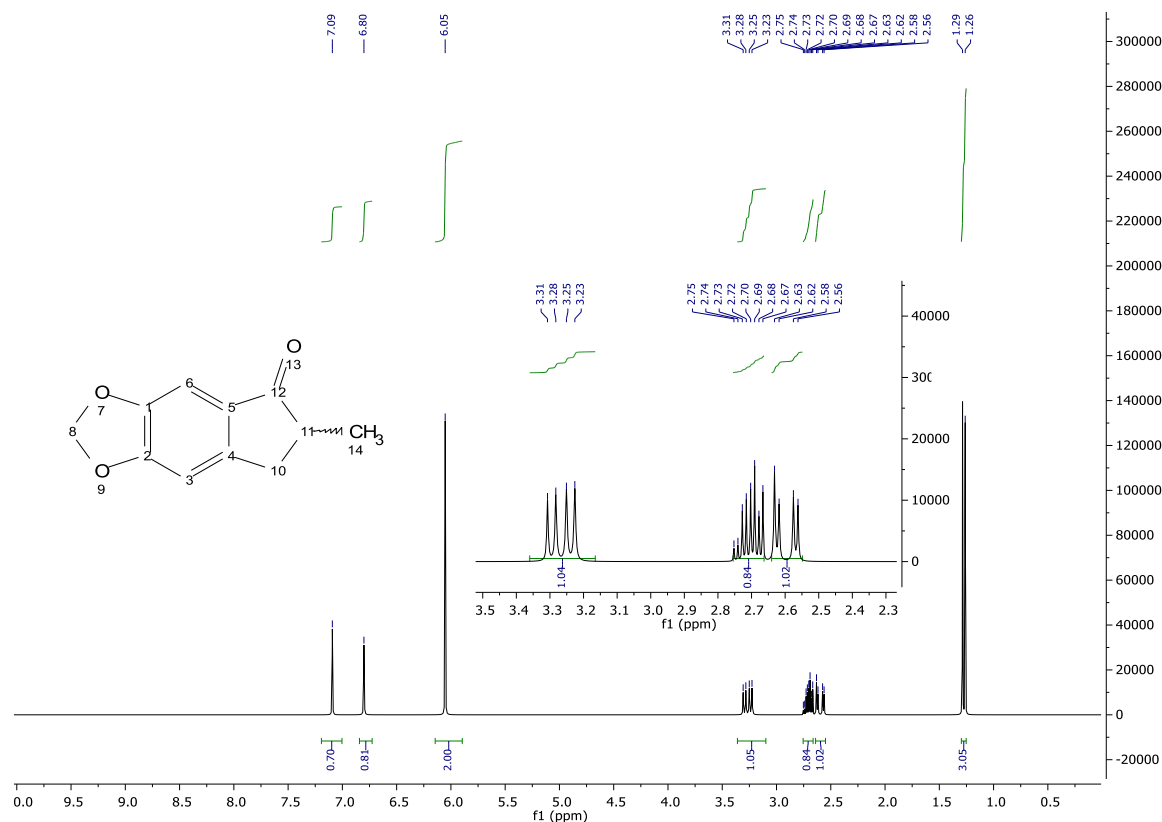
Fonte: adaptado de WITIAK (1974).

Em 2000, PAUL, GUPTA e GUPTA testaram a reação de Vilsmeier Haack por irradiações de microondas, que levaram o tempo de reação a cair de 6 horas

para menos de 3 minutos em sua maioria, mantendo bons rendimentos. Ainda que na literatura os relatos dos produtos obtidos por meio da reação, indiquem altos rendimentos, acima de 70%, não foi o observado na prática, na qual o máximo obtido foi acerca de 60%. Sendo assim, a justificativa para isso pode ser devido o baixo controle da atmosfera e muitas vezes da temperatura, devido a não obtenção de vidrarias e equipamentos adequados para essa finalidade, uma vez que no laboratório de estudo não há um sistema eficaz de vácuo/gás inerte que possa manter a reação nesse estado e, muitas vezes a oscilação de temperatura devido a utilização de banho de glicerina em chapas aquecedoras que oscilam muito do valor requerido.

A análise de RMN ^1H realizada do produto de interesse (FIGURA 47), exibiu em δ 1.28 ppm um duplete indicativo da presença da metila (H14) ligada diretamente ao centro assimétrico da indanona, com uma constante de acoplamento igual a 7,38 Hz com o hidrogênio α carbonílico (H11). O sinal em δ 6.05 ppm referente aos hidrogênios da metilenodioxila (H8) se manteve, porém mais deslocado e, agora, os hidrogênios aromáticos em δ 6.80 e δ 7.09 ppm simplificaram-se em simpletos bem visíveis, sendo o mais desprotegido (H6) referente ao da posição *orto* ao grupo retirador de elétrons (cetona da indanona). O sinal do hidrogênio ligado ao novo centro assimétrico formado (H11) se deu por meio de um multiplete com integral próximo de 1, na faixa entre δ 2.67 – 2.75 ppm, enquanto que os hidrogênios mais blindados do metileno (H10) se desdobraram em dois duplos dupletos em δ 2.60 (J = 3,57 e 16,87 Hz) e δ 3.27 (J = 7,5 e 16,9 Hz) apresentando acoplamento geminal e vicinal com o hidrogênio do novo centro assimétrico (H11).

Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H da substância **MS-02** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: da autora.

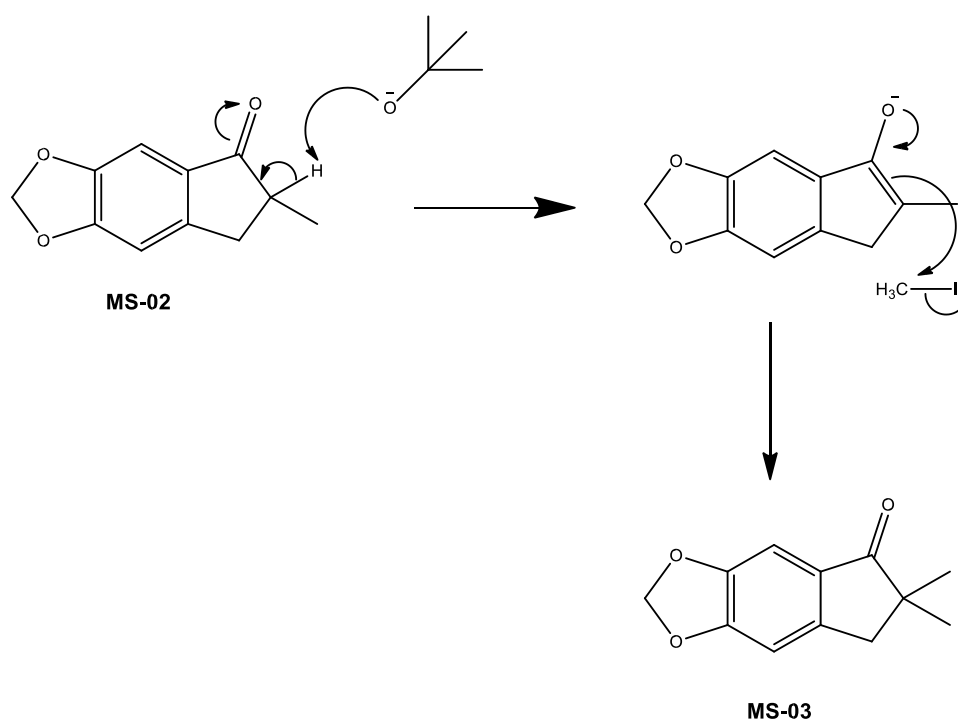
Os valores descritos foram confirmados na literatura, onde BARREIRO & LIMA, 1992 atribuem os 3 hidrogênios (H11 e H10) à um multipletto na faixa de δ 2.34 – 3.55 ppm; mais a frente, KLOSIN *et al.*, em 2000 registra uma patente (WO2000069871A1) descrevendo dois duplo dupletos e um multipletto conforme foi caracterizado, obtendo constantes de acoplamento muito próximas, não diferente de LIMA; GABRIEL; CASTRO no mesmo ano (2000).

O espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Espectro 4, Página 131), mostra a presença de 11 carbonos diferentes na molécula. O sinal característico que confirma a formação da indanona foi o aparecimento do carbono da carbonila cetônica, em δ 207.47 ppm (C12). Logo após, a presença dos metilenos em δ 102.53 ppm (C8) e δ 34.93 ppm (C10) confirmadas pelo RMN ^{13}C DEPT 135 caracterizaram o fechamento do anel, juntamente com a metila em δ 16.61 ppm e ao carbono assimétrico em δ 42.44 ppm.

6.2.3 Reação de C-alkilação do centro assimétrico (MS-03)

A etapa subsequente foi a eliminação do centro assimétrico da metila da indanona por meio de uma C-alkilação. O hidrogênio α -carbonílico foi substituído pelo grupamento metila. A metodologia aplicada foi baseada em estudos realizados por RANU e JANA em 1999, com adaptações, utilizando CH_3I em meio básico e explorando a acidez relativa do hidrogênio α . No artigo, RANU e JANA utilizam como base forte o LDA, que aqui foi substituído por *tert*-BuOK, já utilizado pelo grupo de pesquisa e descrito também em CLAYDEN et al., 2001, com rendimentos altos. O *ter*butóxido de potássio (*tert*BuOK) apresenta características básicas favorecendo a desprotonação do carbono α , com a formação do íon enolato; em seguida os elétrons π do íon enolato atacam o carbono eletrofílico do iodeto de metila promovendo uma substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_\text{N}2$) finalizando a reação com formação do derivado indanônico com as metilas geminais. O mecanismo reacional está representado na figura a seguir:

Figura 48 - Mecanismo reação da formação do intermediário (MS-03) por meio de um C-alkilação do intermediário indanônico (MS-02).



Fonte: adaptado de CLAYDEN (2001).

A reação foi realizada a temperatura ambiente por 12 horas, resultando no composto di-metilado (MS-03), na forma de um sólido amarelado, com 77% de rendimento.

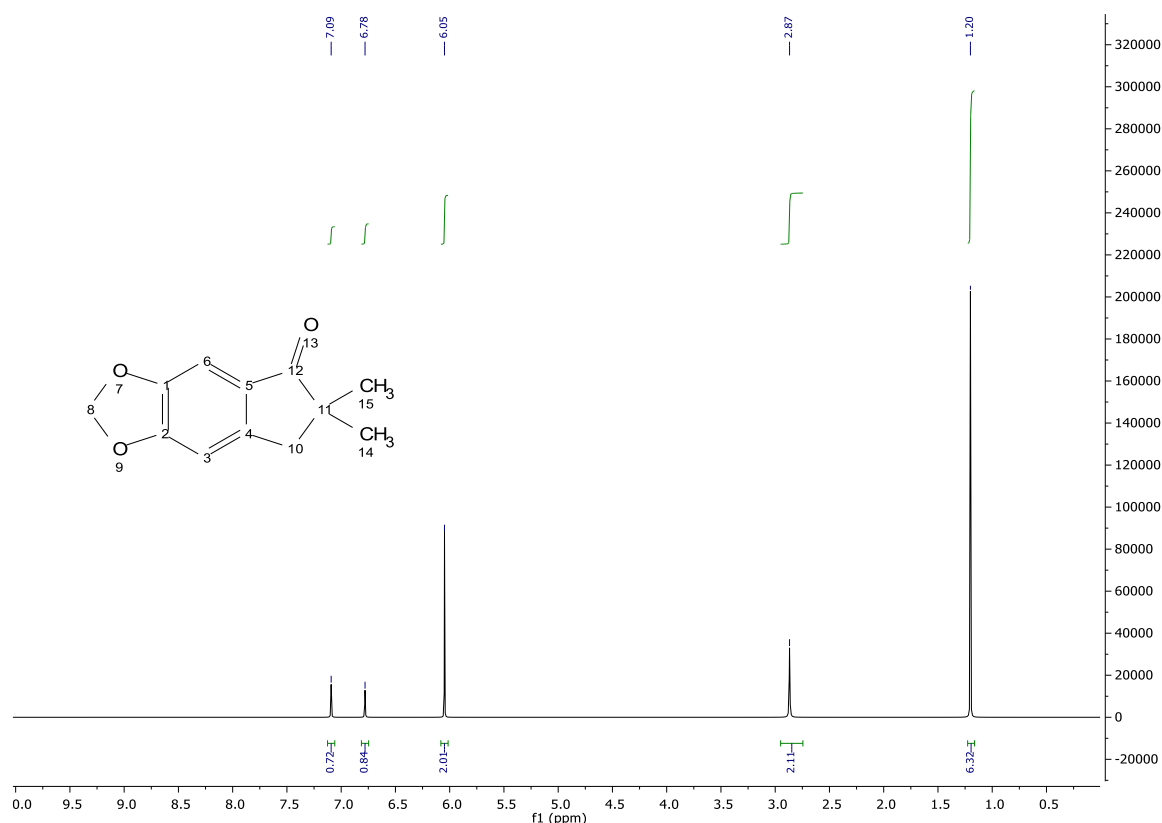
Outras metodologias citam a metilação em aromáticos (ortometilação) utilizando *tert*-BuLi, éter e CH₃I, porém em temperaturas extremamente baixas, como é o caso de SOUZA e ALMEIDA (2002). Recentemente, um estudo relatou a alquilação de indanona por meio de CH₃Cl (iodometano) em meio básico (tolueno/NaOH) na presença de um catalisador, um sal de amônio quaternário, porém o tempo de reação ainda era maior que o realizado, cerca de 18h (FINELLI; SANTOS; FROTA, 2019). Nesse caso optou-se por realizar a metodologia já conhecida de RANU e JANA (1999).

Aqui, foi utilizado, tanto K(s) e *tert*-BuOH para formação do *tert*-BuOK, quanto o mesmo já pronto. De forma que, com o reagente já pronto, o rendimento foi maior.

Nessa reação, que depende de atmosfera inerte, bem como a de Vilsmeier-Haack, foi possível perceber uma melhor manutenção do argônio utilizado, que gerou rendimento maior. Isso, pois ela é realizada a temperatura ambiente e, a ausência de um condensador para sistema de refluxo associada a não necessidade de controle de temperatura, diminui a probabilidade de vazamento e oscilações nas condições específicas de reação.

O espectro de RMN ¹H (FIGURA 49) permitiu a confirmação da metilação da indanona por meio do desmembramento do duplete da metila do centro assimétrico para um simpleto em δ 1.20 ppm (H14 e H15) referente às metilas geminais e a formação de outro simpleto em δ 2.87 ppm referente ao metileno adjacente (H10). Os sinais dos hidrogênios aromáticos e da metildioxila se mantiveram.

Figura 49 - Espectro de RMN de ^1H da substância **MS-03** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: da autora.

Com o auxílio do espectro de RMN ^{13}C (Espectro 6, Página 132) a evidência ficou mais clara a partir do sinal das metilas (C14 e C15) com alta intensidade em δ 25.42 ppm além da manutenção do sinal aparente da carbonila cetônica em δ 209.45 ppm e a presença de um carbono terciário em δ 46.04 ppm (C11) substituindo o carbono assimétrico descrito anteriormente. Tais valores de deslocamento químico corroboram a proposta estrutural, demonstrando a ocorrência da formação do intermediário indanônico bidesmetilado.

No entanto, outras análises poderiam ser realizadas para a confirmação do produto obtido, como por exemplo a injeção em um espectrômetro de massas.

6.2.4 Reação de obtenção do derivado oxímico (**MS-04**)

Ao explorar o caráter eletrofílico da carbonila cetônica, a etapa posterior à alquilação da indanona, se deu por meio de uma reação de adição de cloridrato de hidroxilamina. Esta reação foi realizada na presença de acetato de sódio em uma

mistura 8:2 de metanol/água a 65 °C por 48 horas, adaptado de GOPALSAMY, 2006.

As oximas, grupos bastante conhecidos pela sua versatilidade na obtenção, facilidade de conversão (da oxima à carbonila) e pelo seu caráter protetor, são frequentemente escolhidas como intermediários para diversos compostos (SARKAR; GANGOPADHYAY, 2015).

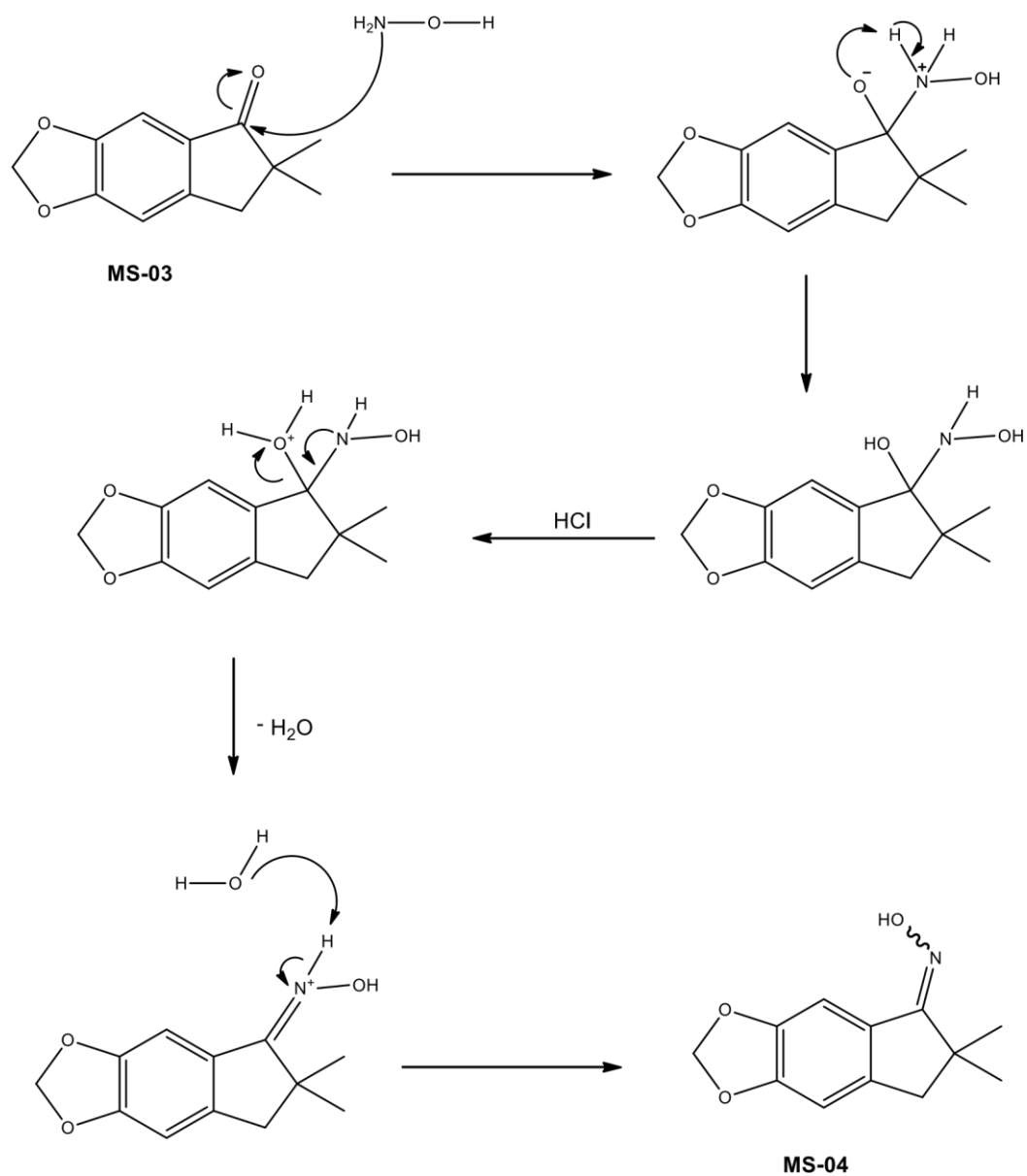
As alternativas à síntese de oximas são das mais variadas quando se faz uma busca na literatura. Ausente de catalisador e solvente, DAMLJANOVIC; VUKIĆEVIĆ; VUKIĆEVIĆ (2006) realizou a síntese de ciclohexanonas com cloridrato de hidroxilamina e NaOH por meio de moagem com gral e pistilo durante 30 a 40 minutos em T.A com obtenção de rendimentos próximos a 100%. KIASAT (2004), propôs metodologia parecida, porém com uso de sílica e água como catalisador, diminuindo esse tempo para 9 minutos e mantendo altos rendimentos.

Outras descrições citaram o uso de irradiações por microondas (KAD *et al.*, 2001), catálise por resina de troca iônica (BALLINI; BARBONI; FILIPPONE, 1997), bem como a fácil interconversão de oximas novamente em cetonas ou aldeídos (ALI *et al.*, 2006).

Os rendimentos para obtenção das oximas também são bastante conhecidos por serem próximos de 90%. Sendo assim, optou-se pela metodologia clássica e já realizada no laboratório, adaptada de NIWA (1984) utilizando o cloridrato de hidroxilamina na presença de acetato de sódio em uma mistura 8:2 de metanol/água a 65° C por 48 horas.

Para a obtenção do intermediário oximíco (MS-04) reagiu-se o produto MS-03 com cloridrato de hidroxilamina (NH₂OH.HCl) em solução hidrometanólica na presença de acetato de sódio, um sal básico que tem a finalidade de favorecer o ataque nucleofílico da hidroxilamina ao carbono carbonílico para que ocorra a reação de adição nucleofílica com a produção dos diastereisômeros (*E/Z*) oxímicos, o mecanismo da reação está ilustrado abaixo (FIGURA 50):

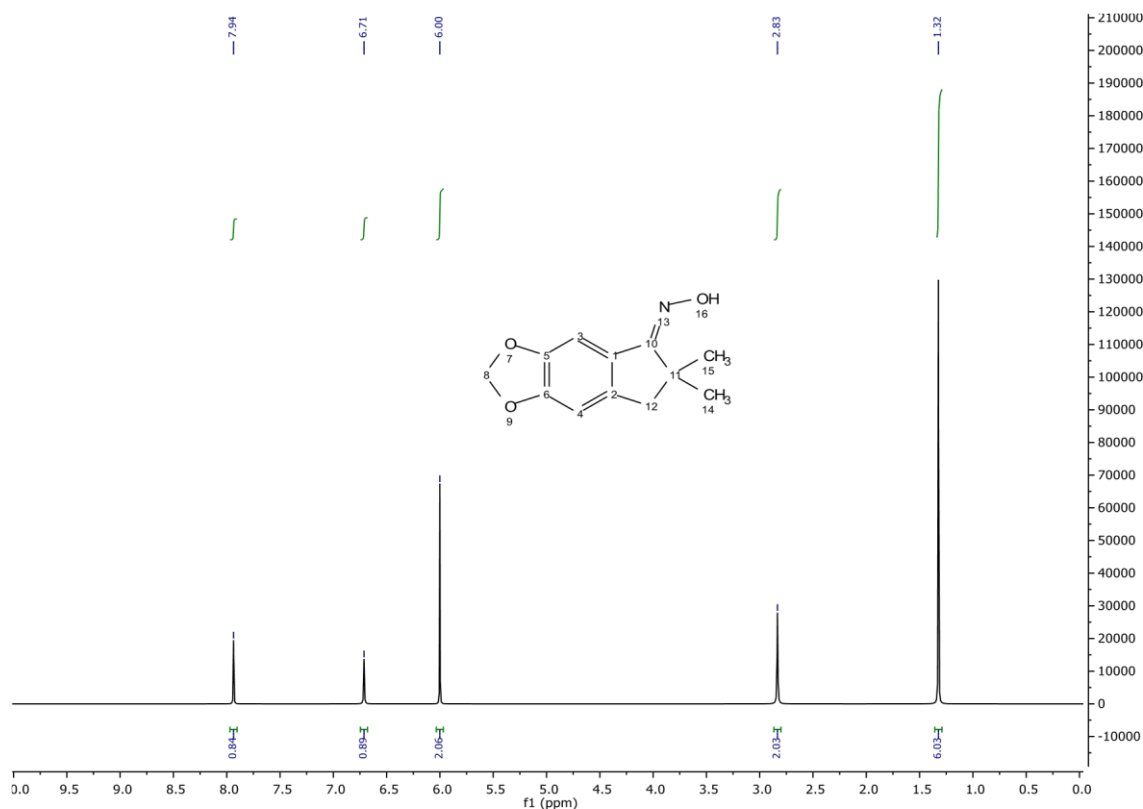
Figura 50 - Proposta mecanicistica para a obtenção de um derivado oxímico (**MS-04**) a partir de uma cetona (**MS-03**).



Fonte: da autora.

A obtenção de intermediários oxímicos a partir de cetonas é bastante comum, e descreve rendimentos bastante altos acima de 90%.

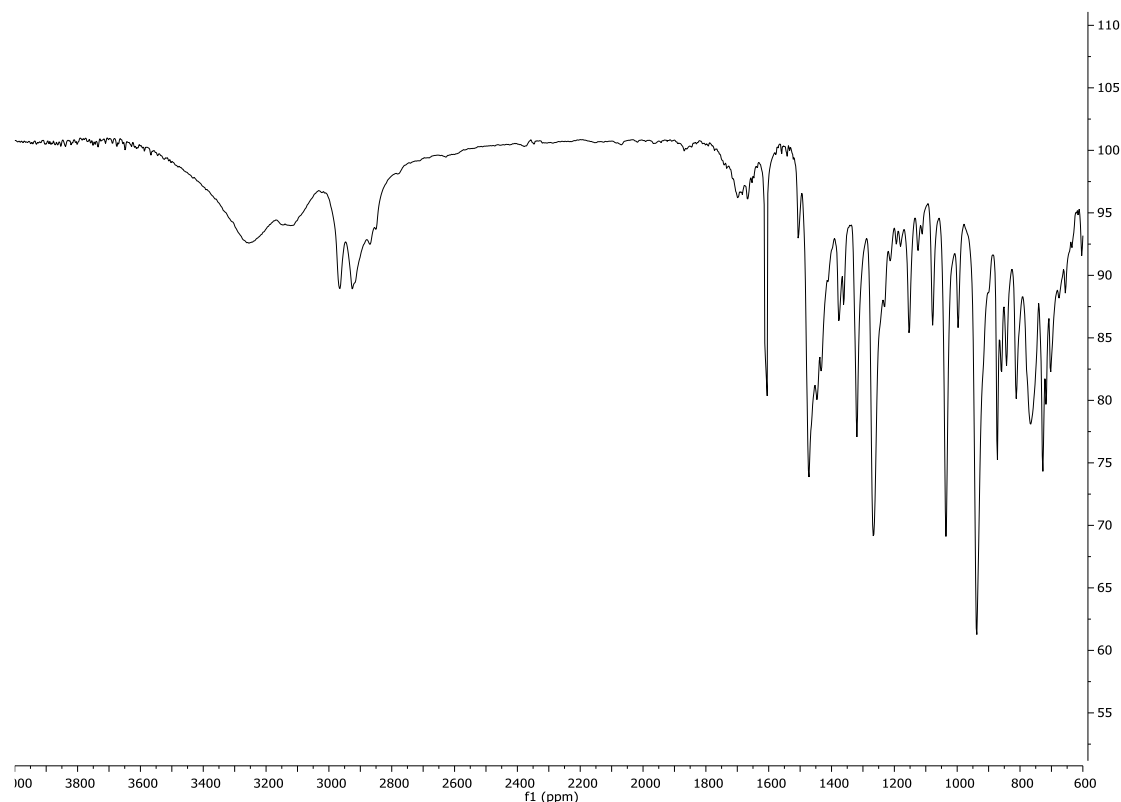
Figura 51 - Espectro de RMN de ^1H da substância **MS-04** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: da autora.

A análise do espectro do RMN ^1H (FIGURA 51) permitiu identificar os hidrogênios referentes à molécula do produto obtido, com as atribuições iguais ao do produto anterior (MS-03), δ 1.32 ppm referente às metilas geminais do carbono α à carbonila e o metileno adjacente em δ 2.83 ppm, a metilenodioxila e aromáticos entre δ 6.00 e 8.00 ppm. No entanto, o deslocamento do H3 que anteriormente era próximo a δ 7.00 ppm e agora está próximo a δ 8.00 ppm é um indicativo que a carbonila gerou a oxima. No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 8, Página 133) a ausência do sinal da carbonila cetônica próximo de δ 209.00 ppm e presença de um sinal em δ 165.09 ppm demonstra sua substituição por uma imina, característica nessa região. Com o auxílio de RMN ^{13}C DEPT 135 é possível observar que o carbono imínico não possui hidrogênios ligados à ele. A aparição de uma banda alongada em 3251cm^{-1} no espectro de IV (O-H) e a substituição da banda forte de $\text{C}=\text{O}$ por uma em 1603cm^{-1} ($\text{C}=\text{N}$), também confirma o esperado (FIGURA 52).

Figura 52. Espectro de IV (KBr) da substância **MS-04** (cm^{-1}).



Fonte: da autora.

Uma vez que o hidrogênio referente a hidroxila oxímica ($\text{C}=\text{N}-\text{OH}$) não apareceu no espectro de RMN ^1H , através do NOESY não foi possível identificar o isômero obtido, no entanto com o deslocamento de H3 próximo de 8,0 ppm acredita-se que se trate do isômero Z.

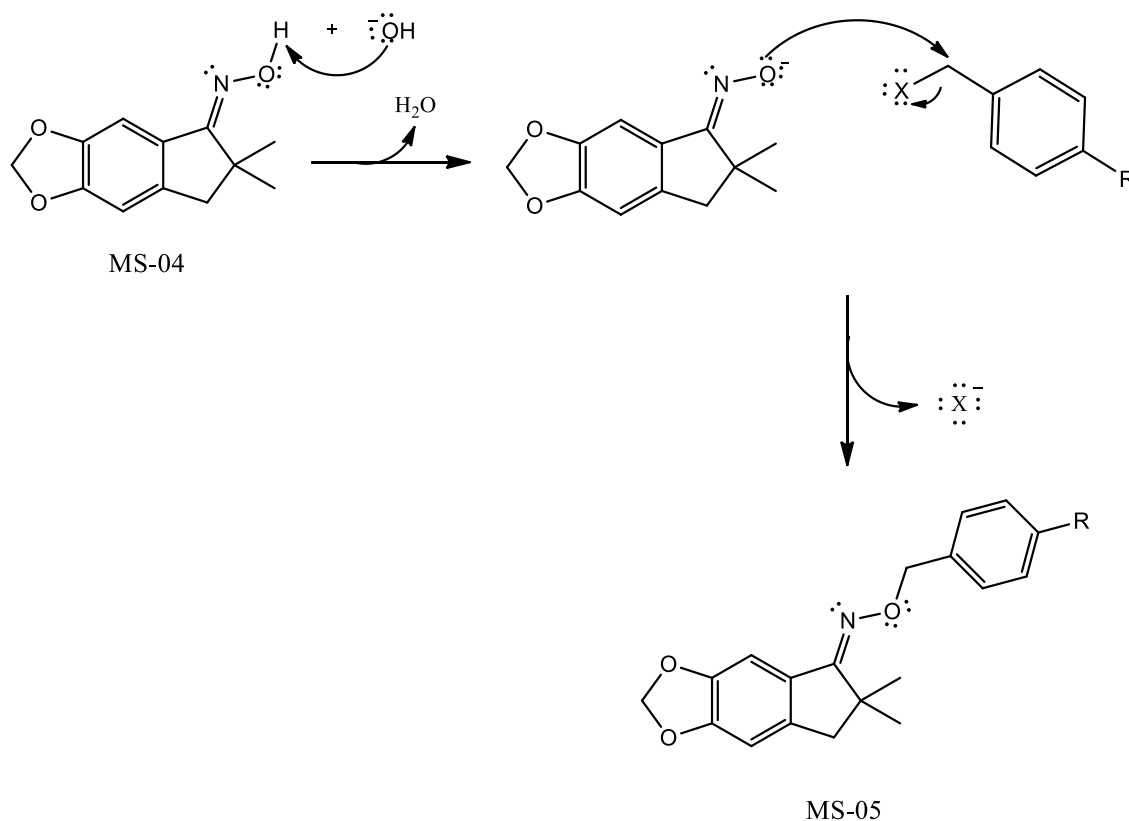
6.2.5 Reação de obtenção dos éteres oxímicos (MS-05)

Em prosseguimento a rota sintética descrita, a oxima (MS-04) foi submetida a reações de acoplamento com os respectivos haletos de benzila *p*-substituído, para fornecer a série de éteres oxímicos (MS-05a-h) desejados. A metodologia foi baseada no estudo de Li (2002) a temperatura ambiente na presença de uma base forte (KOH) em meio DMSO/ H_2O (8:2), e o tempo de reação para cada produto variou entre 30 minutos a 2 horas.

A reação acontece, de forma geral, conforme ilustrado na Figura 53, com a desprotonação do intermediário-chave pelo íon hidroxila. Em seguida, acontece a reação de substituição nucleofílica no haleto de benzila, com a saída de íon cloreto

ou brometo ($X = \text{Cl}$ ou Br), obtendo-se o derivado éter de oxima de interesse.

Figura 53 - Proposta mecanicistica para a obtenção da série de éteres oxímicos (MS-05a-h) a partir da oxima (MS-04).



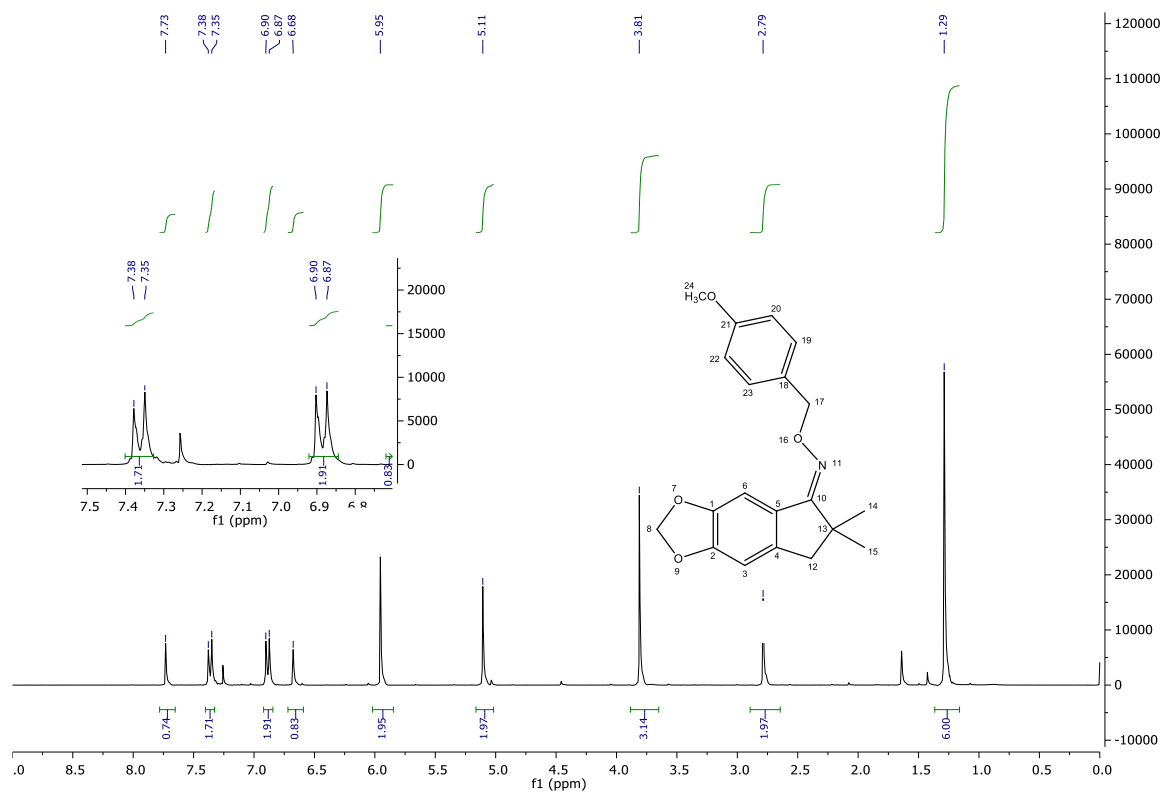
Fonte: da autora.

Os compostos MS-05a-h foram caracterizados por espectroscopia na região do IV, RMN de ^1H e ^{13}C . Nos espectros na região do IV dos derivados em geral (a-h) observou-se o desaparecimento da banda O-H ($\nu = 3251 \text{ cm}^{-1}$), evidenciando a formação do produto de interesse (Espectros 9, 11, 15, 16, 20, 23, 26 e 29 - ANEXOS).

No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 54), as principais características espectroscópicas observadas foram o aparecimento de um sinal nas regiões entre 5,0 e 5,2 ppm, referente aos hidrogênios das funções éteres de oximas ($\text{C}=\text{N}-\text{O}-\text{CH}_2$). Além disso, com a permanência do deslocamento de H6 próximo a 8,0 ppm, caracterizou-se os produtos como isômero Z. Observou-se também na região dos aromáticos um sistema AA'BB', dois dupletos, com valores de acoplamento de

aproximadamente 8,5 Hz evidenciando a presença de anéis aromáticos *p*-dissubstituídos.

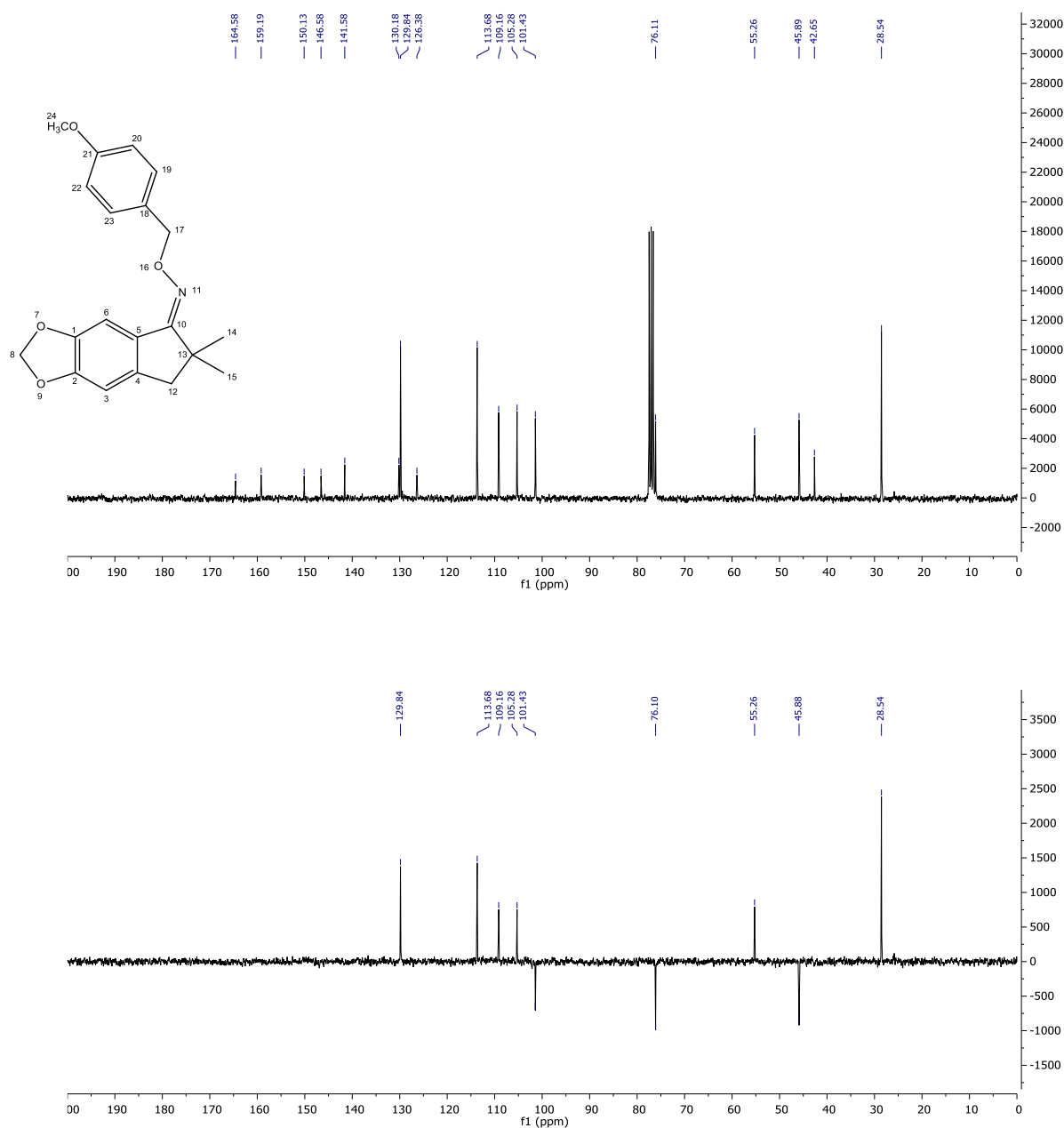
Figura 54 - Espectro de RMN ^1H da substância MS-05a (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: da autora

Já nos espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 55) dos derivados (MS-05a-h) observou-se o aparecimento de sinais na região de δ 75,0 a δ 76,0 ppm, que foram atribuídos aos carbonos dos éteres oxímicos ($\text{C}=\text{N}-\text{O}-\text{CH}_2$).

Figura 55 - Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da substância MS-05a (CDCl_3 , 75 MHz).



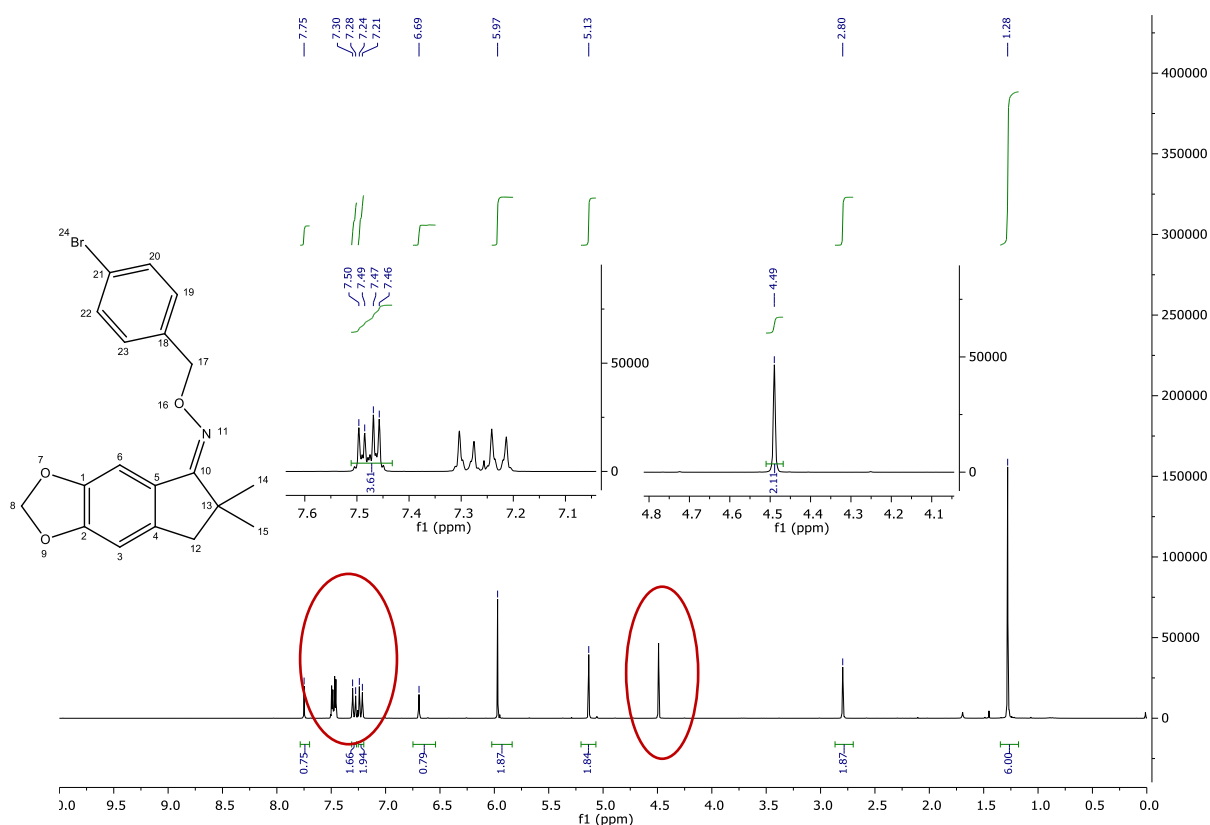
Fonte: da autora.

O perfil de sinais nos espectros de RMN, se repetiram dentre os diferentes produtos da série com variações pequenas de deslocamento químico devido às diferenças dos substituintes na posição *para* ao anel, como por exemplo a diferença de eletronegatividade. O mesmo ocorreu com o padrão de bandas dos espectros de IV, como pode ser observado nos espectros expostos em anexo.

A obtenção dos éteres oxímicos foi obtida em todas as reações, no entanto

em algumas delas (MS-05 c, e, f, g) há a presença de uma impureza de difícil remoção, proveniente da formação de um possível álcool com o reagente haleto de benzila utilizado. Evidenciada no RMN de ^1H de todas, pelo sinal próximo de 4,5 ppm referente ao que seria o hidrogênio da metila ligada à hidroxila do álcool, e de dois dupletos a mais na região dos aromáticos (entre 7,0 – 7,5 ppm), eles possuem integrais que correspondem a hipótese gerada, bem como no espectro de RMN de ^{13}C pela presença de uma metila próxima de 70 ppm e a duplicação dos carbonos do anel *para* dissubstituído (entre 100 e 140 ppm), confirmados pelo DEPT 135. Ainda que o sinal seja semelhante ao do reagente utilizado, através de CCD, foi possível perceber a diferença de R_f , deduzindo a formação de um álcool ao invés do excesso do reagente em questão. A figura abaixo ilustra o espectro da amostra MS-05c com a impureza como exemplo.

Figura 56 - Espectro de RMN ^1H da substância **MS-05c** (CDCl_3 , 300 MHz).

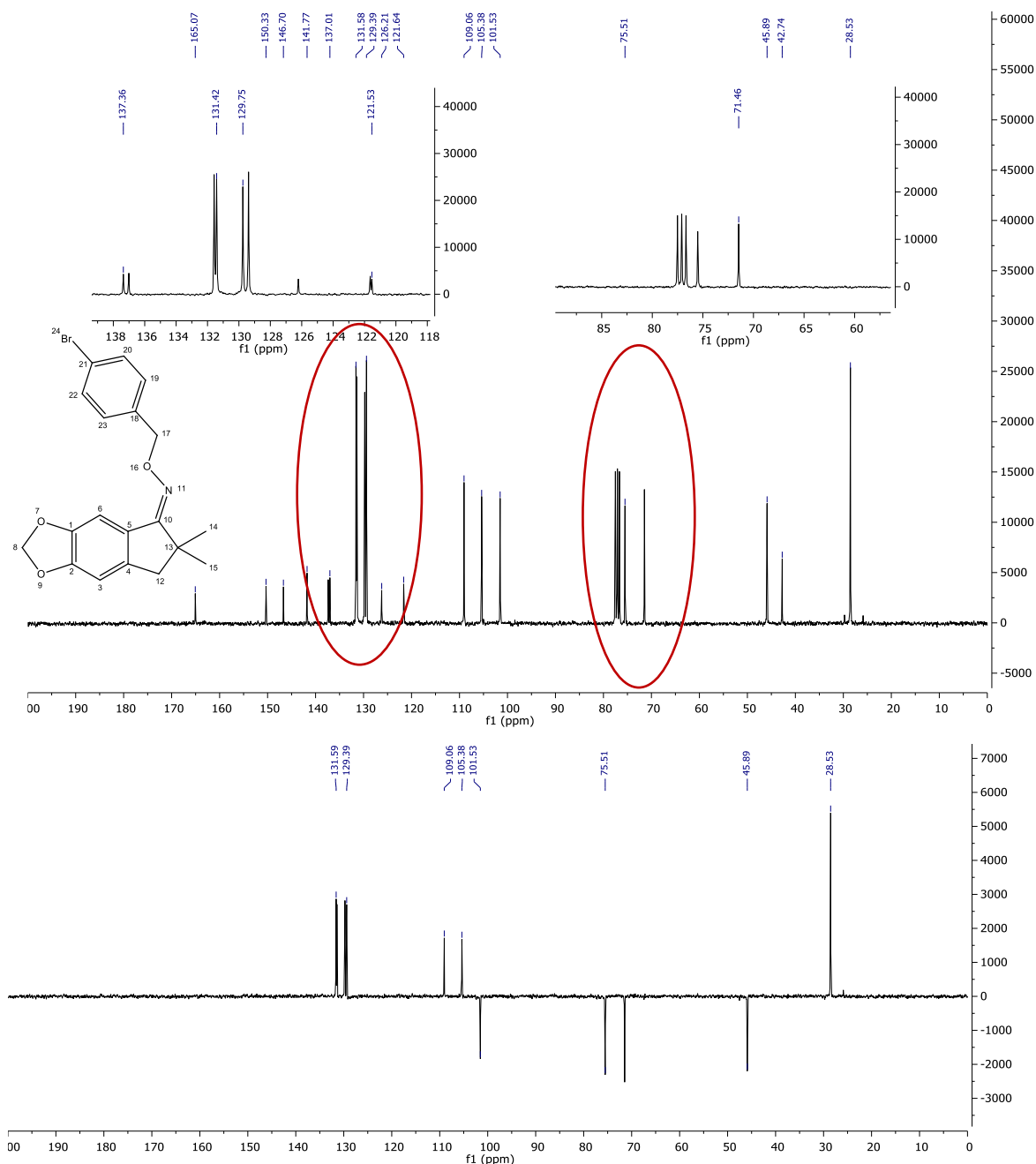


Fonte: da autora.

Os dupletos expandidos demonstram em 7.46 e 7.49 ppm os sinais que se referem à impureza, com uma constante de acoplamento próximo de 3 Hz, além do

simpleto em 4.49 ppm. Os demais sinais são referentes ao produto formado, substituído com um Bromo.

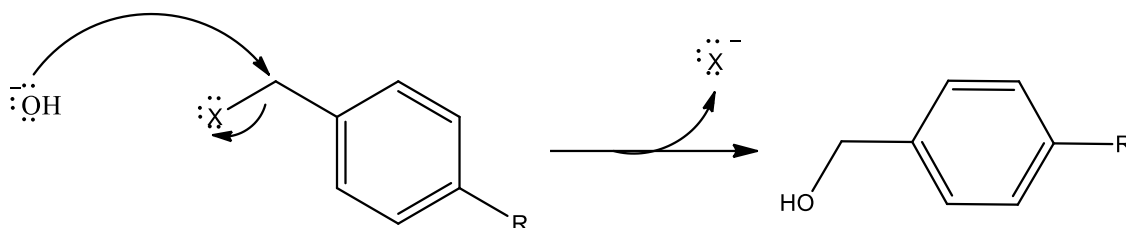
Figura 57 - Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da substância **MS-05c** (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: da autora.

No espectro de carbono a expansão demonstra os sinais que não fazem parte do produto, característicos da formação de um álcool *para*-disubstituído. A possível reação de formação do álcool está ilustrada abaixo:

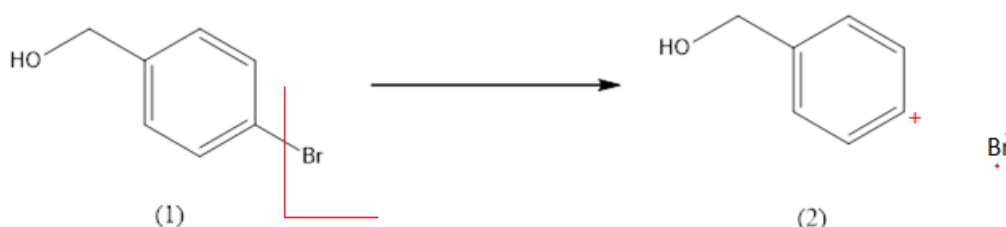
Figura 58 - Reação de formação do álcool proposto como impureza a partir da hidroxila da água com o reagente correspondente haleto de benzila.



Fonte: da autora.

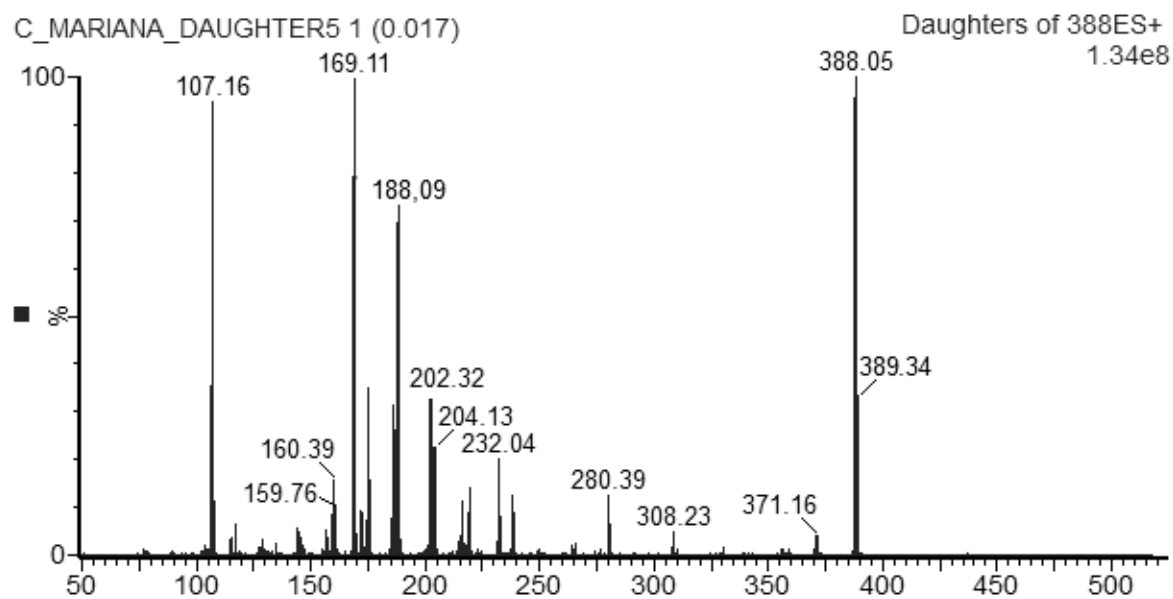
Através do espectro de massas (FIGURA 60) obtido da substância em questão, foi possível caracterizar a presença do álcool (1) e seu possível fragmento (2):

Figura 59 - Proposta de fragmentação da molécula de álcool sugerida.



Fonte: da autora.

Com um peso molecular de 187,03 g/mol, o álcool oriundo do reagente Cloreto de 4-Bromobenzila (Figura 59-1), caracteriza-se pelo pico em 188,09 $[\text{M}+\text{H}^+]$ com abundância relativa alta, diferente dos produtos puros que não apresentaram esse pico característico referente ao álcool do haleto de benzila correspondente. Além dos picos comuns da molécula MS-05c (388,05 e 169,11) a presença de um fragmento com m/z 107,16 se refere a proposta de fragmentação do álcool (FIGURA 59-2), com a perda do Bromo, uma vez que C-Br se trata da ligação mais fraca na molécula e devido a estabilidade da hidroxila.

Figura 60 - Espectro de Massas da substância **MS-05c**.

Fonte: da autora.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

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

A presença do grupamento metilenodioxila (C-O-C) e oxímico (C=N-O-R) foi essencial para interação entre os compostos da série e as enzimas CRK3 e rCPB2.8 nos estudos de ancoragem molecular. Na enzima rCPB2.8, compostos contendo grupamentos doadores de elétrons ao anel aromático *p*-dissubstituído pelo efeito de ressonância apresentaram uma atividade leishmanicida de magnitude ligeiramente maior que aqueles contendo grupamentos retiradores de elétrons devido ao aumento da densidade eletrônica neste anel e possibilitando uma interação mais forte do tipo π -*stacking* e cátion- π . Que foi o que ocorreu com as moléculas de maior interação ligante-receptor, com substituintes como Cl (MS-05g) e Br (MS-05c), e da interação entre os elétrons do anel aromático do ligante e dos aminoácidos TRP188 e TRP192 uma vez que tais aminoácidos fazem parte de um dos subsítios de interação com o substrato e próximo ao sítio ativo das cisteino proteases. Além disso as distâncias entre átomos possíveis de realizar uma ligação covalente da molécula de interesse e o resíduo de CYS28 (equivalente à CYS25 do molde), parte do sítio catalítico da enzima, também apresenta a possibilidade de formação desse tipo de ligação, o que seria essencial para atividade inibitória da enzima.

Na enzima CRK3 a obtenção de valores de energia de ligação de três dos compostos sintetizados MS-05a (-OCH₃), MS-05i (-NO₂) e MS-05f (-CF₃) demonstra a afinidade ligante-receptor dos mesmos, melhores que a do fármaco Pentamidina, nos dando a possibilidade da obtenção de moléculas promissora no âmbito da criação de novos protótipos à fármacos. O composto MS-05i (-NO₂), confere a melhor molécula sintetizada quando comparada à enzima CDC2, na qual apresentou

alta seletividade pela enzima do parasito e baixa pela humana. Por sua vez o composto MS-05f (-CF₃) abrange as duas classes de enzimas, tanto da rCPB2.8 quanto da CRK3, quando se tratando de energia de interação na enzima CRK3 e de melhores interações de van der Waals na enzima rCPB2.8.

A série de derivados oxímicos obtidos a partir do Safrol (MS-05a-h) foram sintetizados com rendimentos variáveis e suas estruturas foram caracterizadas por espectroscopia de absorção na região do IV, por RMN e EM. A presença de uma impureza dificultou a obtenção do produto puro com altos rendimentos, no entanto através da análise do produto pelo espectro de massas, foi possível observar que não interferiu na sua obtenção.

Os compostos apresentaram propriedades físico-químicas desejáveis nos estudos teóricos, indicando boa solubilidade e permeabilidade em membranas pela administração via oral.

Os resultados demonstram a possibilidade de interações favoráveis entre as moléculas propostas inéditas e as enzimas selecionadas para estudos biológicos, com isso existe a expectativa de uma futura colaboração científica para a execução de ensaios farmacológicos *in vivo* e *in vitro* para confirmação e correlação dos resultados observados *in silico* e a busca de um andamento no estudo, promissor na área.

REFERENCIAS

- ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT. **ACD/Chemsketch**. versão C30E41, Inc., Toronto, ON, Canada, 2016. Software.
- ALCOBA, A. E. T.; MELO, D. C. de; MIRANDA, M. L. D.; MARTINS, C. H. G. Bioatividades do óleo essencial das folhas de *Ocotea odorifera* (LAURACEAE). *In: 69ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC*, 2017, Belo Horizonte. **Anais da 69ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 2017. p. 14-17.
- ALI, M. H. *et al.* Oxidative Cleavage of Oximes with Silica-Gel-Supported Chromic Acid in Nonaqueous Media. **Synthetic Communications**, Estados Unidos da América, n. 36, p. 1761-1767, ago. 2006.
- ALONSO, Hernán; BLIZNYUK, Andrey; GREASY Jill. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Med Res Rev**, Estados Unidos da América, v. 26, n. 5, p. 53168, set. 2006.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Estados Unidos da América, v. 215, n. 3, p. 403-410, out.1990.
- ANVERSA, L. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 64, n. 3, p. 281-289, ago. 2018.
- ARAÚJO, Cleônia Roberta; GONSALVES, Arlan. Oximas: Propriedades Químicas, Métodos de Preparação e Aplicações na Síntese de Grupos Funcionais Nitrogenados. **Revista Virtual de Química**, Pernambuco, v. 7, n. 4, p. 1469-1495, jun. 2015.
- ASHANI, Yacov; SILMAN, Israel. Hydroxylamines and Oximes: Biological Properties and Potential Uses as Therapeutic Agents. **Patai's Chemistry Of Functional Groups**, Israel, v. 1, p. 1-43, abr. 2010.
- AZIZI, Hugo. *et al.* Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans *Leishmania tarentolae*. **Parasitology**, Cambridge, v. 136, n. 7, p. 723-735, mai. 2009.
- BALLINI, R. *et al.* Amberlyst A-21 an excellent heterogeneous catalyst for the conversion of carbonyl compounds to oximes. **Chemistry Letters**, Japão, v. 26, n. 5, p. 475-476, jan. 1997.
- BARREIRO, E. J. *et al.* Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 1-11, jun. 1997.
- BARREIRO, E. J. *et al.* Síntese total de um sesquiterpeno natural isolado de

Aplysia brasiliana. Síntese enantioespecífica do (+)-brasilenol. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 230-238, out. 1989.

BARREIRO, Eliezer; LIMA, Marco. The synthesis and anti-inflammatory properties of a new sulindac analogue synthesized from natural safrole. **American Pharmaceutical Association**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 12, p. 1219-1222, mai. 1992.

BARREIRO, Eliezer; FRAGA, Carlos Mansour. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafrás, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico. **Química Nova**, Rio De Janeiro, v. 22, n. 5, p. 744-759, out. 1999.

BARREIRO, Eliezer; BARBOSA, Maria Leticia. Características Estruturais das Proteínas Cinases e Seus Inibidores em Uso Clínico. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 5, p. 1280-1303, set. 2018.

BASTOS, M. M., *et al.* Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v.8, n. 6, p. 2072-2104, ago. 2016.

BOROWSK, E. A. *et al.*, Quantitative structure-activity relationships in amphotericin B derivatives. **Biochemical Pharmacology**, França, n. 37, p. 827, fev. 1988.

BROWN, M. A., *et al.* Oxime ether pyrethroids and hidroxilamine ether propyretroids: photochemistry, biological activity and metabolism. **Journal of Agricultural Food**, Estados unidos da América, v. 31, p. 1091-1096, jul.1983.

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Parasites - Leishmaniasis. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 13 de jun. 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Leishmaniasis: Treatment, 2013. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/treatment.html>>. Acessado em: 10 de Julho de 2019.

CARREIRA, Erik; CEREGHETI, Damiano. Amphotericin B: 50 Years of Chemistry and Biochemistry. **Chemistry**. Nova Iorque, v. 6, p. 0914-0942, nov. 2006.

CHAI, Y. *et al.* Complexation of antimony (SbV) with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphospho-d-mannose: Formation of both mono- and bis-adducts. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Hong Kong, v. 99, n. 12, p. 2257-2263, dez. 2005.

CHÉRON, M. B. *et al.*, Quantitative structure-activity relationships in amphotericin B derivatives. **Biochem. Pharmacol**, Paris, v. 37, p. 827-836, jan.1988.

CLAYDEN, J. *et al.* **Organic Chemistry**, EUA: Oxford University Press, 2001.

CLEGHORN, L. A. T., *et al.* Identification of Inhibitors of the Leishmania cdc2Related Protein Kinase CRK3. **ChemMedChem**, Inglaterra, v. 6, n. 12, p. 2214-2224, 2011.

COELHO, C. M. *et al.* Design, Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies of Novel Eugenol Esters as Leishmanicidal Agents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 29, p. 715-728, 2017.

COSTA, Paulo Rocha. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 58-66, 2009.

CREMASCO, Marco Aurelio; BRAGA, Nazareno. Isomerização do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC) para a obtenção de isosafrol. **Acta Amazonica**, Campinas, v. 40, n. 4, p. 737-740, 2010.

DAMLJANOVIC, Ivan; VUKIĆEVIĆ, Mirjana; VUKIĆEVIĆ, Ratsko. D. A Simple Synthesis of Oximes. **Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly**, Sérvia e Montenegro, v. 137, n. 3, p. 301305, 2006.

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

DE LUCA, L. *et al.* Discovery of benzimidazole-based *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB2.8 Δ CTE inhibitors as potential therapeutics for leishmaniasis. **Chemical Biological Drug Design**, Itália, v. 92, n. 3, p. 1585-1596, 2018.

DEMICHELI, C. *et al.* Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine antimonate. **Applied organometallic chemistry**, Minas Gerais, v. 17, n. 4, p. 226-231, 2002.

DIKUSAR, E. A. *et al.* Preparative synthesis of veratraldehyde and citral oxime esters. **Russian Journal Of Applied Chemistry**, Rússia, v. 81, n. 4, p. 643-646, 2008.

DUNCAN, Samuel. *et al.* Conditional gene deletion with DiCre demonstrates an essential role for CRK3 in *Leishmania mexicana* cell cycle regulation. **Molecular Microbiology**, Estados Unidos da América, v. 100, n. 6, p. 931-944, 2016.

EISENBERG, Daneil; LÜTHY, Ramirez; BOWIE, Jordan. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in enzymology**, EUA,

v. 277, p. 396-404, 1997.

EMAMI, Samuel. *et al.* Stereoselective Synthesis and in Vitro Antifungal Evaluation of (*E*)- and (*Z*)-Imidazolylchromanone Oxime Ethers. **Archiv der Pharmazie**, França, v. 335, p. 318-324, 2002.

FAIR, J. R. Alignment, vibrational, and steric effects in unimolecular and bimolecular systems: Towards an understanding of chemical reactions in quantum-state detail. **University of Colorado**, EUA, 2000. p. 394. 2000.

FEY, P. *et al.* New aziridine-based inhibitors of cathepsin L-like cysteine proteases with selectivity for the Leishmania cysteine protease LmCPB2.8. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Paris, v. 156, p. 587-597, 2018.

FILHO, O. A. S; ALENCASTRO, R. B., Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2. São Paulo, 2003.

FINELLI, F. G., SANTOS, B. M. S., FROTA, L. C. R. M. Organocatálise enantiosseletiva: evolução e aspectos recentes. **Química Nova**. Curitiba, v. 42, n. 4, 2019.

FISER, Albert. Template-Based Protein Structure Modeling. **Methods in molecular biology**, Índia, v. 673, p. 73-94, 2010.

FISER A; SALI A. Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. **Methods in Enzymology**, Índia, v. 374, p. 461-91, 2003.

FORMAN, S. E. Synthesis of Oximes. **Journal of Organic Chemistry**, Canadá, v. 29, n. 11, p. 3323-3327, 1964.

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

GONTIJO, B., CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Minas Gerais, v. 36, p. 71-80, 2003.

GOPALSAMY, A. *et al.* 1,2,4-Oxadiazolidin-3,5-diones and 1,3,5-triazin-2,4,6-triones as cytosolic phospholipase A2 inhibitors, Bioorganic and Medicinal. **Chemistry Letters**, EUA, v. 16, n. 11, p. 2978-2981, 2006.

GRANT, K. M. *et al.* Inhibitors of Leishmania mexicana CRK3 cyclin-dependent kinase: chemical library screen and antileishmanial activity. **Antimicrobial Agents Chemotherapeutics**, Glasgow, v. 48, n. 8, p. 3033-3042, 2004.

GRIMBLAT, S. *et al.* A theoretical study of the Duff reaction: insights into its selectivity. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Buenos Aires, v. 44, p. 546-557, 2016.

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

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

HASSAM, M. *et al.* Isomerization of Allylbenzenes. **Chemical Reviews**, África do Sul, v. 115, n. 11, p. 5462-5569, 2015.

HINCHLIFFE, A. *Molecular Modeling for Beginners*. WILEY. Manchester, UK. 2003.

HOLTJE, H. D., *et al.* Introduction to comparative protein modeling. **Molecular Modeling: Basic Principles and Applications**, EUA, p. 87-143, 2003.

JOHNSON Morris. *et al.* NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic Acids Research**, Canadá, v. 36, p. 5005-5009, 2008.

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

KAISER, E., *et al.* Base-catalyzed rearrangements of allylphenols and haloallylphenols. **Journal of Organic Chemistry**, Kansas, v. 27, p. 2931-2933, 1962.

KARABATSOS, G. J.; HIS, N. Structural Studies by Nuclear Magnetic Resonance-XI; Conformations and configurations of oxime O-Methyl Ethers. **Tetrahedron**, EUA, v. 23, n. 3, p. 1079-1091, 1967.

KAYE, Paul; SCOTT, Peter. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, EUA, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KIASAT, A. R., *et al.* A clean conversion of carbonyl compounds to oximes using silica gel supported hydroxylamine hydrochloride. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements**, Irã, v. 179, n. 6, 2004.

KHOR, B. Y., TYE, G. J., & LIM, T. S., The Structure and Dynamics of BmR1 Protein from *Brugia malayi*: In Silico Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, Malásia, v. 15, n. 6, p. 11082-11099, 2014.

KLOSIN, J. *et al.* Di- and tri-heteroatom substituted indenyl metal complexes. Midland(US), **WO2000069871A1**. 23 de Novembro de 2000.

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

KÜRTI, L.; CZAKÓ, B. Strategic applications of named reactions in organic

synthesis: Background and detailed mechanisms. **Elsevier Academic Press**, Hungria, n. 228, p. 25-32, 2005.

LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., *et al.* ClustalW and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Inglaterra, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LASKOWSKI R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst**, Alemanha, v. 26, p. 283-293, 1993.

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

LI, C. B; *et al.* A convenient and efficient procedure for oxime ethers. **Chinese Chemical Letters**, China, v. 13, p. 95, 2002.

LIMA, M. E. F. **Síntese e avaliação farmacológica de novos derivados análogos do Sulindac**. 1989, 75f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 1989. Disponível em: https://farmacologia.icb.ufrj.br/posgraduacao/Doc_Pat/Defesas/1989/D245MarcoEdilsonFrancoLima.pdf. Acesso em: 25 jul. 2020.

LIMA, M. E. F., GABRIEL, A. J. A., CASTRO, R. N. Synthesis of a New Strigol Analogue fer corom Natural Safrole. **Journal Brazilian Chemical Society**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 371-374, 2000.

LINDOY, L. F., MEEHAN, G. V., SVENSTRUP, N. Mono- and Diformylation of 4-Substituted Phenols: A New Application of the Duff Reaction. **Synthesis**. Austrália, p. 1029-1032, 1998.

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

LOVELL, S. C. *et al.* Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. **Proteins: Structure, Function & Genetics**, Reino Unido, v. 50, n. 3, p. 437-450, 2002.

MARSHALL, G. R. Introduction to chemoinformatics in drug discovery - a personal view. **Chemoinformatics in drug discovery**, EUA, p. 1-22. 2005.

MICHELETTI, A. C.; BEATRIZ, A. Progressos recentes na pesquisa de compostos orgânicos com potencial atividade leishmanicida. **Revista Virtual de Química**, Pernambuco, v. 4, n. 3, p. 268-286, 2012.

MIKHALEVA, A. I; ZAITSEV, A. B.; TROFIMOV, B. Oximes as reagents. **Russian Chemical Reviews**, Rússia, v. 75, n. 9, p. 797-823, 2006.

MISHRA, J. *et al.*, Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current Medicinal Chemistry**, Índia, v. 14, p.1153-1162, 2007.

MOHOTTALAGE, S., TABACCHI, R., GUERIN, P. M. Components from Sri Lankan *Piper betle* L. leaf oil and their analogues showing toxicity against the housefly, *Musca domestica*. **Flavour and Fragrance Journal**. Sri Lanka, v. 22, p. 130-138, 2007.

MONZOTE, L. *et al.* Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105 n. 2 Rio de Janeiro – Março/ 2010.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. **Editora Livraria da Física**. São Paulo, 2007.

MORRIS, A.L *et al.* Stereochemical quality of protein structure coordinates. **Proteins**, EUA, v. 12, p. 345-364; 1992.

MOTT, B. T., *et al.* Identification and Optimization of Inhibitors of Trypanosomal Cysteine Proteases: Cruzain, Rhodesain, and TbCatB. **Journal of Medicinal Chemistry**, Inglaterra, v. 53, n. 1, p. 52–60, 2010.

MOTTRAM, J. C. *et al.* The Multiple cpb Cysteine Proteinase Genes of *Leishmania mexicana* Encode Isoenzymes That Differ in Their Stage Regulation and Substrate Preferences. **The Journal of Biological Chemistry**, Estados Unidos da América, v. 272, n. 22, p. 14285-14293, 1997.

NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M.; BLANCO, V. R. Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. **Revista Virtual Química**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 861-876, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal Of Natural Products**, EUA, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NIWA, H. *et al.* Sterrocontrolled total synthesis of (+/-)-hydroxy patchouli alcohol and the corresponding (+/-)-carboxylic acid, metabolites of patchouli alcohol, and (+/-)-norpatchoulenol. **Tetrahedron Letters**, EUA, v. 25, n. 6, p. 2797-2800, 1984.

OLIVEIRA, A. M. **Introdução à Modelagem Molecular Para Química, Engenharia e Biomédicas**. 1. ed. Curitiba: Editora Appris, 2018.

OLIVEIRA, C. H. A. *et al.* Chemoselective and regiospecific formylation of 1phenyl-1H-pyrazoles through the Duff reaction. **Synthetic Communications**, Minas Gerais, v. 10, p. 425-436, 2012.

PACHECO, A. G. M. **Modelagem molecular comparativa e estudos De acoplamento molecular da enzima Lanosterol 14á-desmetilase do *moniliophthora Perniciosa***. 2009. 93f .Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009. Disponível em: <https://tede.uefs.com/8443/dissert/1260/Ana%Garcia%Marques%Pacheco>.

Acesso em: 11 mai. 2020.

PAGADALA, N.; SYED, K. & TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Review**, Turquia, v. 9, p. 91-102, 2017.

PARK, Y. T.; RAMALINGAN, C.; KABILAN, S. Synthesis, stereochemistry, and antimicrobial evaluation of substituted piperidin-4-one oxime ethers. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Índia, v. 41, p. 683-696, 2006.

PAUL, S., GUPTA, M., GUPTA, R. Vilsmeier Reagent for Formylation in Solvent-Free Conditions using Microwaves. **Synlett**, Canadá, n. 8, p. 1115-1118, 2000.

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

PEDRIQUE, B. *et al.*, The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000 e 11): asystemic assessment, *Lancet Glob. Health*, Inglaterra, v. 1, p. 371-379, 2013.

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

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

PIEPER, U. *et al.*, ModBase, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. **Nucleic Acids Research**, Iraque, v. 42, p. 111, 2013.

PUPKIS, M. F. & COOMBS, G. H., Purification and Characterization of Proteolytic Enzymes of *Leishmania mexicana mexicana* Amastigotes and Promastigotes. **General Microbiology**, Escócia, n. 130, p. 2375, 1984

PRAJAPATI, V. K. & PANDEY, R. K. Molecular and immunological toxic effects of nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**. Índia, v. 107, p. 1278-1293, 2017.

RANU, B. C; JANA, U. A. New Redundant Rearrangement of Aromatic Ring Fused Cyclic α -Hydroxydithiane Derivatives. Synthesis of Aromatic Ring Fused Cyclic 1,2-Diketones with One-Carbon Ring Expansion. **Journal Organic Chemistry**, Índia, v. 64, p. 6380-6386, 1999.

ŘEZNIČKOVÁ, E. *et al.* 2,6,9-Trisubstituted purines as CRK3 kinase inhibitors with antileishmanial activity in vitro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. República Tcheca, v. 25, n. 11, p. 2298-2301, 2015.

ROGERS, B. N. *et al.*, Synthesis and biological evaluation of non-polyene analogs

of amphotericin B. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Califórnia, v. 7, p. 3177, 1997.

SALI A., OVERINGTON J. P. Derivation of rules for comparative protein modelling from a database of protein structure alignments. **Protein Science**, Nova Iorque, vol. 3, p. 1582-96, 1994.

SALI, A., BLUNDELL, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, Nova Iorque, v. 234, p. 779-815, 1993.

SANDER, C.; SCHNEIDER, R., Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. **Proteins**, Inglaterra, v. 9, n. 1, p. 56-68, 1991.

SANT'ANNA, C. M. R., Métodos de Modelagem Molecular para Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos: Uma Introdução. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 49 - 57, 2009.

SARKAR, S., GANGOPADHYAY, P. Use of Alumina in Preparation of Oxime: A Precursor for Beckmann Rearrangement. International. **Journal of Current Pharmaceutical Research**, Coréia do Sul, v. 7, n. 3, 2015.

SASTRY, S. **Nonlinear Systems: Analysis, Stability, and Control**. Califórnia: Springer, University of California, 2013.

Schrödinger Release 2019-4: Glide, **Schrödinger**, LLC, New York, NY, 2019.

Schrödinger Release 2019-4: Induced Fit Docking protocol; Glide, **Schrödinger**, LLC, New York, NY, 2019; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.

Schrödinger Release 2019-4: LigPrep, **Schrödinger**, LLC, New York, NY, 2019.

Schrödinger Release 2019-4: MacroModel, **Schrödinger**, LLC, New York, NY, 2019.

Schrödinger Release 2019-4: Prime, **Schrödinger**, LLC, New York, NY, 2019.

Schrödinger Release 2019-4: QikProp, **Schrödinger**, LLC, New York, NY, 2019.

Schrödinger Release 2019-4: Schrödinger Suite 2019-2 Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019; Impact, **Schrödinger**, LLC, New York, NY, 2019; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.

SCHRÖNDIGER RELEASE 2019-4. Maestro. **Schröndiger**, LLC, 2019.

SILVA, B. V. *et al.* Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, 2009.

SILVA-LOPEZ, R. E. Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v.33, n.7, São Paulo 2010.

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

SØRENSEN, M.; NEILSON, E. H. J.; MØLLER, B. L. Oximes: Unrecognized Chameleons in General and Specialized Plant Metabolism. **Molecular Plant**, Dinamarca, v. 11, n. 1, p. 95-117, 2018.

SOARES-BEZERRA, R. J. et al., Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Minas Gerais, v. 40, n. 2, 2004

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, v. 1. 9. ed. EUA: LTC, 2009.

SOUZA, M. V. N., ALMEIDA, M. V. Reações de ortometalação em piridinas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, 2002.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, Grã Bretanha, V. 82, n. 10, p. 1-17, 2017.

SU, W., *et al.* Recent Progress in the Use of Vilsmeier-Type Reagents. Organic Preparations and Procedures International/The New. **Journal for Organic Synthesis**, China, v. 42, n. 6, p. 503-555, 2010.

SURWASE, S. M.; MANE, Y. D.; SURWASE, M. M.; KHADE, B. C.; Synthesis of diverse(E)-2-((1H-imidazol-1-yl)methyl)-2-((benzyloxy)methyl)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one O-benzyl oxime derivatives as potent antileishmanial agents. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, Índia, v. 57, p. 724, 2019.

SVS/MS, Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde**. Cenários da leishmaniose visceral no Brasil, 2018. São Paulo/SP, 22 de abril de 2018: Ministério da Saúde. Disponível em:
<http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/apresentacao/simposio/v3._francisco_edilson_ferreira_lima_jr._cenarios_da_lv_e_perspectivas.pdf> Acesso em: 10 de Julho de 2019.

TAYLOR, R. D., JEWSBURY, P. J., ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of computer-Aided Molecular Design**. Bélgica, v. 16, p. 151-166, 2002.

VICIK, R. et al. Aziridide-based inhibitors of cathepsin L: Synthesis, inhibition activity, and docking studies. **ChemMedChem**, Itália, v. 1, p. 1126–1141, 2006.

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

WATERHOUSE, A., *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, EUA, v. 46, p. 296-303, 2018.

WHO. Control of the leishmaniasis. 2010. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf;jsessionid=69FEE008C6B5EAAFFDE3571470948269?sequence=1>. Acesso em: 11 de jun. 2019.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Health Observatory (GHO) data. Leishmaniasis. Situation and trends, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/>. Acessado em: 10 de Julho de 2018.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>>. Acessado em: 10 de Julho de 2018.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acessado: 10 de Julho de 2019.

WIEDERSTEIN, M., SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. v. 35, p. 407-410, 2007.

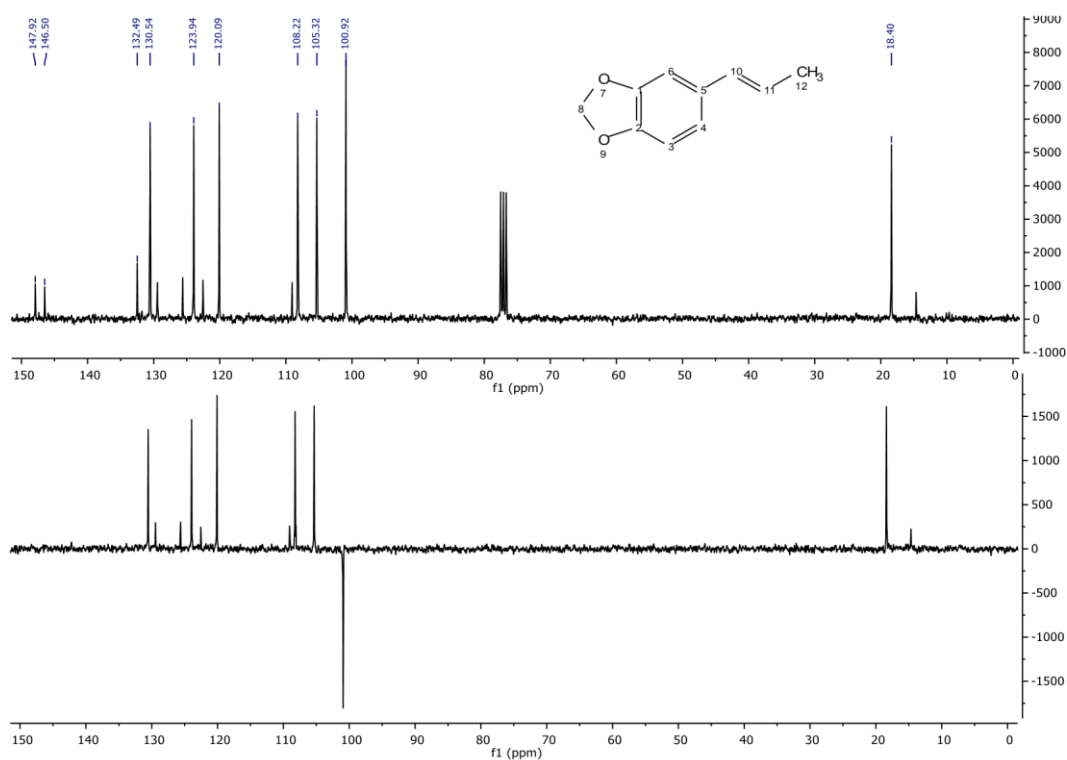
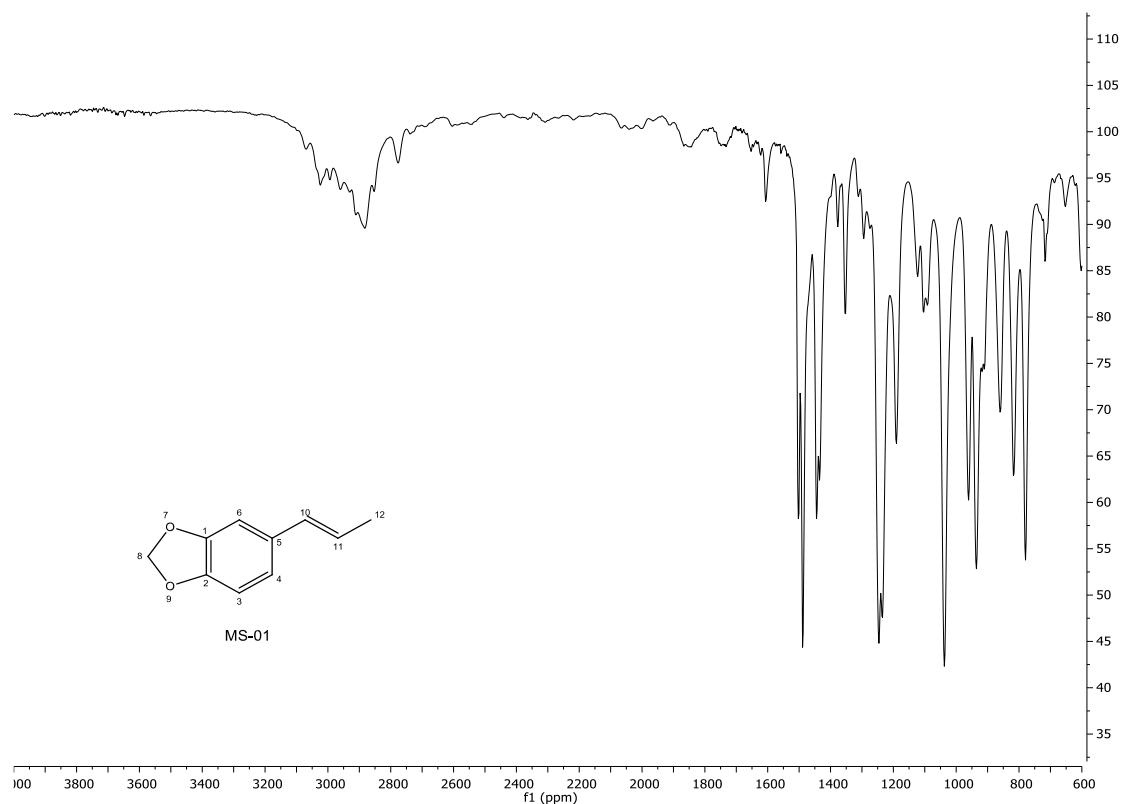
WITIAK, D.T. *et al.* Vilsmeier-Haack cyclizations: Synthesis of 2-substituted, 3-dimethylamino-5, 6-methylenedioxyindenes and corresponding indanones. **Journal Organic Chemistry**, EUA, v.39, n. 9, p.1242-1247, 1974.

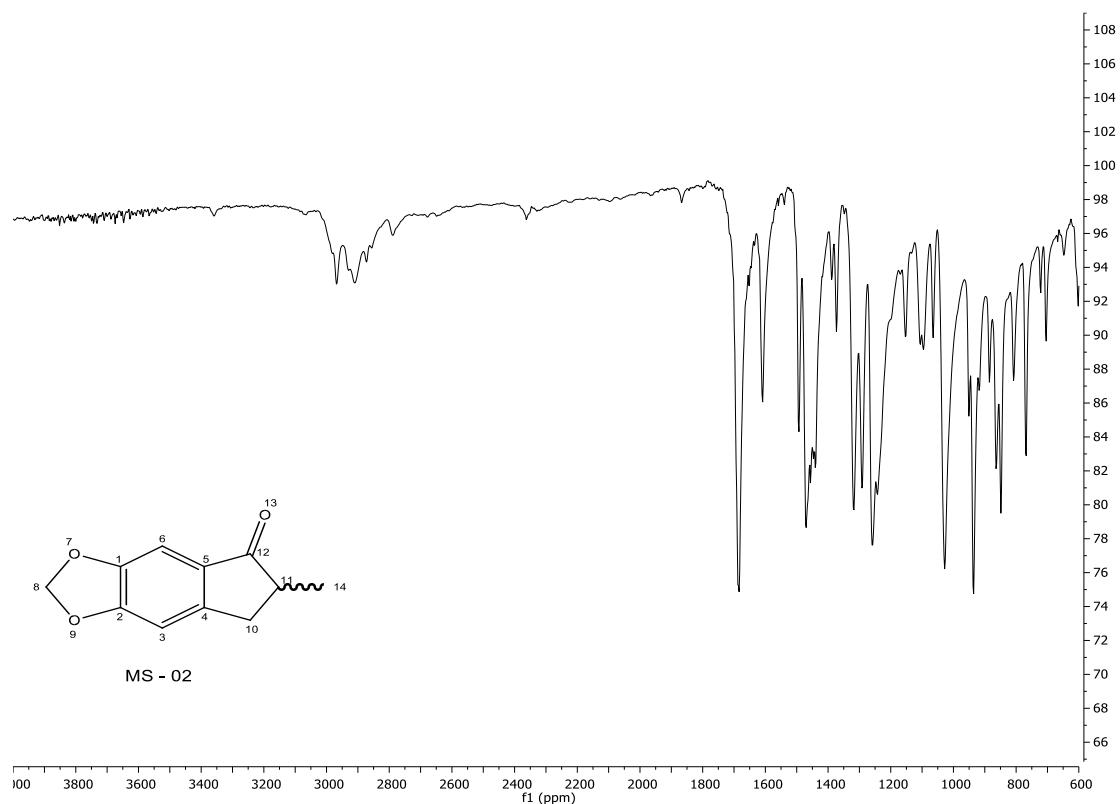
WOOD, D. J. *et al.* Differences in the Conformational Energy Landscape of CDK1 and CDK2 Suggest a Mechanism for Achieving Selective CDK Inhibition. **Cell Chemical Biology**, EUA, v. 26, p. 121-130, 2019.

WYATT, P. G. *et al.* Identification of inhibitors of the Leishmania CDC-related protein kinase CRK3. **ChemMedChem**, Reino Unido, v. 6, p. 2214 – 2224, 2011.

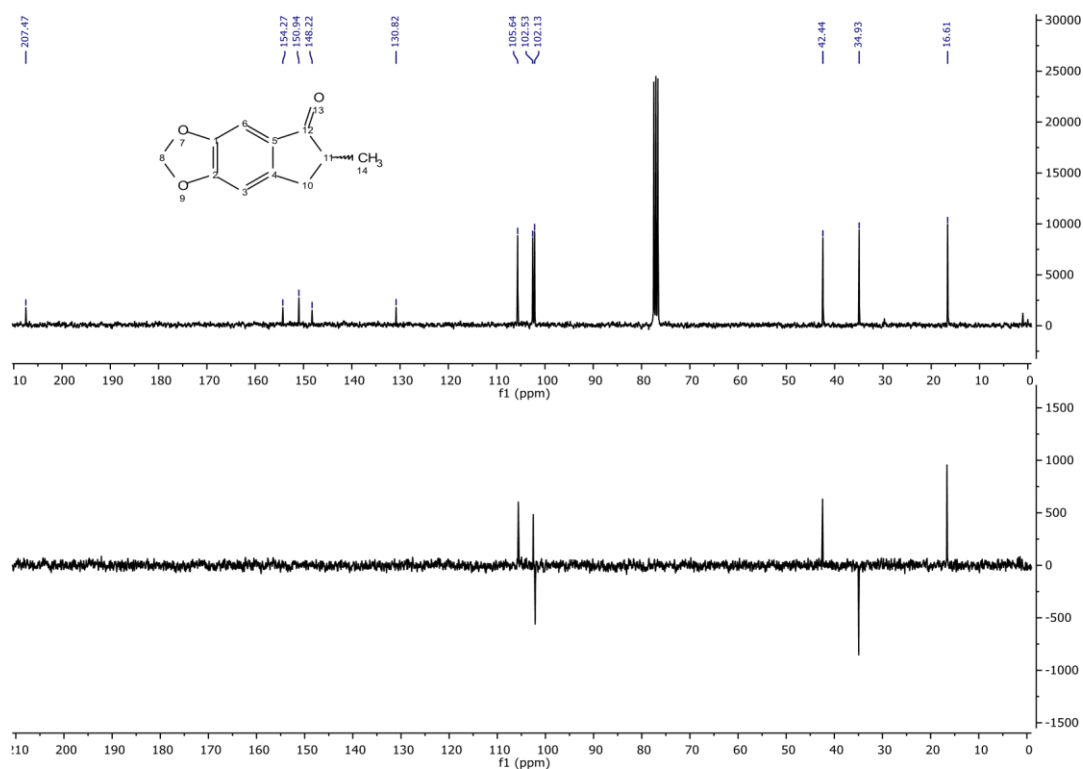
YUSUF, D. *et al.* An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Estados Unidos da América, v. 48, n. 7, p. 1411-22, 2008.

ANEXOS

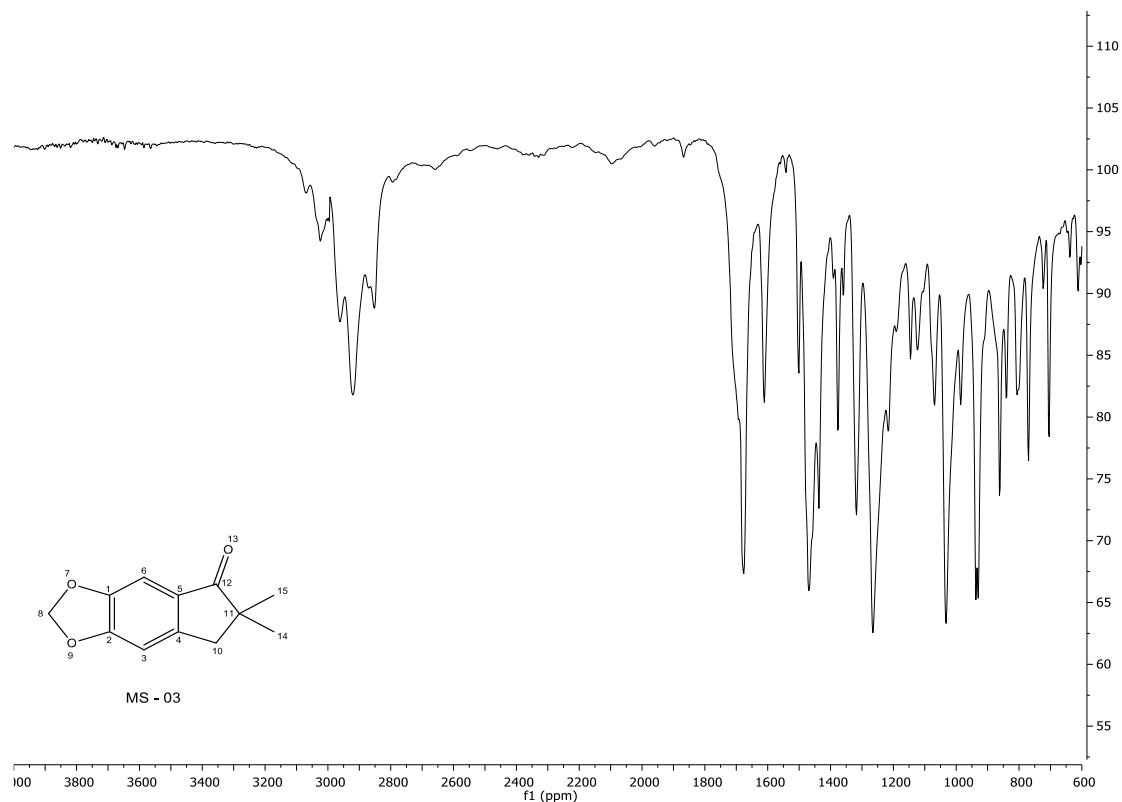




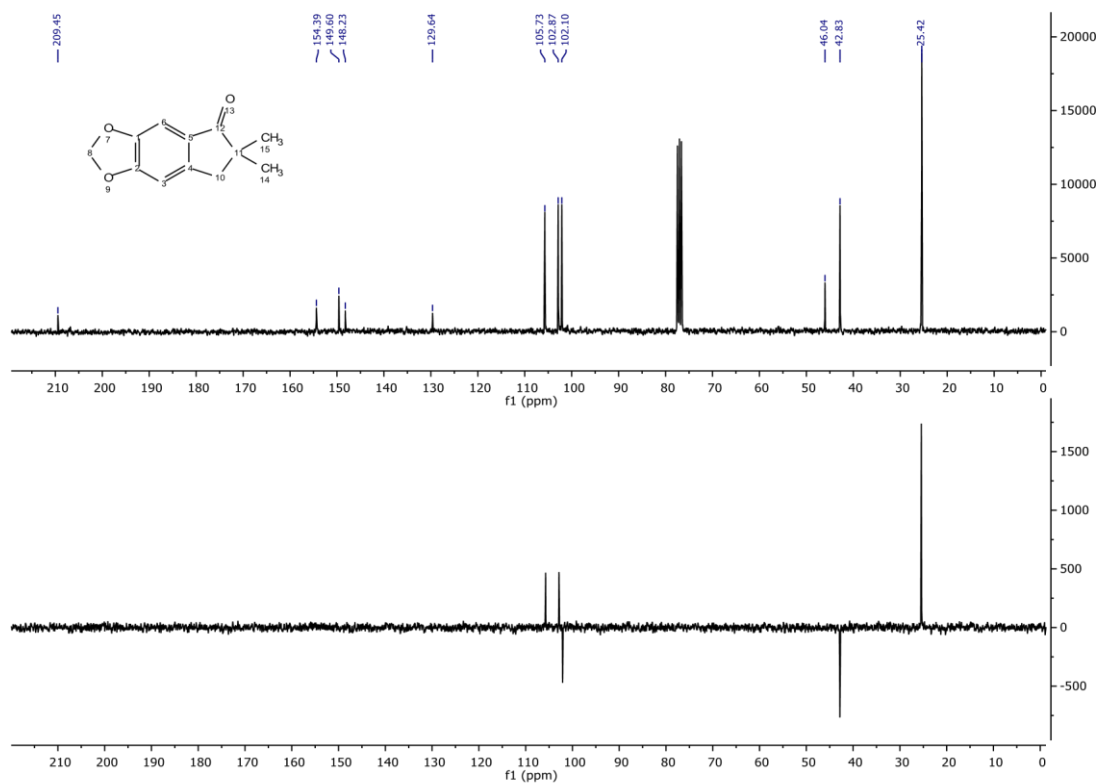
Espectro 3 - Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **MS-02** (cm^{-1}).



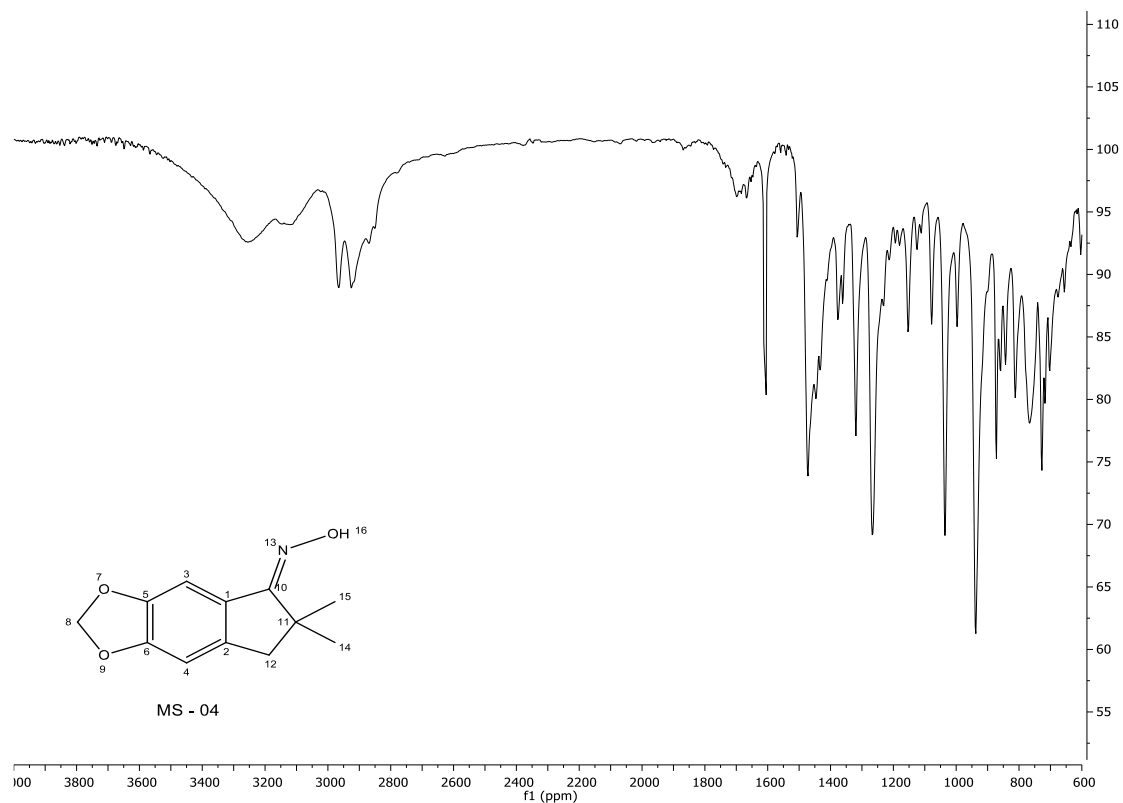
Espectro 4 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **MS-02** (CDCl_3 , 75 MHz).



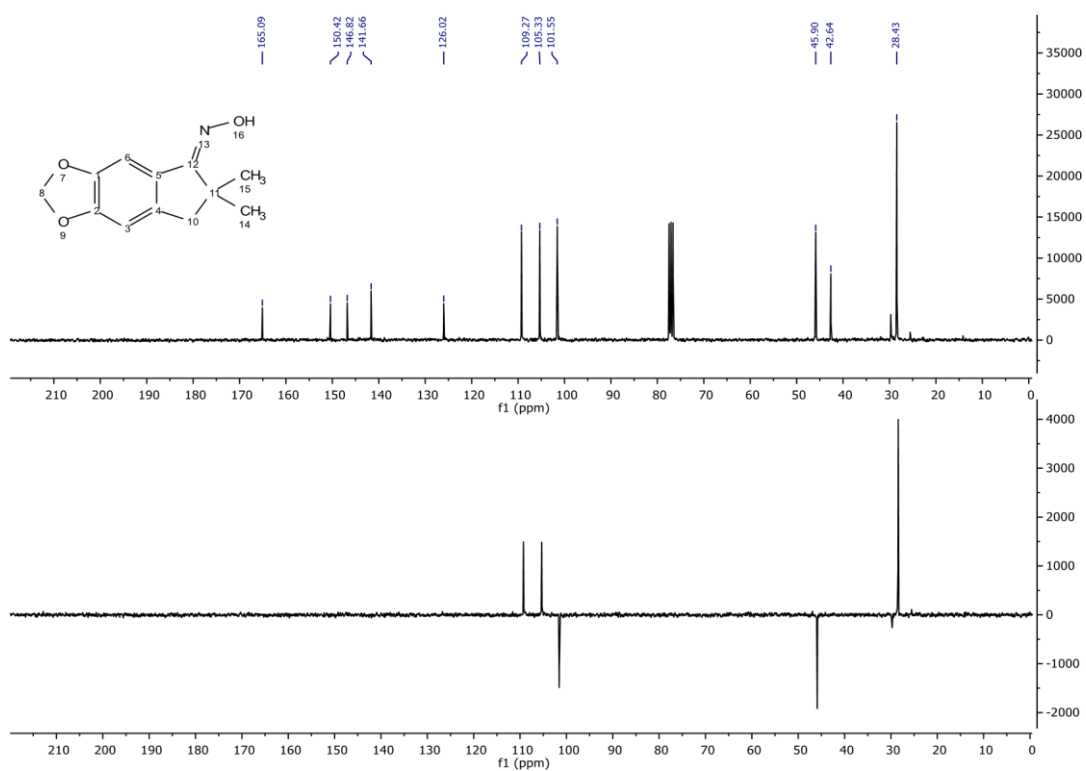
Espectro 5 - Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **MS-03** (cm^{-1}).



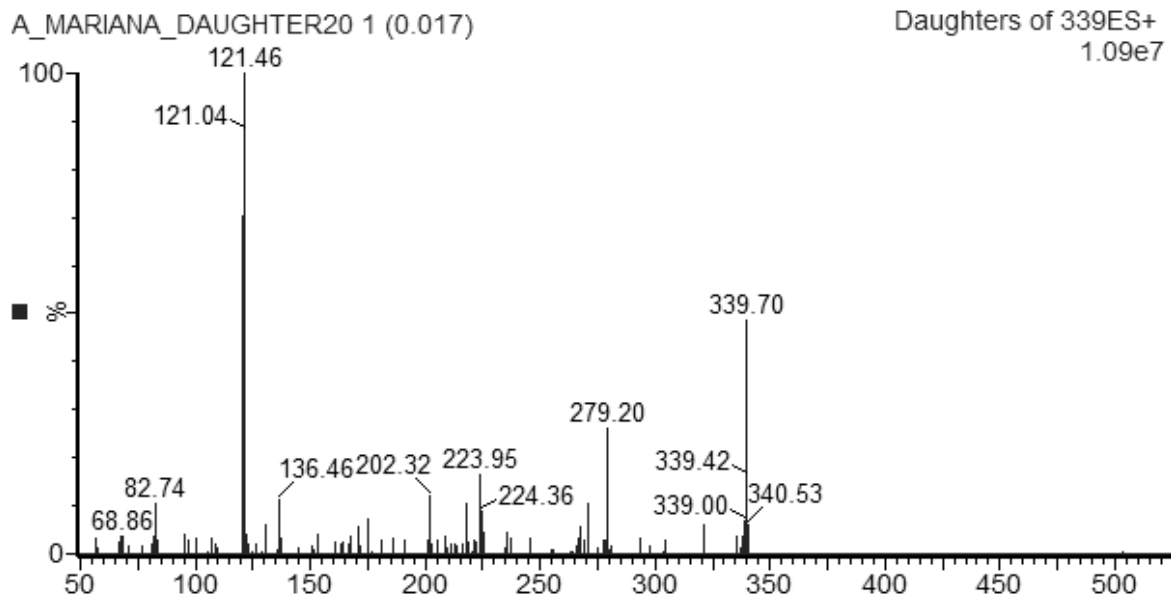
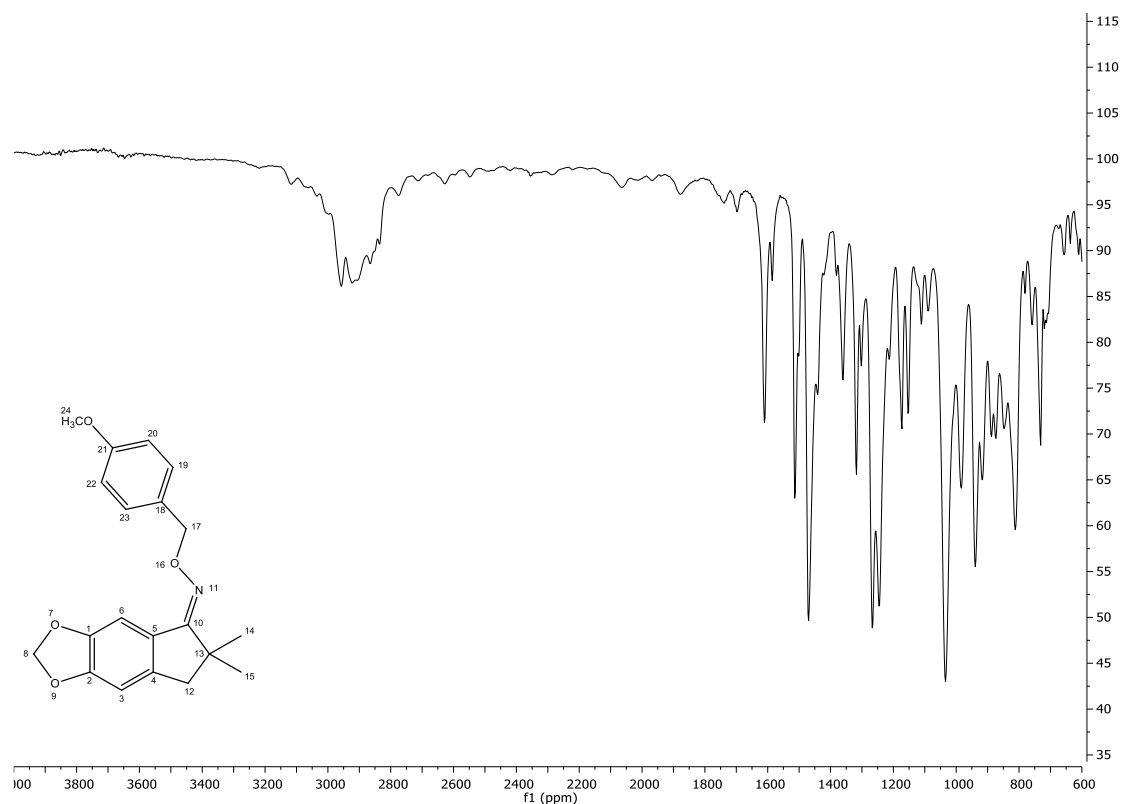
Espectro 6 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **MS-03** (CDCl_3 , 75 MHz).

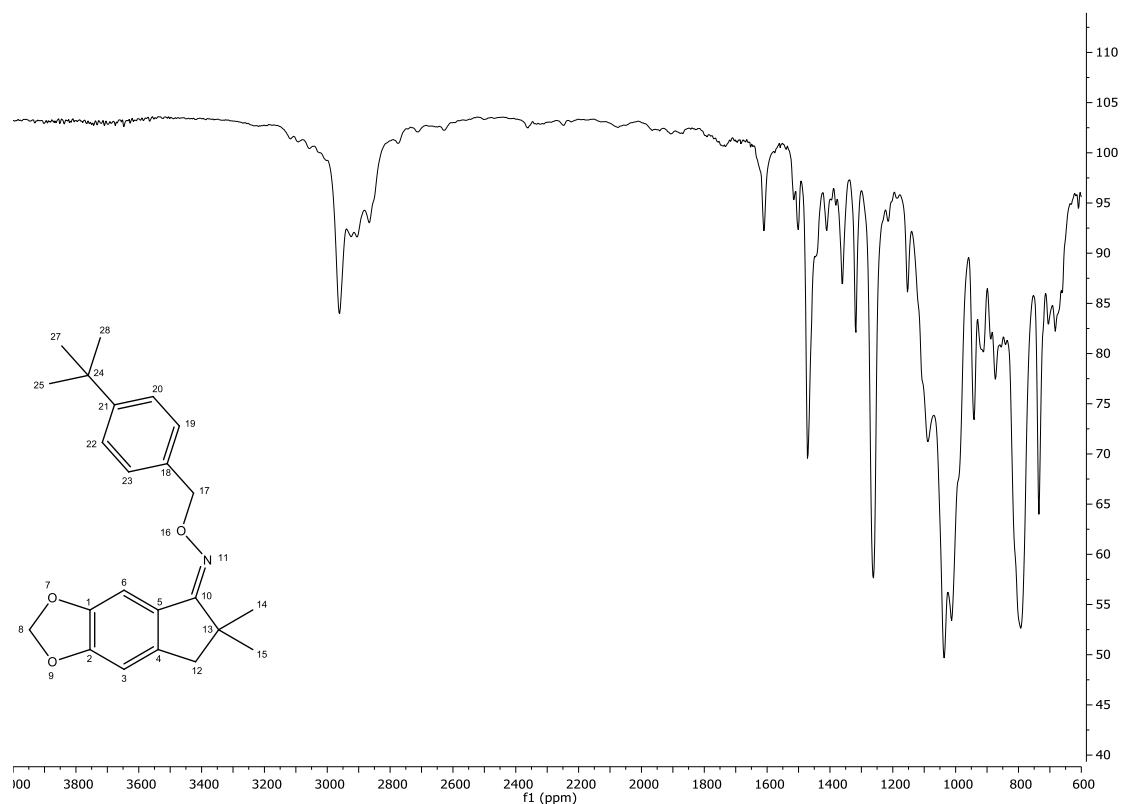


Espectro 7 - Espectro de absorção na região do IV da substância **MS-04** (cm^{-1}).

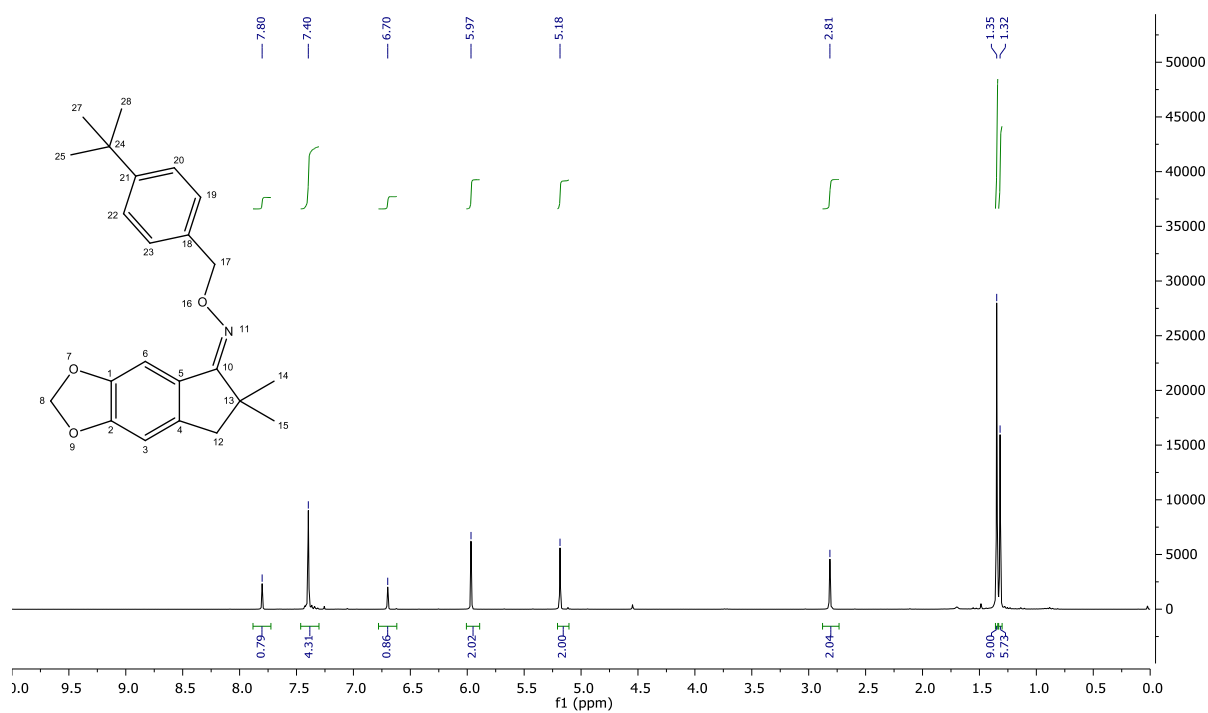


Espectro 8 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **MS-04** (CDCl_3 , 75 MHz).

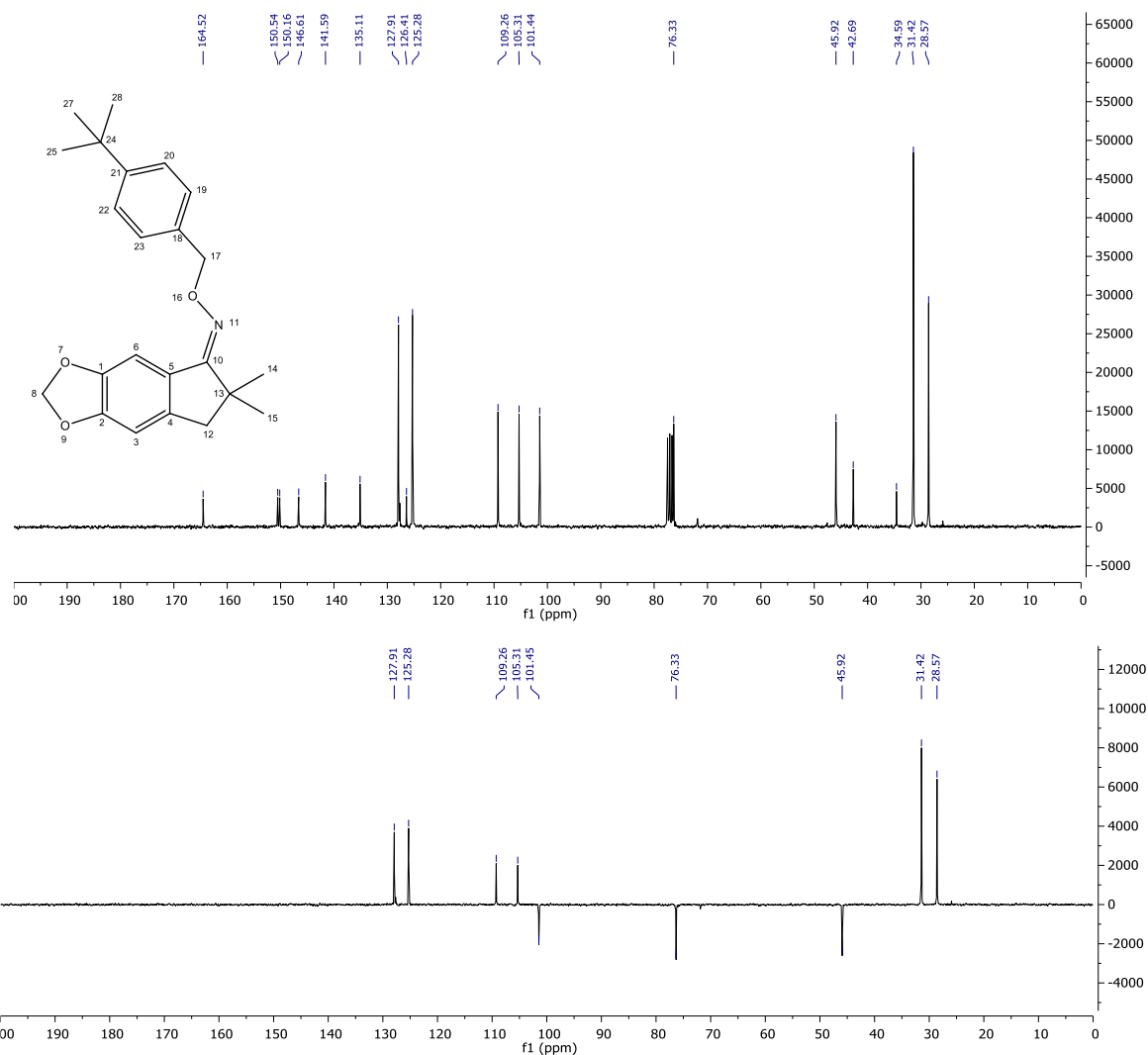




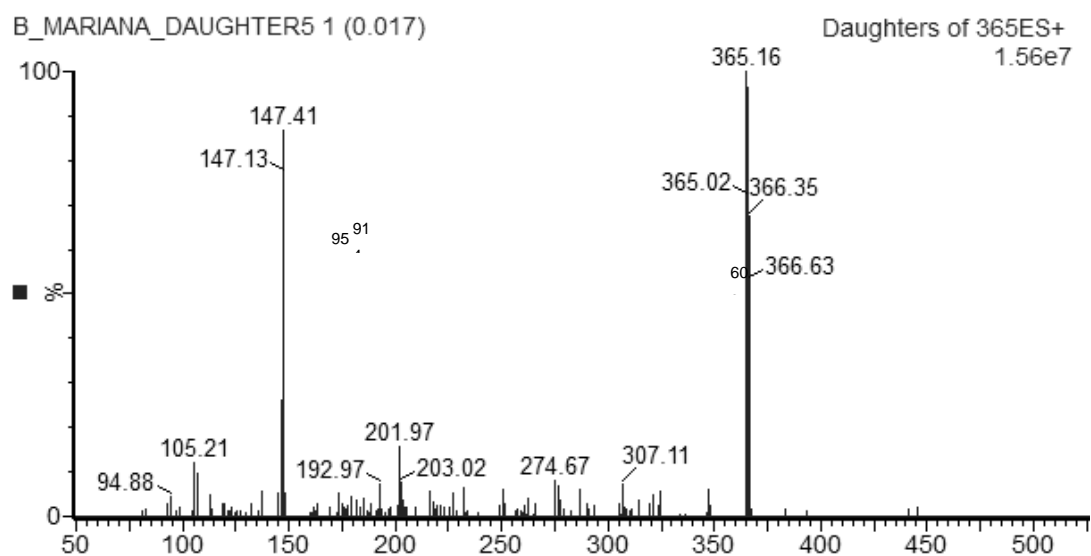
Espectro 11 - Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **MS-05b** (cm^{-1}).



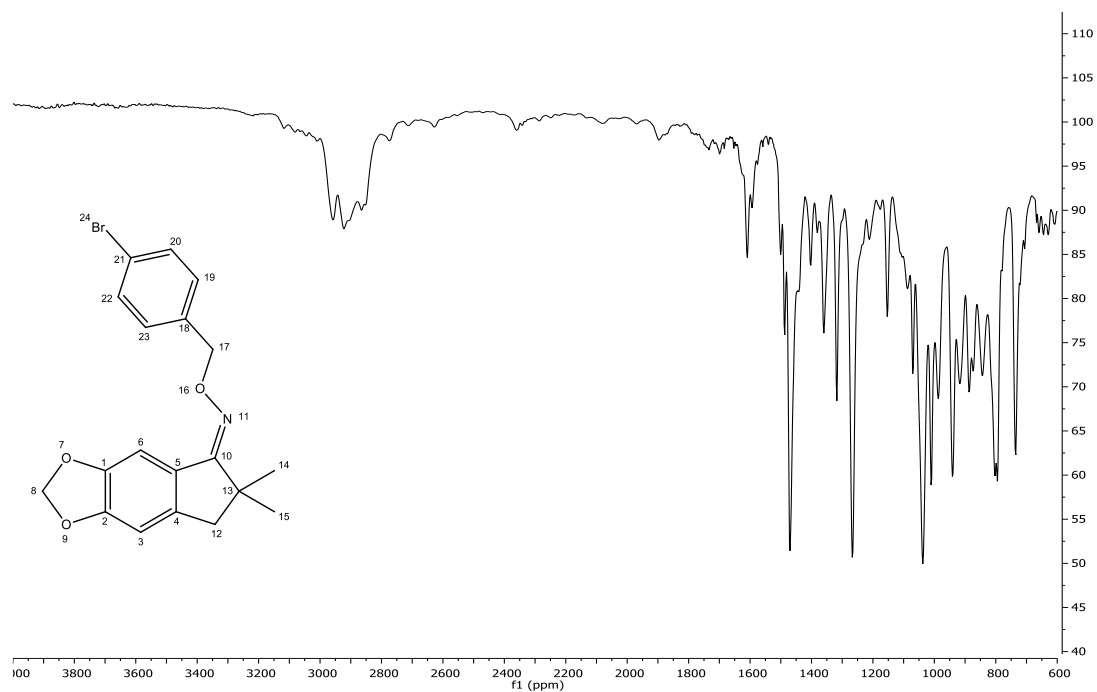
Espectro 12 - Espectro de RMN de ^1H da substância **MS-05b** (CDCl_3 , 300 MHz).



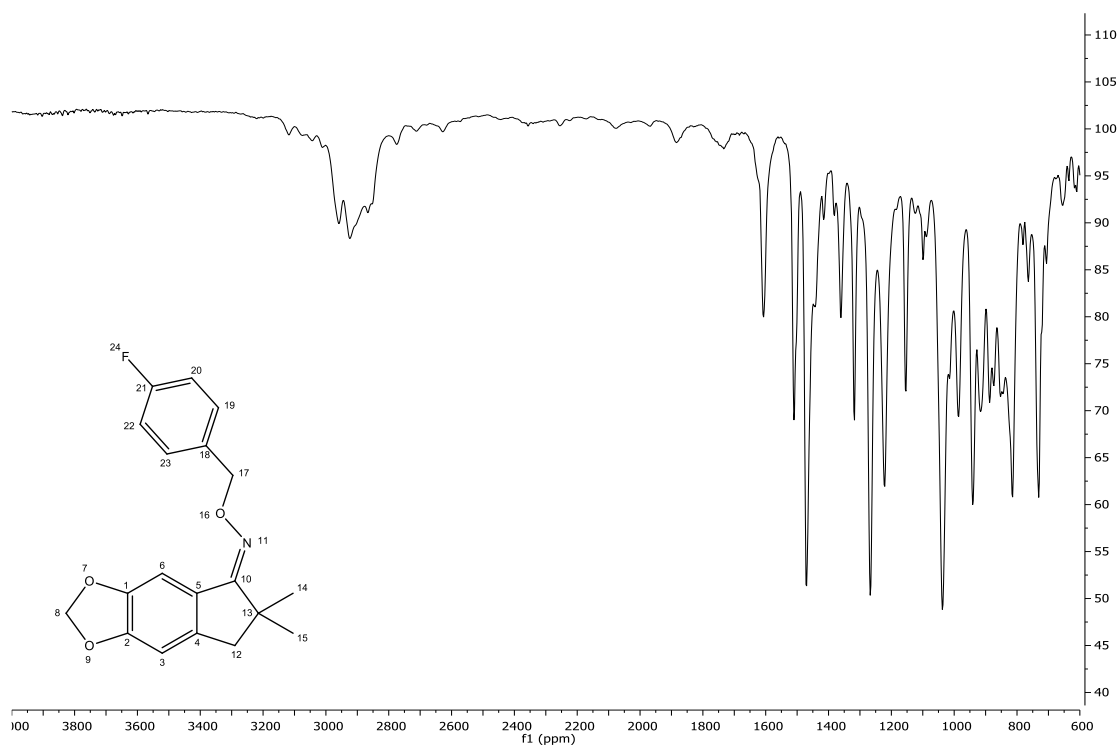
Espectro 13 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **MS-05b** (CDCl_3 , 75 MHz).



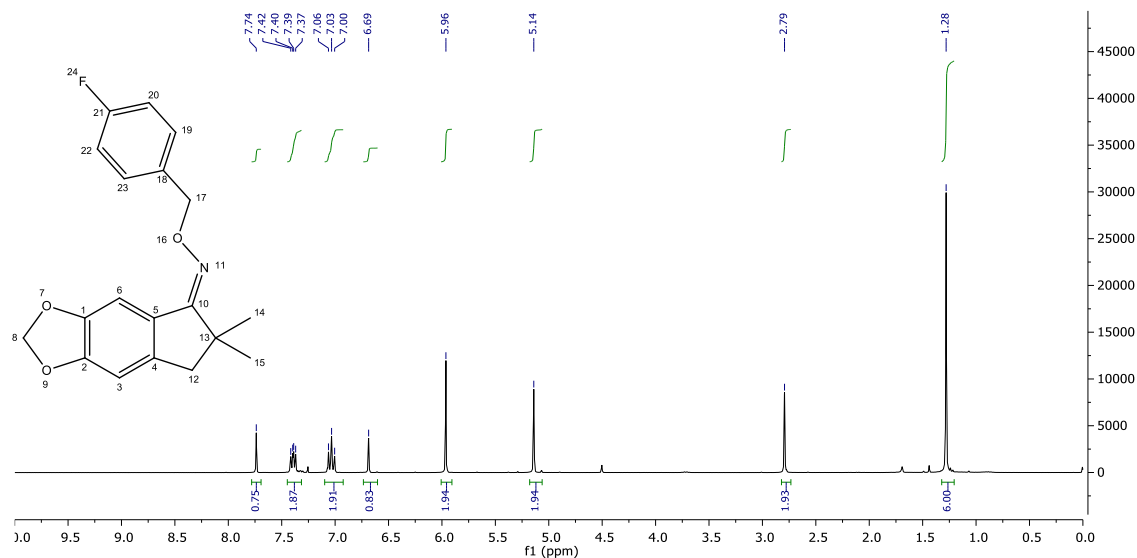
Espectro 14 – Espectro de massas da substância **MS05b**



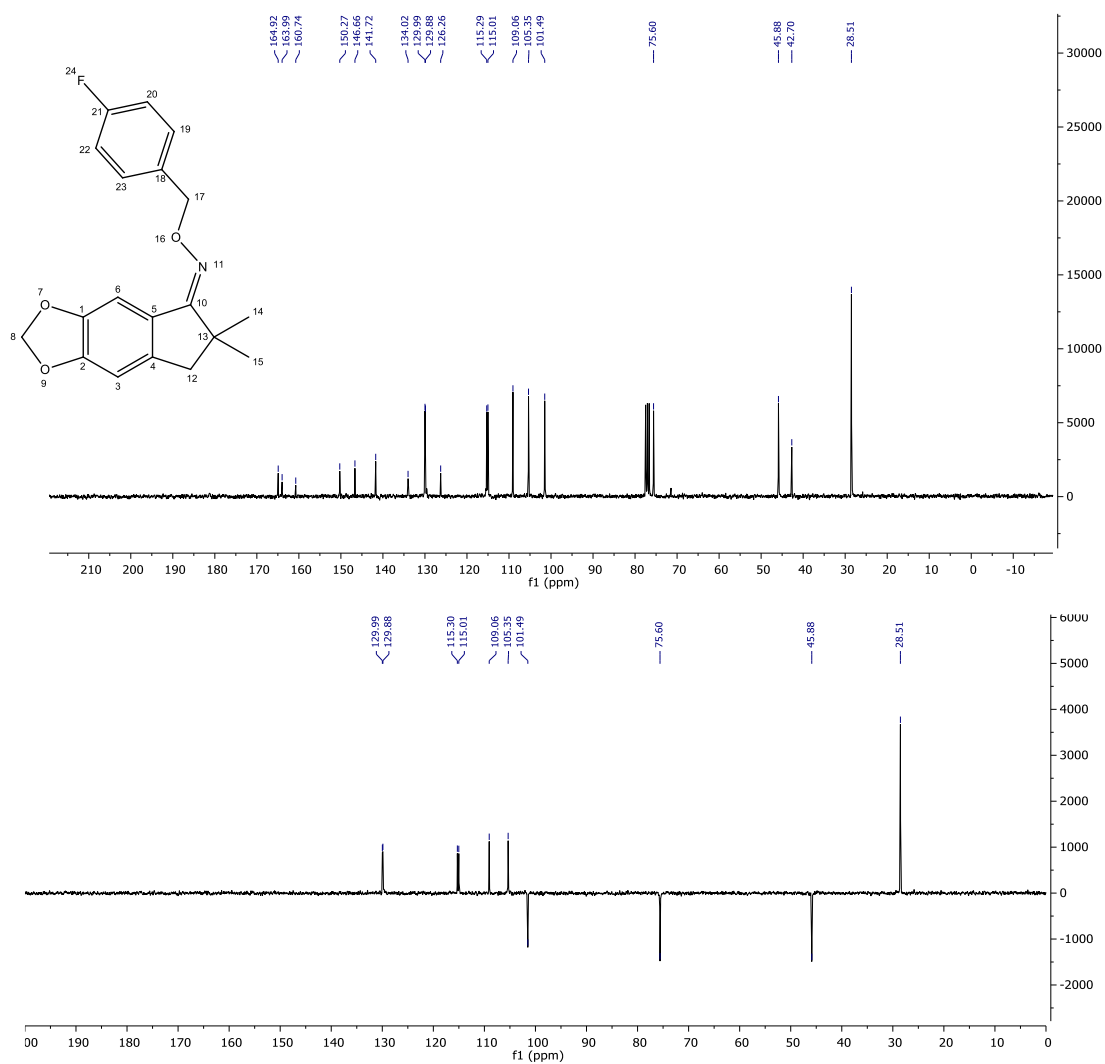
Espectro 15 - Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **MS-05c** (cm⁻¹).



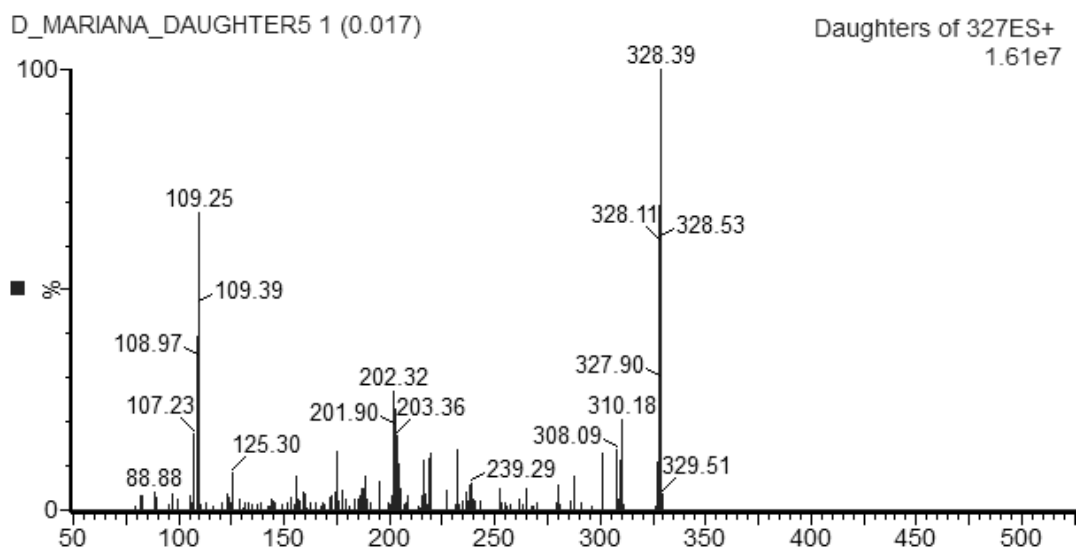
Espectro 16 - Espectro de absorção na região do IV da substância **MS-05d** (cm⁻¹).



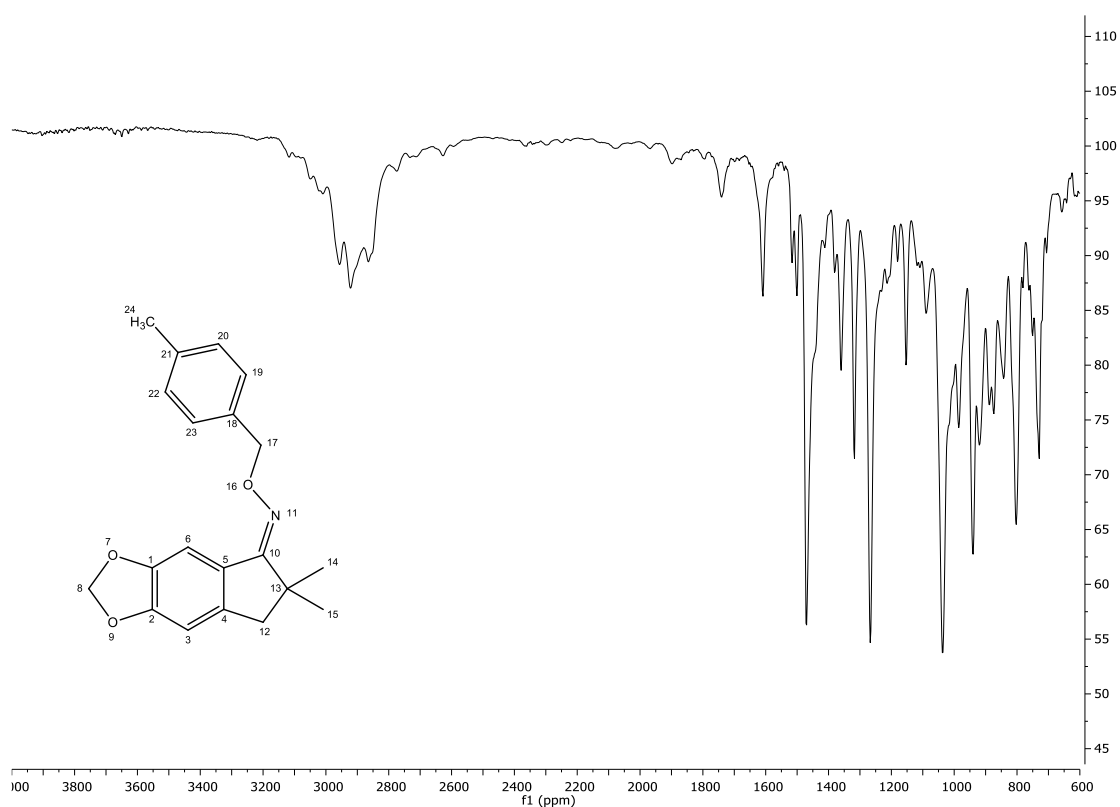
Espectro 17 - Espectro de RMN de ¹H da substância **MS-05d** (CDCl₃, 300 MHz).



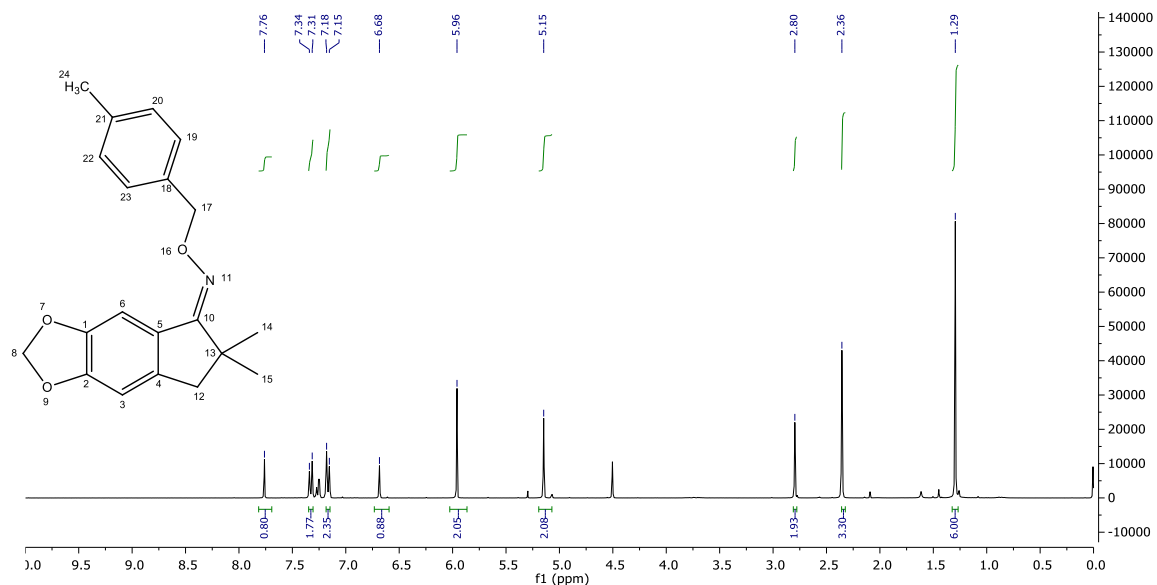
Espectro 18 - Espectro de RMN de ¹³C e Subespectro DEPT-135 de ¹³C da substância **MS-05d** (CDCl₃, 75 MHz).



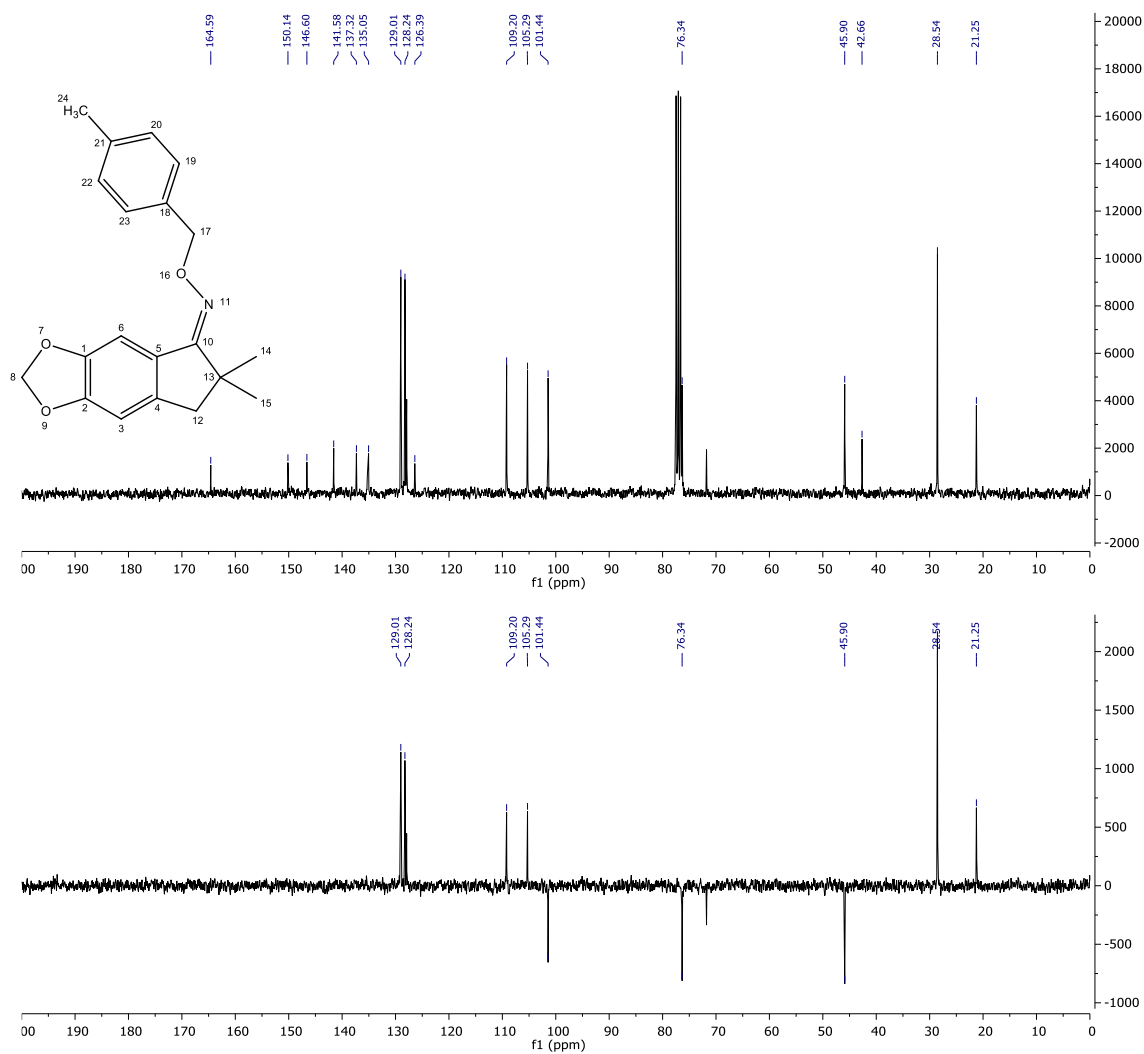
Espectro 19 – Espectro de massas da substância **MS05d**



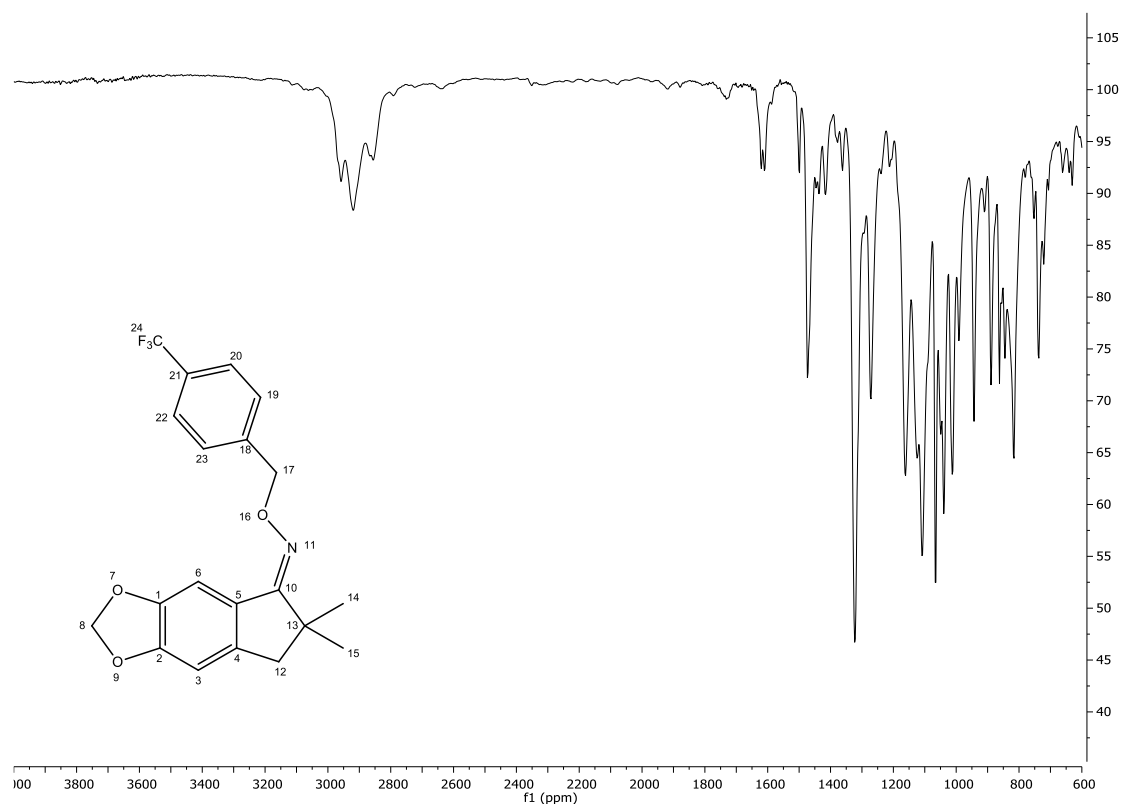
Espectro 20 - Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **MS-05e** (cm^{-1}).



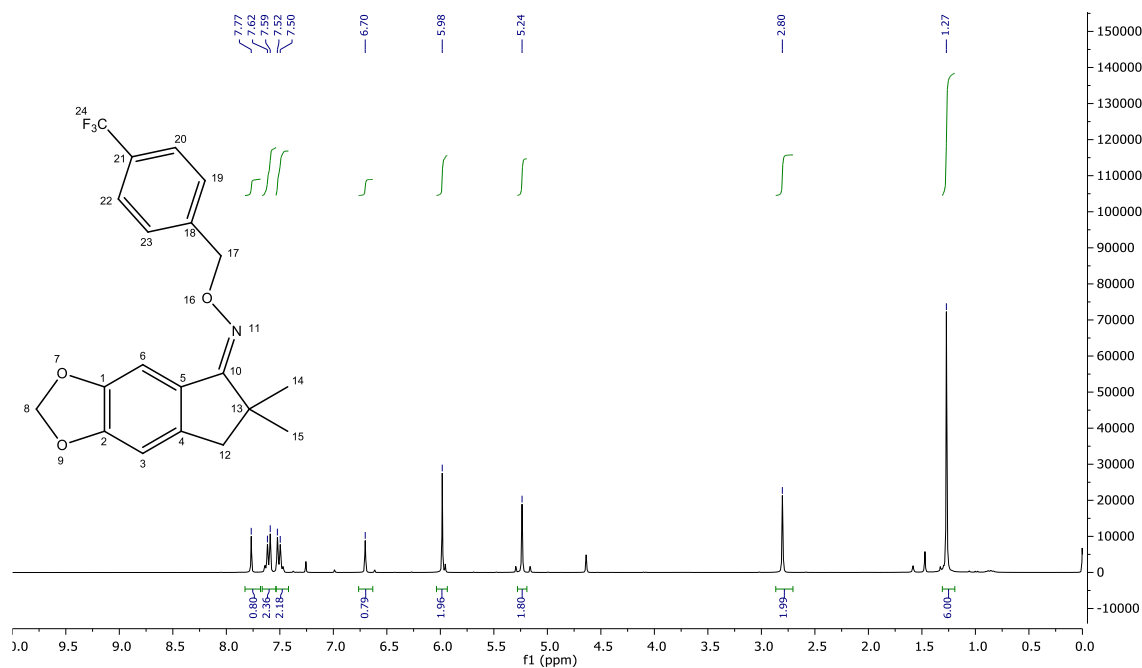
Espectro 21 - Espectro de RMN de ^1H da substância **MS-05e** (CDCl₃, 300 MHz).



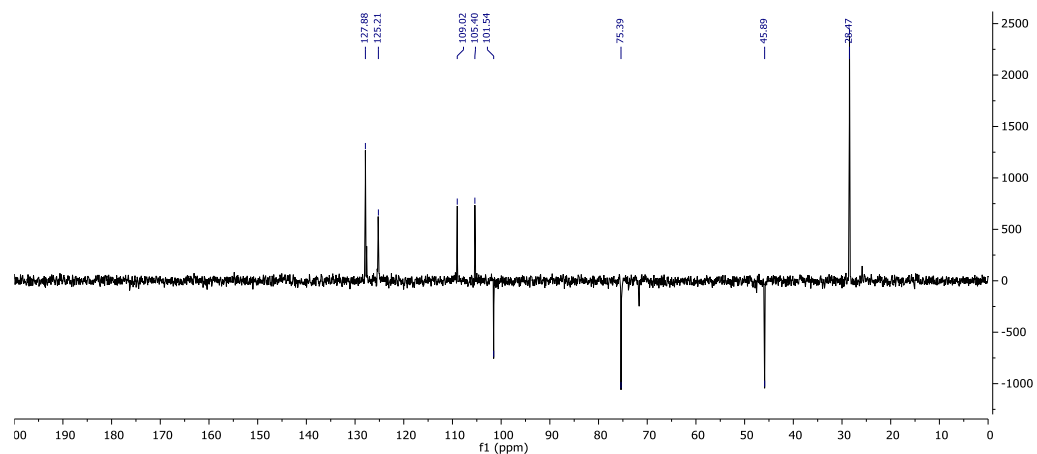
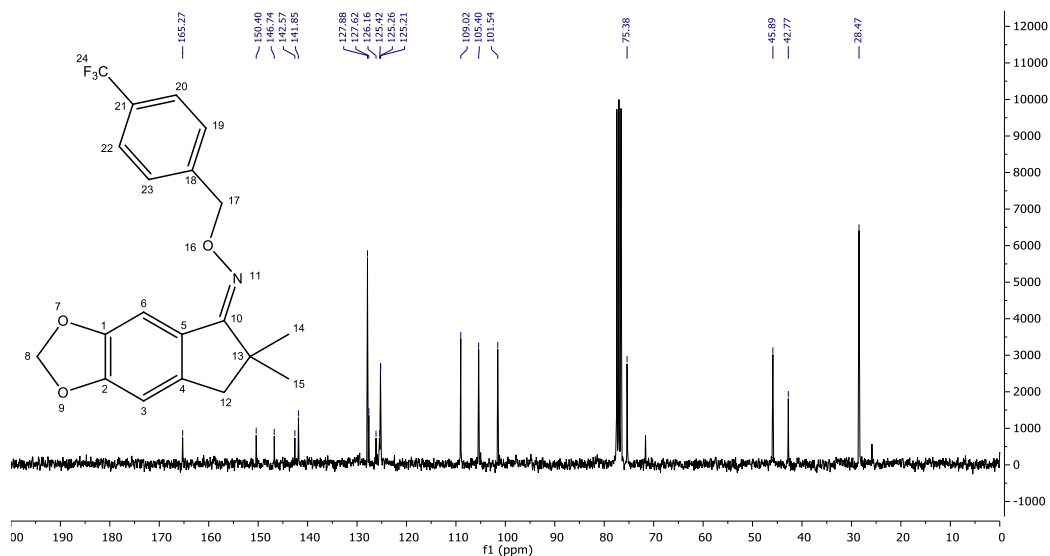
Espectro 22 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **MS-05e** (CDCl₃, 75 MHz).



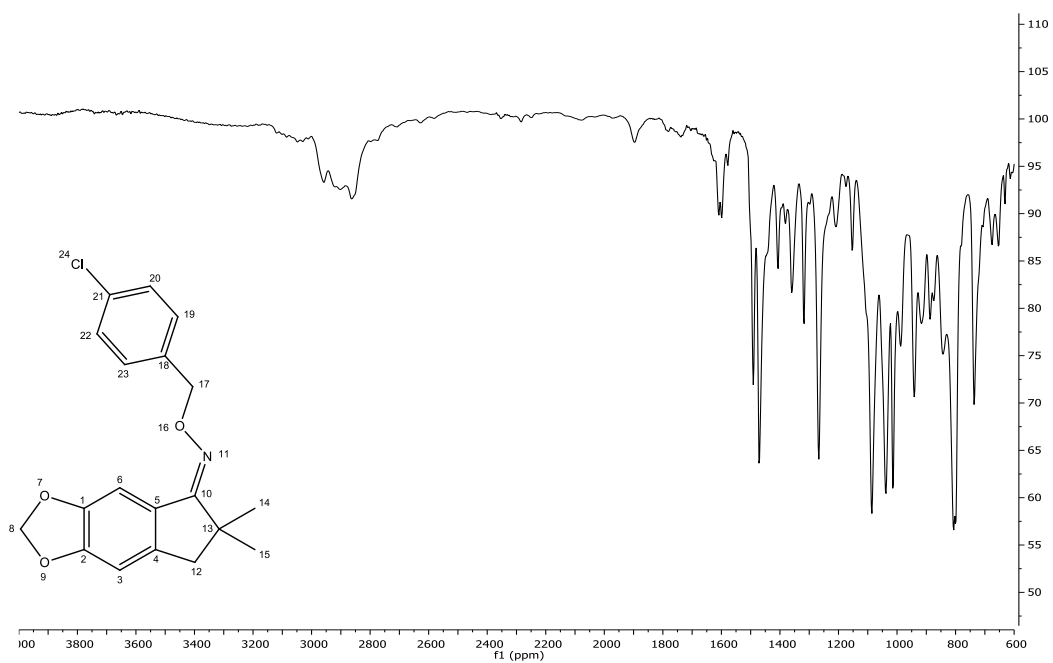
Espectro 23 - Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **MS-05f** (cm^{-1}).



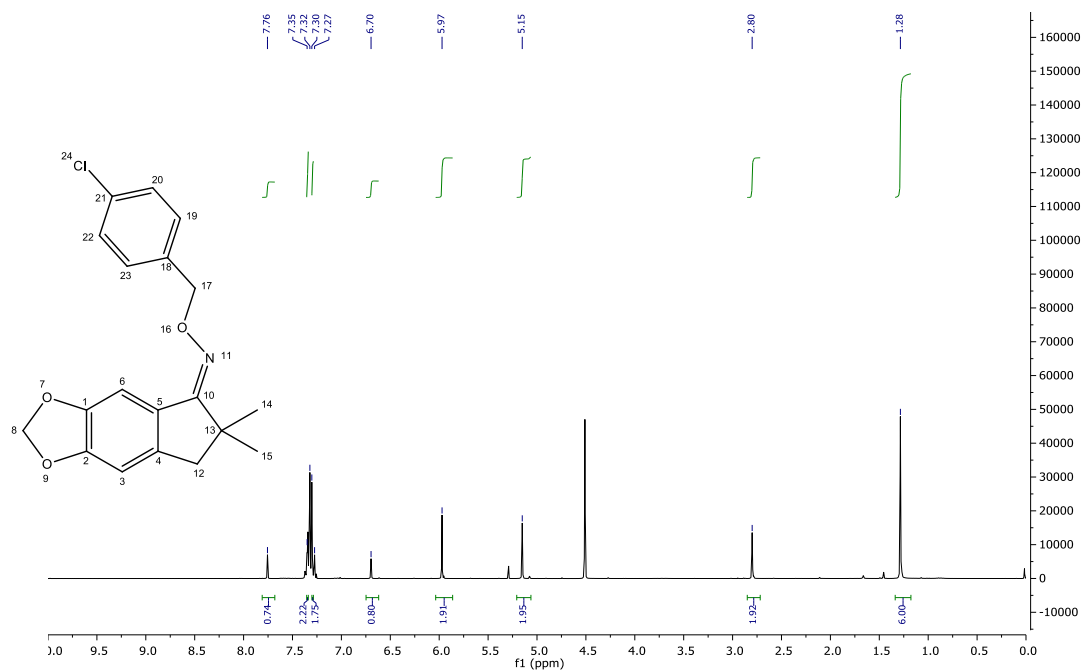
Espectro 24 - Espectro de RMN de ^1H da substância **MS-05f** (CDCl_3 , 300 MHz).



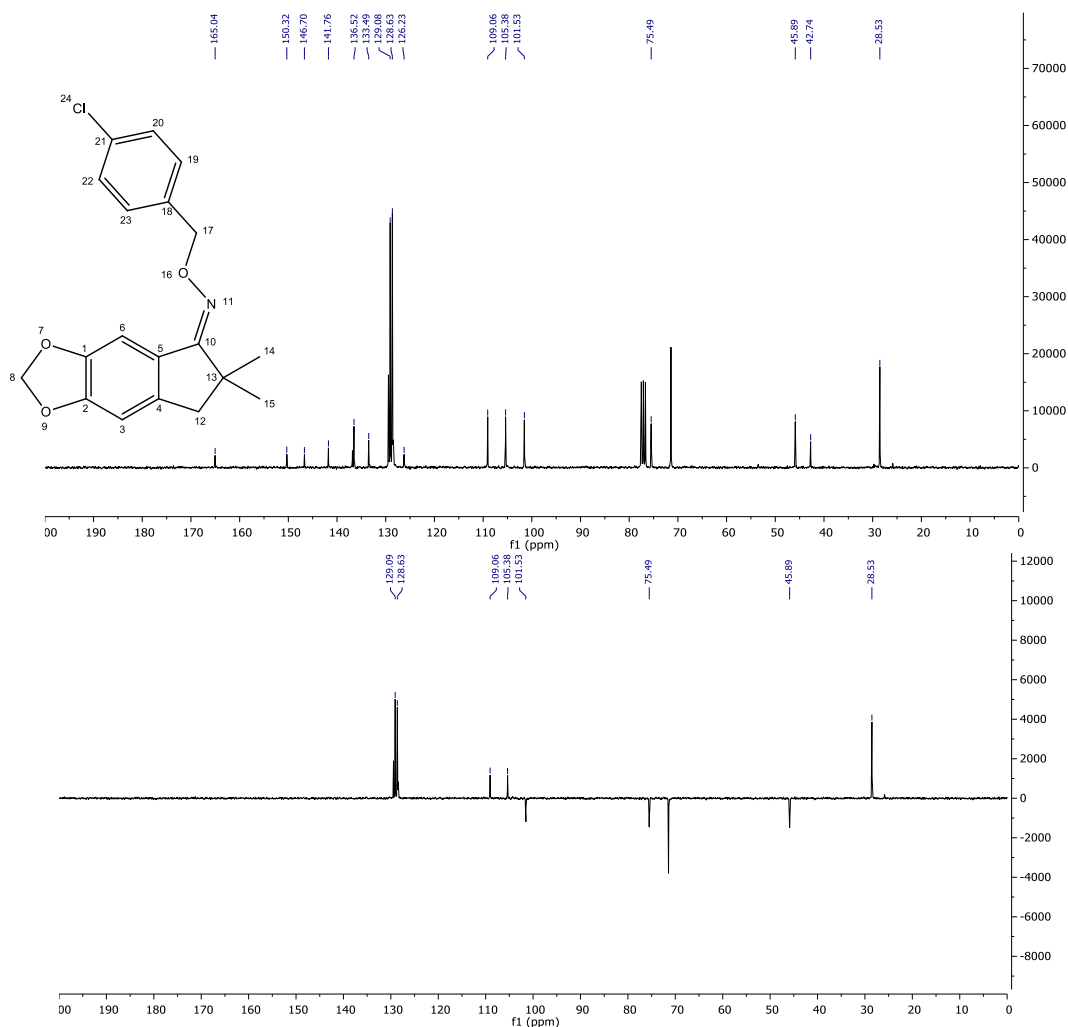
Espectro 25 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **MS-05f** (CDCl_3 , 75 MHz).



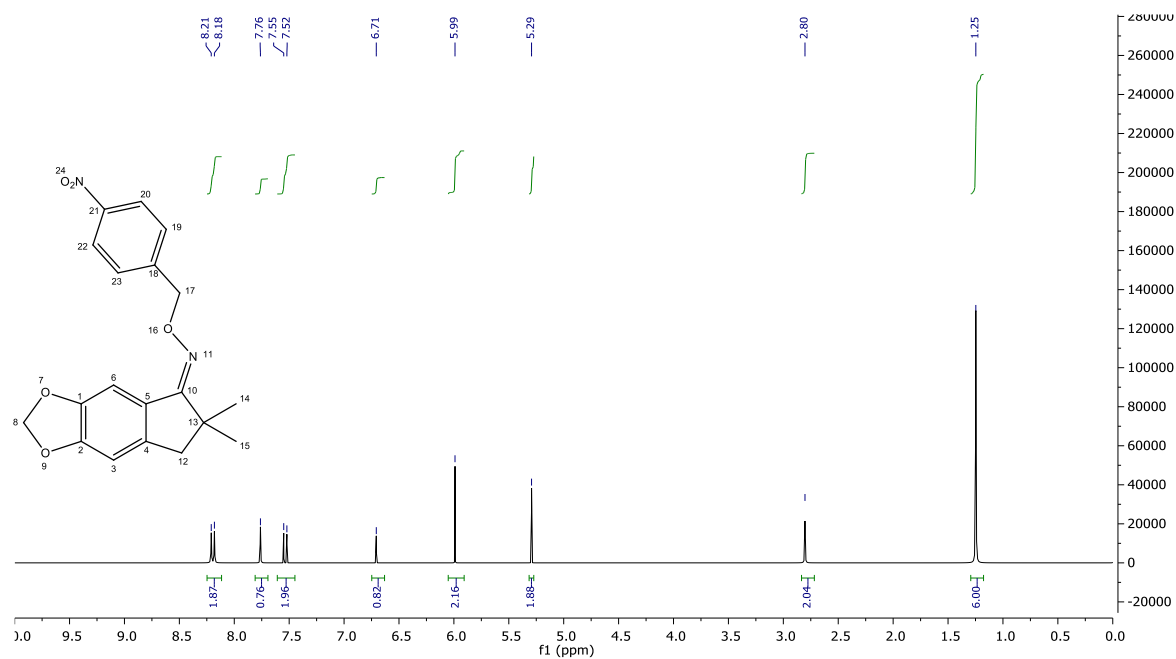
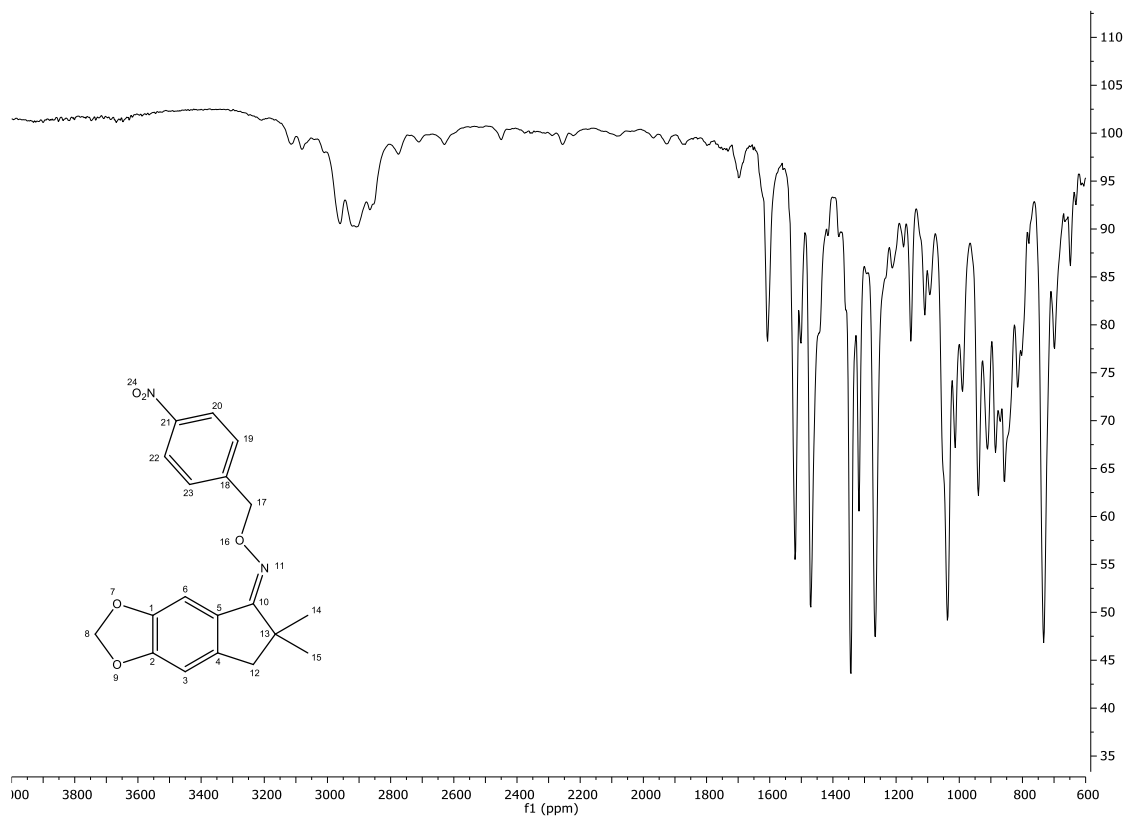
Espectro 26 - Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **MS-05g** (cm^{-1}).

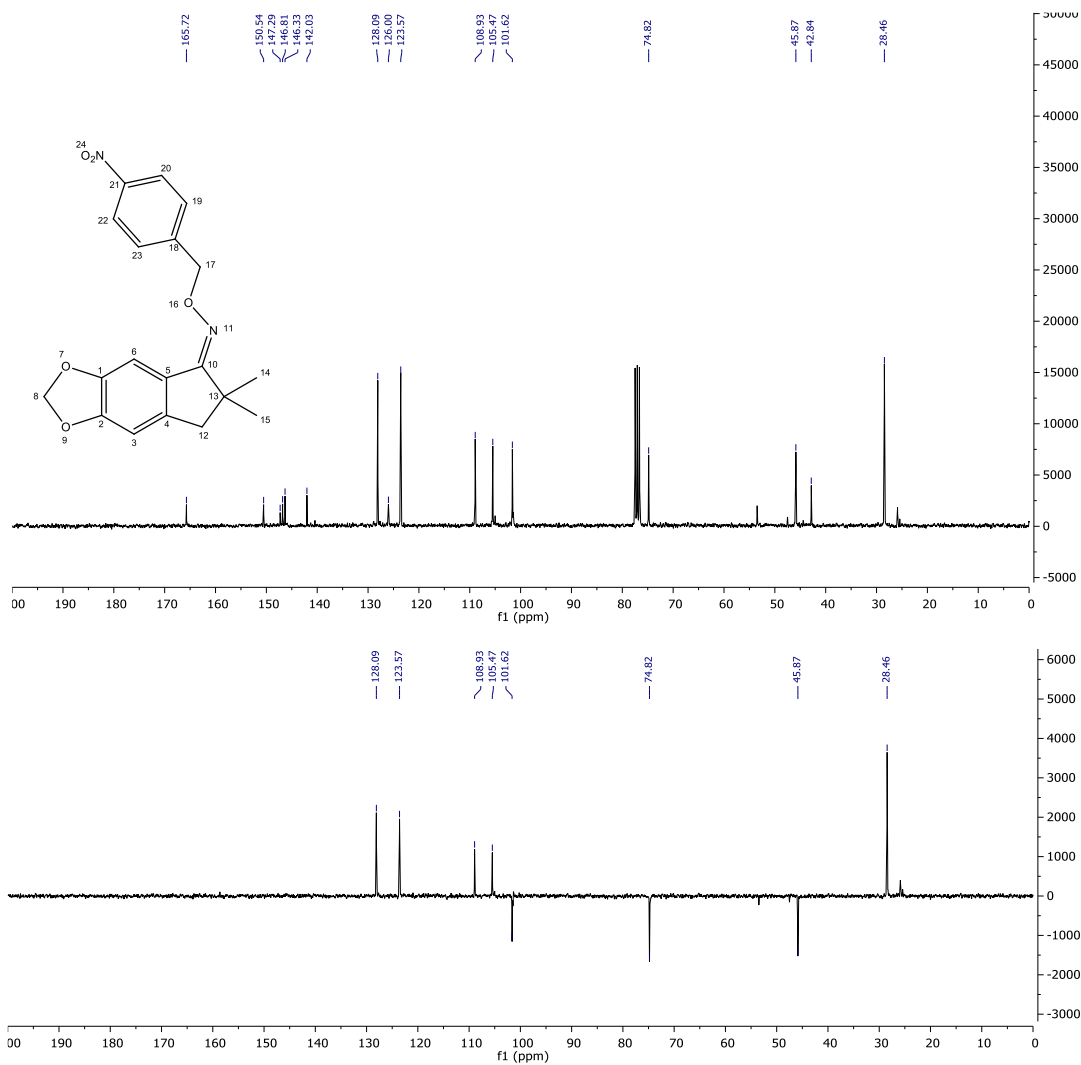


Espectro 27 - Espectro de RMN de ^1H da substância **MS-05g** (CDCl_3 , 300 MHz).



Espectro 28 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **MS-05g** (CDCl_3 , 75 MHz).





Espectro 31 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de ^{13}C da substância **MS-05h** (CDCl_3 , 75 MHz).